

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΙΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΔΠΜΣ ΑΜΠΕΛΟΥΡΓΙΑ – ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

*Μελέτη της αντοχής στην οξειδωτική αμάρωση επιλεγμένων
οίνων από την ποικιλία Μαλαγουζιά*

Ευάγγελος Ν. Σάββας

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια

Σταματίνα Καλλίθρακα

ΑΘΗΝΑ 2016

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΙΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΔΠΜΣ ΑΜΠΕΛΟΥΡΓΙΑ – ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

*Μελέτη της αντοχής στην οξειδωτική αμάρωση επιλεγμένων
οίνων από την ποικιλία Μαλαγουζιά*

Ευάγγελος Ν. Σάββας

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια

Σταματίνα Καλλίθρακα

ΑΘΗΝΑ 2016

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

*Μελέτη της αντοχής στην οξειδωτική αμάρωση επιλεγμένων
οίνων από την ποικιλία Μαλαγουζιά*

Ευάγγελος Ν. Σάββας

Εξεταστική Επιτροπή

Καλλίθρακα Στ., Επίκουρος Καθηγήτρια, Τμήμα Επιστήμης & Τεχνολογίας
Τροφίμων

Κοτσερίδης Γ., Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων

Μπινιάρη Αικ., Επίκουρος Καθηγήτρια, Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής

Περίληψη

Η οξείδωση των λευκών οίνων και η αλλαγή του χρώματος τους προς το καφετί αποτελεί αντικείμενο παγκόσμιας μελέτης εδώ και χρόνια. Το φαινόμενο της οξειδωτικής αμαύρωσης και οι αντιδράσεις της στους λευκούς οίνους κατά την διάρκεια της αποθήκευσης αποτελούν τόσο τεχνολογικής όσο και διατροφικής σημασίας εξ αιτίας της επιρροής που ασκούν στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των οίνων καθώς και στην αντιοξειδωτική τους κατάσταση. Στα πλαίσια της διερεύνησης αυτής έρχεται να προστεθεί και η παρούσα εργασία στοχεύοντας στην μελέτη του φαινομένου μέσω πειραμάτων, τα όποια πραγματοποιήθηκαν στον εργαστηριακό χώρο οινολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών κατά το έτος 2015, με σκοπό την επιταχυνόμενη οξείδωση στην ποικιλία Μαλαγουζιά. Για την επίτευξη αυτού του σκοπού στα δείγματα εφαρμόστηκε σχετικά υψηλή θερμοκρασία της τάξεως των 55°C ($\pm 0,2^{\circ}\text{C}$) με την βοήθεια υδατόλουτρου. Πρέπει να σημειωθεί το γεγονός ότι η θερμοκρασία πειράματος ($55^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$) η οποία εφαρμόστηκε στα δείγματα της ποικιλίας για 12 ημέρες δεν καθόρισε τις αντιδράσεις οξειδωτικής αμαύρωσης που θα λάμβαναν χώρα αλλά τον χρόνο πραγματοποίησής τους, μειώνοντας τον.

Η κινητική μελέτη της αμαύρωσης των οίνων, πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας φασματοφωτόμετρο και μετρώντας την απορρόφηση των δειγμάτων στα 420nm καθημερινά και για διάστημα 12 ημερών. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται υπό την μορφή διαγραμμάτων, έδειξαν ότι εμφανίστηκε αύξηση της απορρόφησης στα 420nm. Παράλληλα κατά την διάρκεια της θέρμανσης εξετάστηκε και η κινητική της μεταβολής της συγκέντρωσης των φαινολικών ουσιών, καθώς και της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων, με την βοήθεια των μεθόδων Folin-Ciocalteu και DPPH αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων υποδεικνύουν πως η αύξηση της απορρόφησης στα 420 nm είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την οξείδωση των φαινολικών ουσιών, που έχει ως συνέπεια τον σχηματισμό πολυμερισμένων ενώσεων (δομή κινόνης) με χαρακτηριστικό καφετί χρωματισμό.

Τέλος, για την διεξαγωγή της έρευνας, επιλέχτηκε ο αμπελώνας του κτήματος Ρωξάνη Μάτσα, που βρίσκεται στην Κάντζα Αττικής, μια περιοχή γνωστή από το παρελθόν για την καλλιέργεια και την παραγωγή κρασιών υψηλής ποιότητας. Η πτυχιακή αυτή μελέτη, περιορίστηκε σε έκταση 10 στρεμμάτων, τα οποία καλλιεργούνται αποκλειστικά με την ποικιλία Μαλαγουζιά (Malagouzia) βιολογικής καλλιέργειας. Ο αγρός χωρίστηκε σε 20 κελιά για την ποικιλία Μαλαγουζιά.

Abstract

The oxidization of white wines and the change of their colors to a brownish shade has been the object of worldwide research for many years. The phenomenon of oxidizing browning and its reactions towards white wines during storage are of both technological and nutritional importance, because of their influence on the organoleptic characteristics of these wines and because of their antioxidant condition. In relation to this research, this paper was formulated. Aiming at the study of this phenomenon, through experiments, which were conducted in the oenological laboratories of the Agricultural University of Athens during the period of 2015, targeting on the accelerated oxidization in the Malagouzia variety. In order to accomplish this goal in the samples, it was applied relatively high temperature ($55^{\circ}\text{C} = 0,2^{\circ}\text{C}$) with the help of waterbath. It has to be mentioned, that the temperature of the experiment ($55^{\circ} = 0,2^{\circ}\text{C}$), that was applied on the samples of the specific variety for 12 days, did not determine the reactions of the oxidizing browning, that were going to take place, but managed to determine the time of their actualization, by diminishing it.

The kinetic study of the browning of wines, was accomplished with the use of spectrophotometer, by counting the absorption of the samples in 420nm daily and for a period of 12 days. The results, which are demonstrated by diagrams, showed that there was an augmentation of absorption in 420nm. Meanwhile, during heating, the kinetic metabolism of the concentration of phenol substances, was examined, and even more the antioxidant capability of the samples, with the help of Folin-Ciocalteu methods and DPPH accordingly. The results of these calculations showed that, the augmentation of absorption in 420nm is inextricably related with the oxidizing of phenol substances, that results in the formulation of polymerized compounds (quinone structure), with a distinctive brown coloring.

Concluding, in order this research to be conducted, the vineyard of Roksani Matsa was selected for use, which is located in Gantza of Attiki, an area known from the past, for its cultivation and production of high quality wines. This dissertation study, was limited in a range of 10 acres, which are cultivated exclusively with the Malagouzia variety and have a biological farming character. The farming land was divided into 20 cells for the Malagouzia variety.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Οινολογίας του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Αμπελουργία - Οινολογία», κάτω από την επίβλεψη της επίκουρου καθηγήτριας του τμήματος δρ. Καλλίθρακα Σταματίνας, την οποία και θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερος για την εμπιστοσύνη, την υπομονή και την ανοχή που μου έδειξε, αλλά και για το φιλικό κλίμα που δημιούργησε βοηθώντας τους φοιτητές να λειτουργήσουν αποτελεσματικότερα. Θέλω επίσης να ευχαριστήσω τον επίκουρο καθηγητή του τμήματος κ. Κοτσερίδη Γεώργιο, για τις γνώσεις που μου παρείχε κατά τη διάρκεια του προγράμματος. Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στην Ελένη Τζανακούλη, χωρίς τη βοήθεια και την υποστήριξη της οποίας η ολοκλήρωση αυτής της διατριβής θα ήταν πάρα πολύ δύσκολη. Επίσης, ευχαριστώ την κ. Προξενιά Νίκη, τόσο για την πολύτιμη βοήθειά της και τις γνώσεις που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια του προγράμματος. Ευχαριστώ επίσης την κ. Μπινιάρη Αικατερίνη και ως μέλος της επιτροπής, αλλά και για τις γνώσεις που μου παρείχε κατά τη διάρκεια του προγράμματος. Στις ευχαριστίες μου δεν θα μπορούσα να μην συμπεριλάβω τον συμφοιτητή μου, Δημήτρη Τζάκο για την βοήθεια του και τη γενικότερη συνεργασία μας τόσο εντός όσο και εκτός του μεταπτυχιακού προγράμματος.

Τέλος, ευχαριστώ όλους όσους ενεπλάκησαν στην καθημερινότητά μου κατά τη διάρκεια του προγράμματος, καθηγητές, προσωπικό, συμφοιτητές και λοιπούς, αλλά και φίλους που απέκτησα και με στήριξαν με τον τρόπο τους καθ' όλη την πορεία των σπουδών μου.

Ευάγγελος Σάββας

Περίληψη	4
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1. Οι ιδιομορφίες του αμπελώνα στην Αττική	10
2. Η σύσταση του οίνου	10
2.1. Λευκή οινοποίηση.....	11
2.2. Τα αντιοξειδωτικά των οίνων	11
2.2.1 Γενικά.....	11
2.2.2 Ελεύθερες Ρίζες	12
3. Η ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΣΤΟΥΣ ΛΕΥΚΟΥΣ ΟΙΝΟΥΣ	13
4. ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ	14
4.1. Χημεία των φαινολικών παραγώγων	16
4.2. Μη φλαβονοειδείς φαινόλες	18
4.3. Φλαβονοειδείς ενώσεις	20
4.4 Φλαβονόλες.....	20
4.5. Ταννίνες	21
4.6. Υδρολύμενες ταννίνες	22
4.7. Προκυανιδίνες.....	23
5. Αντίδραση Maillard	24
5.1. Μηχανισμοί οξειδωτικής αμαύρωσης.....	25
5.2. Ενζυματικής φύσεως οξειδώσεις	25
5.3. Μη ενζυμικής φύσεως οξειδώσεις.....	28
5.4. Συμμετοχή των Ιόντων Σιδήρου και Χαλκού κατά την Χημική Οξείδωση του οίνου.....	30
5.5. Άλλοι Πιθανοί Μηχανισμοί Χημικής Αμαύρωσης.....	31
5.5.1. Ακεταλδεΐδη.....	31
5.5.2. Γλυοξυλικό οξύ.....	32
5.6. Προστασία Γλεύκους και Οίνου Από Τις Οξειδώσεις.....	33
5.6.1. Θείωση	33
5.6.2 Ασκορβικό οξύ.....	34
5.6.3. Απολάσπωση και κατεργασία με μπετονίτη	34
5.7. Μέθοδοι προσδιορισμού	35
5.7.1 Η μέθοδος Folin - Ciocalteu (προσδιορισμός ολικών φαινολών)	35
5.7.2 Η μέθοδος DPPH (2,2-διφαινυλο-1-πικρυλδραζυλικής ρίζας)	36
6. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	36
6.1. Σκοπός εργασίας	36
6.1.2 Κτήμα Μάτσα στην περιοχή της Κάντζας.....	36
6.1.3. Μαλαγουζιά	37

6.2. Περιοχή έρευνας	39
7. Υλικά και μέθοδοι.....	41
7.1. Μελέτη της Μαλαγουζιάς.....	41
7.1.1. Μέθοδος επιταχυνόμενης οξείδωσης.....	42
7.1.2. Μέθοδος Folin-Ciocalteu.....	42
7.2. Μέθοδος DPPH.....	44
8. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	48
8.1. Κινητική μελέτη της έντασης της οξειδωτικής αμαύρωσης.....	48
8.2. Ολικά φαινολικά με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu	55
8.3. Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας – μέθοδος DPPH.....	58
8.4. Οξειδωσιμότητα οίνου.....	61
9. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	65
10. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	67
11. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	76

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σύμφωνα με τους παλαιοντολόγους το κρασί ευδοκίμωσε πριν από την εποχή των παγετώνων στην πολική ζώνη, σε περιοχές όπως η Ισλανδία, στη βόρεια Ευρώπη, τη βορειοδυτική Ασία και στην Αλάσκα. Οι παγετώνες περιόρισαν όμως την εξάπλωση του, απομόνωσαν τη μια ποικιλία από την άλλη, δημιουργώντας έτσι τα πολλά και διαφορετικά είδη αμπέλου. Οι πρόγονοι του σημερινού αμπελιού «μετακινήθηκαν» προς τις θερμότερες ζώνες της κεντρικής και ανατολικής Ασίας, της κεντρικής Ευρώπης, κυρίως όμως προς την ευρύτερη περιοχή του νότιου Καύκασου, όπου μεταξύ Εύξεινου Πόντου, Κασπίας θάλασσας και Μεσοποταμίας γεννήθηκε το είδος **Άμπελος η Οινοφόρος (Vitis vinifera)**, η οποία με καλλιεργείται μέχρι σήμερα.

Πρώτοι γνωστοί αμπελοκαλλιεργητές θεωρούνται οι αρχαίοι Πέρσες, οι Σημιτικοί λαοί και οι Ασσύριοι. Η τέχνη της καλλιέργειας του αμπελιού πέρασε κατόπιν στους Αιγύπτιους, στους λαούς της Φοινίκης και στους κατοίκους του ελλαδικού χώρου. Δεν είναι μόνο η Μεσόγειος ο χώρος που καλλιεργήθηκε το αμπέλι την περίοδο αυτή. Στην ίδια περίοδο υπάρχουν αναφορές στην αρχαία Κίνα για την παραγωγή κρασιού.

Οι Έλληνες δεν είναι επιβεβαιωμένο που διδάχτηκαν την οινοποιία. Το πιο πιθανό είναι ότι ασχολούνταν με την αμπελοκαλλιέργεια πριν το 1700 π.Χ. Πιθανοί λαοί που μεταλαμπάδευαν τις γνώσεις τους είναι οι Αιγύπτιοι και οι Φοίνικες. Σε άλλες πηγές αναφέρεται ότι το κρασί προέρχεται από τη Θράκη, εκεί όπου λατρευόταν ο θεός Διόνυσος. Οι Έλληνες αγάπησαν το κρασί από όπου και αν προερχόταν η εκμάθηση της αμπελοκαλλιέργειας. Για αυτό το λόγο υπάρχουν τόσες αναφορές όπου βασιλείς και άρχοντες αλλά ακόμα και ο απλός λαός το εκτιμούσαν ιδιαίτερα, όπως και οι ποιητές οι οποίοι το υμνούσαν συνεχώς.

Έπιναν το κρασί με πολλούς τρόπους με επικρατέστερο αυτόν της ανάμειξης του κρασιού με νερό (ένα μέρος κρασιού και τρία μέρη νερού). Υπήρχαν ειδικά σκεύη για την ανάμειξη όπως κρατήρες και κύαθοι (μεγάλες κουτάλες) αλλά και για την ψύξη πριν την κατανάλωση. Η χρήση και η πόση του ανέρωτου οίνου («άκρατος οίνος») χαρακτηριζόταν βάρβαρη και συνηθιζόταν μόνο από αρρώστους ή κατά την διάρκεια ταξιδιού καθώς βοηθούσε στην τόνωση. Ακόμα πρόσθεταν μυρωδικά και μπαχαρικά. Η προσθήκη άψινθου, (η παρασκευή δηλαδή Βερμούτ) ονομαζόταν ιπποκράτειος οίνος, μιας και ο Ιπποκράτης θεωρείται ο πρώτος που την χρησιμοποίησε. Οι τεχνικές της εποχής δεν διαφέρουν πολύ από αυτές που χρησιμοποιούμε σήμερα. Κυκλοφορούσαν μάλιστα ειδικά βιβλία για το θέμα όπως αυτό του Θεόφραστου το οποίο μας δίνει ενδιαφέρουσες πληροφορίες. Οι Έλληνες σε αντίθεση με τους Ρωμαίους καλλιεργούσαν το αμπέλι χωρίς υποστύλωση απλωμένο στη γη που μέχρι σήμερα αυτή η ιδιαίτερη τεχνική βρίσκει απήχηση στους αμπελώνες της Σαντορίνης. Επίσης γνώριζαν την τεχνική της παλαίωσης, με θαμμένα πιθάρια μέσα στη γη και ερμητικά κλειστά με γύψο και ρετσίι στην οπή τους. Έτσι φημολογείται ότι ανακάλυψαν την επίδραση του ρετσίι στον οίνο. Οι πήλινοι αμφορείς οι οποίοι χρησιμοποιούνταν για την μεταφορά του οίνου ήταν αλειμμένοι με πίσσα για πλήρη στεγανοποίηση και συχνά με σφραγίδα ή μπογιά σημείωναν την περιοχή προέλευσης, το έτος παράγωγης τον οινοποιό αλλά και το εμφιαλωτή.

Από τις κυριότερες δραστηριότητες των αρχαίων Ελλήνων υπήρξε το εμπόριο του οίνου. Υπήρχαν νόμοι για την προστασία της ποιότητας του, αλλά και νόμοι ενάντια

στον ανταγωνισμό (στη Θάσο υπήρχε σχετική νομοθεσία δήμευσης του οίνου το οποίο μετέφεραν ξένα πλοία, όταν αυτά προσέγγιζαν το λιμάνι της).

Οι πιο φημισμένοι οίνοι ήταν αυτοί του βορείου Αιγαίου, της Λήμνου, Θάσου Λέσβου, Χίου, Ικαρίας και Σάμου. Μετά την κλασική εποχή απέκτησαν ιδιαίτερη φήμη οι οίνοι της Ρόδου, της Κω αλλά και της Κύπρου.

1.1. Οι ιδιομορφίες του αμπελώνα στην Αττική

Τα εδάφη της Αττικής παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία. Είναι κυρίως ασβεστούχα και αργιλώδη και προέρχονται από προσχώσεις ποταμών και λιμνών. Δεν είναι ιδιαίτερα γόνιμα λόγω της χαμηλής περιεκτικότητας σε οργανικές ουσίες.

Η Αττική όμως είχε πάντα ένα μεγάλο σύμμαχο, το κλίμα της. Καθώς περιβάλλεται από θάλασσα, οι ήπιοι χειμώνες, η μεγάλη ηλιοφάνεια - από τις μεγαλύτερες στον Ελλαδικό χώρο- τα μελτέμια και η θαλασσινή αύρα που κατεβάζουν τη θερμοκρασία το καλοκαίρι, διαμορφώνουν τις ιδανικές συνθήκες για αμπελοκαλλιέργεια.

Οι σημερινοί αμπελουργοί σκάβουν τα ίδια αμπελοτόπια που φρόντιζαν κι οι πρόγονοί τους. Αυτά που προμήθευαν το κρασί στα ονομαστά συμπόσια των Αθηνών. Το κρασί και το αμπέλι είναι ταυτόσημο του ελληνικού πολιτισμού.

Ο Αττικός αμπελώνας έχει τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που παρουσιάζουν οι περισσότερα αμπελώνες της Ελλάδας. Ο κλήρος είναι μικρός και δεν ευνοούνται οι τεράστιες καλλιέργειες. Λόγω της μορφολογίας του εδάφους υπάρχουν μικρές αμπελουργικές ζώνες και ο τρύγος γίνεται χειρωνακτικά. Πολλοί αμπελώνες ανήκουν σε οικογένειες, δημιουργώντας μικρούς αλλά παθιασμένους οινοποιούς. Αλλά και τα μεγαλύτερα οινοποιεία συνεργάζονται με ανεξάρτητους αμπελουργούς, που έχουν τη δυνατότητα να παράγουν σταφύλια υψηλής ποιότητας.

2. Η σύσταση του οίνου

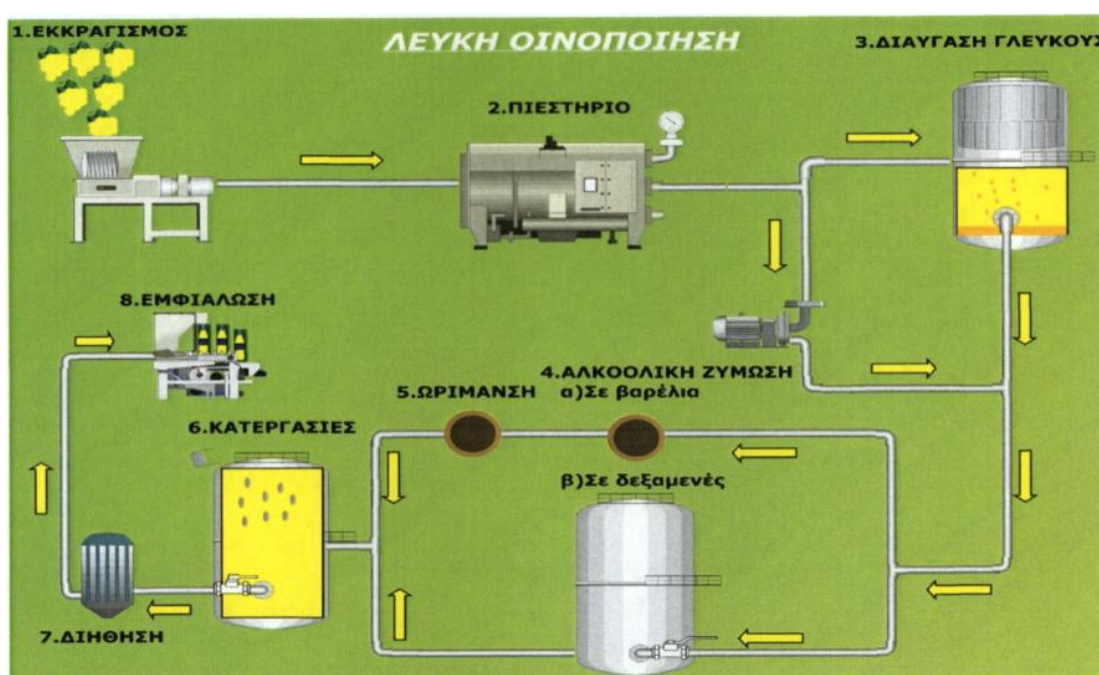
Διάφορες έρευνες έδειξαν ότι η σύσταση του γλεύκους και του οίνου είναι ίδια ποιοτικά. Ποσοτικά όμως παρατηρούνται μεταβολές οι όποιες είναι αποτέλεσμα της αλκοολικής ζύμωσης και των επεξεργασιών που υφίσταται το γλεύκος κατά την διάρκεια της οινοποίησης. Το νερό, τα ανόργανα και οργανικά συστατικά αποτελούν τις τρεις βασικές ομάδες στις όποιες κατατάσσονται τα επιμέρους συστατικά.

Το νερό αποτελεί το 60-80% του γλεύκους, ποσοστό που εξαρτάται από την ωριμότητα, τις κλιματολογικές συνθήκες, την περιοχή και την ποικιλία. Στα ανόργανα συστατικά ανήκουν τα ανόργανα ιόντα που βρίσκονται κυρίως στα στερεά μέρη του σταφυλιού. Χαρακτηριστικό είναι ότι τόσο στο γλεύκος όσο και στον οίνο δεν απαντώνται ανόργανα οξέα καθώς η ύπαρξη βάσεων σε υψηλή συγκέντρωση οδηγεί στην εξουδετέρωσή τους. Τα οργανικά συστατικά τους γλεύκους και του οίνου είναι εκείνες οι χημικές ενώσεις που θεωρούνται υπεύθυνες για τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του παραγόμενου οίνου. Πρόκειται, δηλαδή για τις αρωματικές και φαινολικές ενώσεις, τα σάκχαρα και τους πολυσακχαρίτες, τα οργανικά οξέα καθώς και επίσης και τα ενζύμα και τις βιταμίνες.

2.1. Λευκή οινοποίηση

Κύρια χαρακτηριστικά της λευκής οινοποίησης (Εικόνα 1) είναι η απουσία εκχύλισης και ο διαχωρισμός του γλεύκους σε κλάσματα. Τα αρωματικά συστατικά του σταφυλιού βρίσκονται μέσα στη φλούδα και στα κύτταρα κάτω από αυτή. Στη λευκή οινοποίηση τα σταφύλια πρέπει να είναι υγιή και η θείωση του γλεύκους πιο αυξημένη από ότι στην ερυθρά οινοποίηση διότι στο λευκό γλεύκος απουσιάζουν οι ταννίνες που το προστατεύουν από τις οξειδώσεις. Ο διαχωρισμός του γλεύκους από τα στέμφυλα πρέπει να γίνεται πάντοτε πριν από τη ζύμωση ώστε η εκχύλιση να ελαχιστοποιείται.

Σημαντικότερο στοιχείο της λευκής οινοποίησης είναι η απομάκρυνση κάθε στέρεου συστατικού του γλεύκους πριν από τη ζύμωση, όπως και η πραγματοποίηση αυτής σε χαμηλή θερμοκρασία. Σε χαμηλή θερμοκρασία πραγματοποιείται η εκχύλιση αρωματικών συστατικών, αποφεύγοντας την παραλαβή φαινολικών ενώσεων.



Εικόνα 1. Σχεδιάγραμμα Λευκής οινοποίησης

2.2. Τα αντιοξειδωτικά των οίνων

2.2.1 Γενικά

Η χημική έννοια του όρου «αντιοξειδωτικά» αναφέρεται στην τάση ενός μορίου να αποδώσει ένα ηλεκτρόνιο προς ένα οξειδωτικό παράγοντα, συνήθως ελεύθερη ρίζα, με αποτέλεσμα την προφύλαξη άλλων μορίων τα οποία θα ήταν πιθανοί στόχοι αυτού του παράγοντα.

Ως αντιοξειδωτική μπορεί να χαρακτηριστεί οποιαδήποτε ουσία που όταν είναι παρούσα σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε σχέση με τη συγκέντρωση κάποιου υποστρώματος, καθυστερεί σημαντικά ή αποτρέπει την οξείδωση αυτού του υποστρώματος. Ο φυσιολογικός ρόλος των αντιοξειδωτικών να εμποδίσουν την

καταστροφή των συστατικών του κύτταρου που προκύπτει ως συνέπεια των χημικών αντιδράσεων με ελεύθερες ρίζες. Οι αντιοξειδωτικές ουσίες έχουν τη δυνατότητα να σταθεροποιούν ή να απενεργοποιούν τις ελεύθερες ρίζες πριν αυτές επιτεθούν σε κύτταρα και βιολογικούς στόχους και γι' αυτό το λόγο, είναι ιδιαίτερα σημαντικές για τη διατήρηση της υγείας των κυττάρων.

Για να χαρακτηριστεί μια ένωση αντιοξειδωτική θα πρέπει να έχει τις εξής ακόλουθες ιδιότητες:

- ❖ Όταν είναι παρούσα σε χαμηλή συγκέντρωση συγκριτικά με το προς οξείδωση υπόστρωμα, να μπορεί να καθυστερήσει ή να αποτρέψει την αυτοοξείδωση ή την προκληθείσα από ελεύθερες ρίζες οξείδωση.

- ❖ Η ελεύθερη ρίζα που σχηματίζεται μετά τη δράση της πρέπει να είναι σταθερή (μέσω ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου) σε περαιτέρω οξείδωση (Vinson et al., 2001).

Τα κυριότερα αντιοξειδωτικά που περιέχονται στο κρασί είναι φλαβονόλες, όπως κερκετίνη, μυρισετίνη και απιγενίνη, φλαβανόλες όπως κατεχίνη, επικατεχίνη και επιγαλλοκατεχίνη, στιλβένια όπως ρεσβερατρόλη, ταννίνες και πολυμερή ανθκυανίνων. Ακόμη στα κρασιά περιέχονται φαινολικά οξέα όπως το γαλλικό, το καφεϊκό, καφεύλοτρυγικό, ρ-κουμαρικό και το ρ-κουμαροϋλοτρυγικό. Οι αντιοξειδωτικές δράσεις των περισσότερων ενώσεων του οίνου είναι αντικείμενα διαφόρων μελετών.(Alonso et al., 2003/Waterhouse, 2002).

Επίσης ένα αντιοξειδωτικό πρέπει να ανταγωνίζεται αποτελεσματικά με το υπόστρωμα και την ενεργή ενδιάμεση ουσία, να αναγεννάτε γρήγορα από το βιολογικό σύστημα, να έχει πρόσβαση στην ενεργή ενδιάμεση ουσία στο μικροπεριβάλλον, καθώς και να βρίσκεται στον ίδιο χώρο με το προς οξείδωση υπόστρωμα (Vinson et al., 2001)

2.2.2 Ελεύθερες Ρίζες

Στις αρχές τις δεκαετίας του '60, ξεκίνησε μια έρευνα της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας, η οποία έδειξε ότι άνθρωποι που ζούσαν στις μεσογειακές χώρες και κυρίως στην Ελλάδα, εμφάνιζαν τα μικρότερα ποσοστά θνησιμότητας από καρκίνο και στεφανιαία νόσο, λόγω του ότι η Μεσογειακή Διατροφή, η οποία περιλαμβάνει δύο βασικά συστατικά: το ελαιόλαδο που είναι η κύρια πηγή λίπους και το κρασί, μειώνει τον κίνδυνο της αρτηριοσκληρόνωσης, ελαττώνει τη συγκέντρωση της γλυκόζης, της ινσουλίνης και της κακής χοληστερόλης, προστατεύει από την πτώση των εγκεφαλικών λειτουργιών, την απώλεια μνήμης και ασθένειες που σχετίζονται με το γήρας, μειώνει την αρτηριακή πίεση. Τέλος οι κάτοικοι αυτοί είχαν το μεγαλύτερο μέσο όρο ζωής, σε σχέση με τους κατοίκους των άλλων χωρών, σύγχρονες έρευνες διαπίστωσαν ότι οι ελεύθερες ρίζες είναι η αιτία όλων των παραπάνω παθήσεων. Το κρασί περιέχει αντιοξειδωτικές ουσίες, οι οποίες είναι η κύρια πηγή εξουδετέρωσης των ελεύθερων ριζών

Ένα άτομο ή μόριο με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια και ανεξάρτητη παρουσία λέγεται ελεύθερη ρίζα και συμμετέχει πολύ εύκολα σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής με γειτονικά μόρια (Rosen et al., 1999). Υπάρχουν και οι διρίζες όπου δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια βρίσκονται σε κάποια απόσταση μεταξύ τους αλλά στο ίδιο μόριο (Schlesier et al., 2002).

Κατά τις αντιδράσεις αυτές όχι μόνο μεταβάλλονται σημαντικά τα γειτονικά μόρια στόχοι, αλλά μερικές φορές μεταβιβάζονται τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια από στόχο σε στόχο, δημιουργώντας έτσι μία δεύτερη, τρίτη κ.ο.κ. ελεύθερη ρίζα υπό μορφή

αλυσιδωτής αντίδρασης. Η πολύ μεγάλη βλαπτική επίδραση των ελευθέρων ριζών οφείλεται ακριβώς στον πολλαπλασιασμό των μεταβολών που προκαλούνται από παρόμοιες αλυσιδωτές αντιδράσεις. (Schlesier et al., 2002)

Μια ποικιλία ελευθέρων ριζών σχηματίζεται καθημερινά στον οργανισμό μας, από αιτίες όπως υψηλή συγκέντρωση οξυγόνου, έκθεση σε ουσίες όπως το όζον, η αιθαλομίχλη, χημικά και φάρμακα καθώς και κατά τη διάρκεια φυσιολογικών λειτουργιών (Γαλάρης, 2001).

Ον πλέον σημαντικές ελεύθερες ρίζες είναι μοριακά είδη με κέντρο το οξυγόνο και μερικές φορές το άζωτο ή τον άνθρακα. Το ίδιο το οξυγόνο που αναπνέουμε αποτελεί μία ελεύθερη ρίζα, αφού περιέχει δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια που βρίσκονται σε δύο διαφορετικά τροχιακά. Συνολικά όλα τα μοριακά είδη που περιλαμβάνουν οξυγόνο, είτε είναι ελεύθερες ρίζες είτε όχι, ονομάζονται δραστικά είδη οξυγόνου (ΔΕΟ). (Βαλαβανίδης, 2006)

Ελεύθερες ρίζες μπορούν να προκύψουν από:

- Υπεριώδεις και ιονίζουσες ακτινοβολίες
- Ραδιόλυση του H₂O
- Φαγοκύτωση
- Αντιδράσεις που καταλύονται από την οξειδάση της ξανθίνης
- Αναπνευστική αλυσίδα στα μιτοχόνδρια
- Μεταβολισμός κατεχολαμινών
- Οξείδωση αιμοσφαιρίνης
- Οξειδοαναγωγική ανακύκλωση
- Αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων σε ενδοπλασματικό δίκτυο και πυρήνα
- Μεταβολισμός εικοσανοειδών

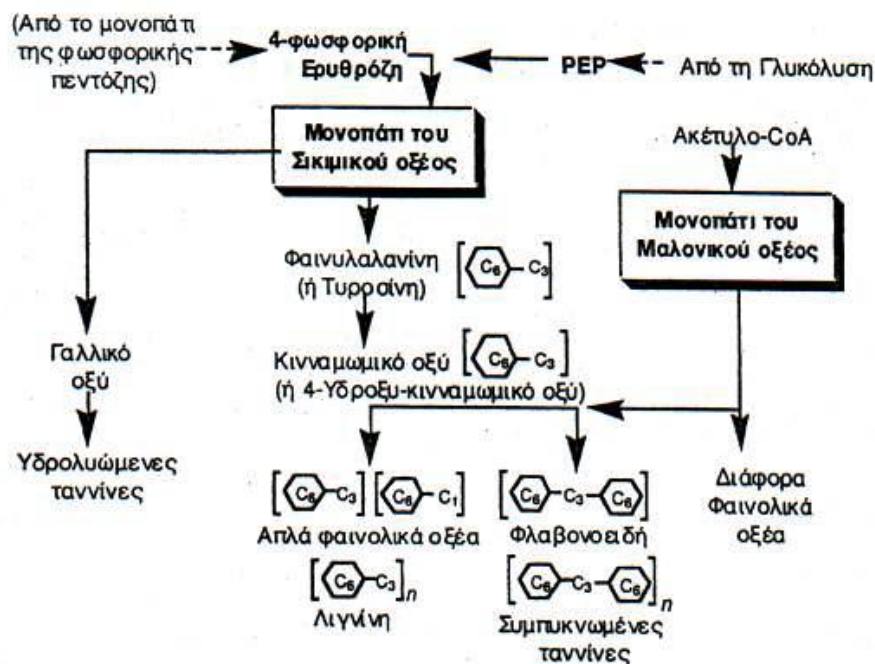
(Groff and Gropper, 2000)

3. Η ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΣΤΟΥΣ ΛΕΥΚΟΥΣ ΟΙΝΟΥΣ

Κατά την διάρκεια της οινοποίησης και της παλαίωσης οι οίνοι μπορεί (σκοπίμως ή όχι) να εκτίθενται στο οξυγόνο. Στους ερυθρούς οίνους, μια ελεγχόμενη κατανάλωση οξυγόνου κατά την διάρκεια παλαίωσης ή αποθήκευσης θεωρείται να επιδρά θετικά σε μερικά ποιοτικά χαρακτηριστικά, όπως π.χ. το χρώμα και η στυπτικότητα. Όσον αφορά όμως τους λευκούς οίνους, η έκθεση αυτών στο οξυγόνο έχει ως συνέπεια την τροποποίηση ή καταστροφή των αρωματικών συστατικών του οίνου και το σχηματισμό της ακεταλδεΐδης, προϊόντος χημικής οξείδωσης της αλκοόλης, που δίνει χαρακτηριστική οσμή των οξειδωμένων οίνων. Η παρατεταμένη οξείδωση έχει ως αποτέλεσμα τη μη αντιστρεπτή οξείδωση των συστατικών του οίνου και την εμφάνιση του χαρακτηριστικού αρώματος των οξειδωμένων οίνων που καλείται άρωμα οξείδωσης χαρακτηρίζοντας τον οίνο ως οξειδωμένο (Chinnici, et al., 2012). Επίσης η οξείδωση των φαινολικών ουσιών, που περιέχονται στους λευκούς οίνους, έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία πολυμερισμένων ενώσεων με χαρακτηριστικό καφετί χρωματισμό. Συνέπεια της παρουσίας των ενώσεων αυτών, είναι η υποβάθμιση του τελικού προϊόντος, καθώς επηρεάζει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των λευκών οίνων. Το εν λόγω φαινόμενο ονομάζεται οξειδωτική αμαύρωση του οίνου (φαινόμενο browning), για το οποίο και θα ακολουθήσει εκτεταμένη αναφορά παρακάτω.

4. ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ

Οι πολυφαινόλες, ιδιαίτερα αυτές που βρίσκονται φυσικά στα τρόφιμα, είναι ουσίες αυξανόμενου ενδιαφέροντος, κυρίως λόγω των βιολογικών ιδιοτήτων τους όπως αντιοξειδωτικές, αντι-θρομβωτικές, αντι-βακτηριακές, αντιαλλεργικές και αντι-φλεγμονώδεις ιδιότητες που παρουσιάζουν (Hurtado-Fernández, et al., 2010). Όσον αφορά το σταφύλι, μετά τους υδατάνθρακες και τα οξέα, τα φαινολικά συστατικά αποτελούν την μεγαλύτερη ομάδα συστατικών της σταφυλής. Στον οίνο τα φαινολικά συστατικά βρίσκονται σε διάφορες συγκεντρώσεις. Αποτελούν δευτερεύοντα προϊόντα του καταβολισμού των σακχάρων, περιλαμβάνοντας ένα ευρύ φάσμα, μη ομογενών ουσιών. Λόγω της μεγάλης δραστηριότητας, τα φαινολικά παράγωγα σπάνια απαντώνται στους φυτικούς ιστούς σε ελεύθερη μορφή (Harborne, 1980). Βρίσκονται σχεδόν πάντοτε σε συζευγμένη μορφή α) με σάκχαρα, β) με αλκυλομάδες, γ) με οργανικά οξέα ως εστέρες, δ) με θειικά ιόντα και ε) με άλλα οργανικά μόρια όπως οργανικά οξέα, αμίνες, λιπίδια και τερπενοειδή. Η βιοσύνθεση φυτικών φαινολών από διάφορα μονοπάτια φαίνεται στην εικόνα 2. Το κοινό χαρακτηριστικό τους, είναι η παρουσία ενός αρωματικού δακτυλίου, με μια ή περισσότερες υδροξυλομάδες. Οι ενώσεις αυτές ως συστατικά του σταφυλιού και του οίνου περιέχουν ένα σύνολο ουσιών οι οποίες για μεγάλο χρονικό διάστημα- λόγω της μη ακριβούς γνώσης της δομής τους – ονομάζονταν γενικά και αόριστα “ταννινοειδής ύλη” ή “χρωστική ύλη” ή “οινοταννίνη” (Σουφλερός, 2012). Τα φαινολικά παράγωγα είναι μια μεγάλη ομάδα χημικών ενώσεων, αποτελούμενη από δευτερογενείς μεταβολίτες που εμπλέκονται σε πολλές λειτουργίες των φυτών. Κατά κύριο λόγο, η λειτουργία τους αφορά στην προστασία των φυτικών ιστών από μικρόβια και παθογόνα, την προστασία του φυτού από την υπεριώδη ακτινοβολία, ενώ παράλληλα λειτουργούν ως ευνοϊκός παράγοντας για την ενίσχυση της γονιμότητας των γυρεόκοκκων (Boss et al., 1996). Αποτελούν σημαντικό κεφάλαιο της οινολογίας, γιατί καθορίζουν το χρώμα και την απόχρωση των ερυθρών οίνων, αλλά και τους γευστικούς χαρακτήρες τους. Επίσης επηρεάζουν τους αρωματικούς χαρακτήρες των οίνων και ευθύνονται για τις θετικές ή αρνητικές μεταβολές της ποιότητας τους κατά τη συντήρηση και παλαίωση.



Εικόνα 2. Βιοσύνθεση φυτικών φαινολών από διαφορετικά μονοπάτια. (Καράταγλης Σ., 1994)

Τέτοιες μεταβολές είναι για παράδειγμα η βελτίωση του οργανοληπτικού τους χαρακτήρα κατά την ωρίμαση υπό κατάλληλες συνθήκες, αλλά και το καφέτιασμα των λευκών οίνων και η εμφάνιση του καστανού θολώματος, που συμβαίνουν όταν δεν προστατεύονται τα φαινολικά συστατικά από τις οξειδώσεις. Οι αλλοιώσεις του χρώματος και των οργανοληπτικών χαρακτήρων των οίνων είναι αποτέλεσμα των χημικών και ενζυμικών οξειδωτικών δράσεων στα φαινολικά συστατικά (Κουράκου, 1998). Τα φαινολικά συστατικά του οίνου προέρχονται κυρίως από το σταφύλι, ενώ δευτερεύουσα πηγή τους είναι το ξύλο των βαρελιών. Πολύ μικρές ποσότητές τους, τέλος, σχηματίζονται κατά τον μεταβολισμό των ζυμών. Ο ρόλος τους στο σταφύλι είναι κατά κύριο λόγο αντιμικροβιακός, αλλά σε μικρότερο βαθμό προστατεύουν από τις προσβολές από έντομα και από την κατανάλωση από ζώα (Jackson, 2008). Οι ταννίνες (προκυανιδίνες, συμπυκνωμένες και πολυμερισμένες ταννίνες), και οι ανθοκυάνες, ελεύθερες ή ενωμένες με ταννίνες, αποτελούν τις δύο μεγάλες τάξεις των φαινολικών παραγώγων. Βρίσκονται συγκεντρωμένες στα στερεά μέρη του σταφυλιού και περνούν στον οίνο με εκχύλιση ή διάχυση, κατά τις διάφορες τεχνικές παρασκευής των έγχρωμων οίνων. Στο μόριο αυτών των ουσιών υπάρχουν μία ή περισσότερες δραστικές φαινολικές ομάδες. Οι ουσίες αυτές κατατάσσονται σε δύο κατηγορίες, τις πολυμοριακές και τις μονομοριακές φαινόλες. Οι πολυμοριακές φαινόλες έχουν βασικό σκελετό με 15 άτομα άνθρακα (C₆-C₃-C₆), του τύπου 2-φαινυλ-βενζοπυρόνη και λέγονται «φλαβονοειδείς φαινόλες», με κύριους εκπροσώπους τις ταννίνες και τις ανθοκυάνες. Τα φαινολικά συστατικά, εκτός από χαρακτήρα ποιότητας, αποτελούν και μηχανισμό άμυνας για τα πρέμνα. Συγκεκριμένα, λόγω της χρωμοφορικής φύσεως του δακτυλίου των φλαβονοειδών ενώσεων, μπορούν να απορροφούν το υπεριώδες και το υπέρυθρο χρώμα,

προστατεύοντας με αυτό τον τρόπο τα φυτά από τη UV ακτινοβολία (Smith and Markham, 1998). Συστατικά, όπως οι ανθοκυάνες, που απορροφούν και τα δύο φάσματα βοηθούν επίσης, στην ομαλή εξέλιξη της γονιμοποίησης ενώ αποτελούν ευνοϊκό παράγοντα της γονιμότητας των γυρεόκοκκων. Επιπλέον, έχουν και προστατευτική δράση κατά των μυκήτων και των βακτηρίων (Boss and Davies, 2001, Downey et al., 2006). Οι μονομοριακές φαινόλες, όπως το γαλλικό και το καφεϊκό οξύ ανήκουν στις μη φλαβονοειδείς φαινολικές ενώσεις. Υπάρχουν δύο γενικές προσεγγίσεις για τον καθορισμό και την ποσοτικοποίηση των περιεχόμενων πολυφαινολών στα τρόφιμα και συνεπώς στον οίνο. Το πρώτο είναι ο προσδιορισμός του συνολικού δείκτη (ολικά φαινολικά) με φασματοφωτομετρική ανίχνευση, συνήθως πραγματοποιείται με τη χρήση της μεθόδου Folin-Ciocalteu ή την απορρόφηση μετρήσεων στα 280 nm (Luque de Castro, et al., 2005). Η δεύτερη προσέγγιση αφορά τον διαχωρισμό των διαφορετικών φαινολικών ουσιών ξεχωριστά, συνήθως με HPLC (αέρια χρωματογραφία) (Kalili and deVilliers, 2011) ή τριχοειδή ηλεκτροφόρηση (Hurtado-Fernández et al., 2010). Η χημική πολυπλοκότητα αυτών των ενώσεων, οι παρεμβολές που υπάρχουν στον οίνο και η προβληματική εξαγωγή τους από το δείγμα είναι τα κύρια προβλήματα που εμποδίζουν την ακριβή εκτίμηση του δείκτη των ολικών φαινολικών ουσιών (Blasco, et al., 2005).

4.1. Χημεία των φαινολικών παραγώγων

Εξ ορισμού, η επωνυμία φαινολικά παράγωγα υποδηλώνει ότι στο μόριο αυτών των ουσιών υπαισέρχονται μία ή περισσότερες δραστικές φαινολικές ομάδες. Η ταξινόμησή τους περιλαμβάνει δύο μεγάλες κατηγορίες: τις φλαβονοειδείς και τις μη φλαβονοειδείς φαινόλες. Στην κατηγορία των φλαβονοειδών φαινολών υπάγονται οι πολυμοριακές φαινόλες με βασικό χημικό τύπο C₆-C₃-C₆, ο οποίος αντιστοιχεί στη φλαβονόνη (από την οποία απορρέει και το όνομα της κατηγορίας αυτής). Στην κατηγορία των μη φλαβονοειδών φαινολών υπάγονται μονομοριακά φαινολικά παράγωγα, τα οποία ανευρίσκονται στους φυτικούς ιστούς και τα διάφορα φυτικά προϊόντα. (Κουράκου, 1998, Castañeda et al., 2009). Φαινόλες ονομάζονται τα υδροξυλιωμένα παράγωγα των αρωματικών υδρογονανθράκων που περιέχουν ένα ή περισσότερα υδροξύλια σε αντικατάσταση ισάριθμων υδρογόνων συνδεδεμένων με τα άτομα άνθρακα του δακτυλίου. Τα βενζολικά παράγωγα με υδροξύλιο σε αντικατάσταση υδρογόνου της πλευρικής αλυσίδας ονομάζονται αρωματικές αλκοόλες και όχι φαινόλες (Κουράκου, 1998). Η ευκινησία των ηλεκτρονίων του δακτυλίου του βενζολίου δημιουργεί το φαινόμενο του συντονισμού (μεσομέρεια). Πρόκειται για τη μετατόπιση των ηλεκτρονίων των τριών διπλών δεσμών του βενζολικού πυρήνα και των δύο ζευγών ηλεκτρονίων του οξυγόνου. Η μετατόπιση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση θετικού φορτίου επί του οξυγόνου (άρα ευκολότερη μετακίνηση του υδρογόνου ως πρωτονίου) και ενός αρνητικού φορτίου σε κάποια κορυφή του δακτυλίου, σε όρθο ή πάρα θέση. Στο φαινόμενο του συντονισμού οφείλεται η σταθερότητα του βενζολικού δακτυλίου, με συνέπεια να σπάει πολύ δύσκολα, ενώ δίνει αντιδράσεις αντικατάστασης και σπάνια προσθήκης. Συμπερασματικά, η εμφάνιση ηλεκτρικών φορτίων στα μόρια των ανθοκυανών και των ταννινών τους δίνει τη δυνατότητα να συμπεριφέρονται ως ηλεκτρονιόφιλα ή πυρηνόφιλα αντιδραστήρια και ως εκ τούτου συμμετέχουν σε αντιδράσεις ανθοκυανών-ταννινών (Ribereau-Gayon, et al., 2006). Στις φαινόλες δημιουργούνται διαμοριακές συζεύξεις με δεσμό υδρογόνου. Το υδρογόνο τείνει να ενωθεί με οξυγόνο, είτε του ίδιου, είτε άλλου μορίου. Έτσι οι ενδομοριακές συζεύξεις είναι

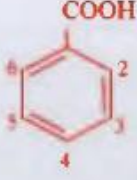
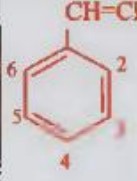
συνηθισμένες στα φαινολικά παράγωγα. Επίσης η παρουσία δεσμού υδρογόνου μειώνει τη δραστηριότητα των φαινολικών ομάδων, όπως τη διαλυτότητα σε αλκαλικό διάλυμα και την ικανότητα σχηματισμού εστέρων και αιθέρων. Οι φαινόλες δεν εστεροποιούνται εύκολα στη φύση, αντίθετα με τις αλκοόλες, και οι λίγοι εστέρες που απαντούν στα φαινολικά παράγωγα αποτελούν ένωση μεταξύ της όξινης ομάδας ενός φαινολικού οξέος και του αλκοολικού υδροξυλίου ενός άλλου μορίου, δηλαδή είναι εστέρες οξέων-αλκοολών και όχι οξέων-φαινολών. Αντίθετα, ο σχηματισμός αιθέρων είναι πολύ πιο συνηθισμένος, κυρίως με φαινολική ομάδα και με μεθυλική αλκοόλη. Οι φαινολαιθέρες (γουαϊακόλη, ευγενόλη) έχουν ευχάριστη συνήθως οσμή και είναι αρωματικά συστατικά των οίνων. Οι ανθοκυάνες αποτελούνται από ένα άγλυκο φαινολικό συστατικό (C6-C3-C6) και ένα αλδεϋδοσάκχαρο, συνήθως γλυκόζη. Η συνήθης μορφή της γλυκόζης σε ελεύθερη κατάσταση είναι η ημιακεταλική, αφού το καρβονύλιο αντιδρά με το αλκοολικό οξύ της θέσης -4 και σχηματίζεται ένας ετεροκυκλικός εξαμελής δακτύλιος, το πυράνιο. Όταν ένα από τα φαινολικά -OH του άγλυκου φαινολικού συστατικού αντιδράσει με το -OH του άνθρακα της ημιακετάλης, σχηματίζεται ακετάλη. Συνεπώς οι ανθοκυάνες είναι ετεροζίτες, όπου το άγλυκο και το σάκχαρο είναι συνδεδεμένα με ακεταλικό δεσμό και όχι με αιθερικό. Επειδή οι ακετάλες υδρολύονται εν θερμώ σε όξινο περιβάλλον, είναι δυνατή η μελέτη των φυσικών ετεροζιτών και των άγλυκων των φαινολικών συστατικών, μεταξύ των οποίων και οι ανθοκυανιδίνες, δηλαδή το άγλυκο των ανθοκυανών. Η οξειδωση των φαινολών έχει μεγάλη σημασία στην οινολογία. Το πρώτο στάδιο είναι η δημιουργία μιας ελεύθερης ρίζας, με ένα άτομο οξυγόνου μονοσθενές με ένα μονήρες ηλεκτρόνιο, με την απομάκρυνση του -H από το φαινολικό -OH. Λόγω του φαινομένου του συντονισμού, σχηματίζεται ρίζα που σε θέση ο- ή π- έχει ένα τρισθενές άτομο άνθρακα με ένα μονήρες ηλεκτρόνιο. Αυτές οι ρίζες είναι πολύ ασταθείς και αντιδρούν γρήγορα μεταξύ τους ή με άλλη ρίζα, σχηματίζοντας δεσμούς C-C, C-O και O-C. Στη συνέχεια, οξειδώσεις των προϊόντων οξειδωσης και οξειδώσεις με υπόστρωμα διάφορα σύνθετα φαινολικά παράγωγα, οδηγούν σε πολυμερισμένα παράγωγα με καστανόμαυρο χρώμα. Σε τέτοιους μηχανισμούς αποδίδεται το καφέτισμα των οίνων (Κουράκου, 1998). Τα ένζυμα που εμπλέκονται στην οξειδωση των φαινολικών συστατικών είναι οι πολυφαινολοξειδάσες. Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται οι οξειδοαναγωγάσες ή τυροσινάσες που βρίσκονται σε υγιή σταφύλια και η λακκάση που βρίσκεται σε σταφύλια προσβεβλημένα από *Botrytis cinerea*. Οι τυροσινάσες οξειδώνουν τις διφαινόλες και τις μονοφαινόλες σε κινόνες. Τα ένζυμα αυτά είναι μερικώς διαλυτά στο γλεύκος, έχουν μειωμένη δραστηριότητα μετά τη διαύγαση, είναι αρκετά ευαίσθητα στο διοξείδιο του θείου και απομακρύνονται κατά την κατεργασία με μπεντονίτη. Ο μηχανισμός της οξειδωσης ξεκινά με τη δράση της τυροσινάσης, παρουσία οξυγόνου, στα υδροξυκιναμμωμικά οξέα, η οποία οδηγεί στην παραγωγή κινονών. Αυτό είναι και το πρώτο στάδιο της καστανώσης, ενώ οι επόμενες αντιδράσεις που οδηγούν στο σχηματισμό καστανών χρωστικών και άλλων προϊόντων, δεν είναι ενζυμικές. Οι κινόνες τότε μετέχουν στον σχηματισμό άλλων προϊόντων και σε αντιδράσεις συμπύκνωσης και οξειδωσης. Είναι γεγονός πως οινοποιητικές πρακτικές όπως η παρατεταμένη επαφή με τα στέμφυλα και η έντονη πίεση, ενισχύουν την τάση του οίνου προς την καστανώση (Nunez-Delicato, et al., 2007, Sanchez-Ferrer, et al., 1988, Weemaes, et al., 1998, Ho, et al., 1999). Τέλος αναφέρεται πως οι φλαβονοειδείς φαινόλες έχουν στο μόριο τους έναν δακτύλιο πυρυλίου που τους προσδίδει χαρακτηριστικές ιδιότητες, κάποιες από τις οποίες χρησιμοποιούνται κατά την ανάλυση των ανθοκυανών. Συγκεκριμένα το μόριο των φυσικών φλαβονοειδών φαινολών αποτελείται από δύο βενζολικούς δακτυλίους

ενωμένους με πυρυλικό δακτύλιο και μπορεί να είναι ή όχι επίπεδο, ανάλογα με τους δεσμούς των τριών ατόμων άνθρακα του πυρυλίου (Κουράκου, 1998).

4.2. Μη φλαβονοειδείς φαινόλες

Η παρουσία τους στους οίνους οφείλεται είτε στο σταφύλι, όπου ανευρίσκονται στους φλοιούς και τη σάρκα, είτε στο ξύλο των βαρελιών, όπου γίνεται η παλαίωση. Οι ερυθρές ποικιλίες και οίνοι περιέχουν μεγαλύτερες ποσότητες σε σχέση με τις λευκές ποικιλίες και οίνους (Ribereau-Gayon, 2000). Κύριοι εκπρόσωποι είναι τα φαινολοξέα (Εικόνα 3) και ειδικότερα τα παράγωγα του βενζοϊκού και του κινναμωμικού οξέος, των οποίων ένα ή περισσότερα υδρογόνα των ανθράκων του δακτυλίου έχουν αντικατασταθεί με υδροξυλομάδες και μεθόξυ ομάδες, και τα στυλβένια (Κουράκου, 1998, Κοτσερίδης, 2006). Ενδιαφέρον παρουσιάζει η αντιβακτηριακή δράση που εμφανίζουν πολλά από τα φαινολοξέα. Λόγω των μικρών ποσοτήτων που απαντούν στις σταφυλές, δε θεωρείται ότι επεμβαίνουν στην οινοποιητική πρακτική, όμως συγκαταλέγονται στους παρεμποδιστές της ανάπτυξης των βακτηρίων και ερμηνεύουν μερικώς τη δυσκολία εκδήλωσης της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Αυτό συμβαίνει γιατί τα βακτήρια, έχοντας ενζυματικό μηχανισμό λιγότερο πλήρη σε σχέση με τις ζύμες, είναι αρκετά ευαίσθητα ακόμη και σε μικρές δόσεις αντισηπτικών και αντιβιοτικών (Κουράκου, 1998, Κοτσερίδης, 2005). Τα φαινολοξέα απαντούν στα σταφύλια ως ετεροζίτες ή εστέρες (ταννίνες γαλλικού και ελλαγικού), όμως κατά την οινοποίηση και συντήρηση των οίνων υδρολύονται αργά, με όξινη υδρόλυση οι ετεροζίτες και με αλκαλική οι εστέρες, με αποτέλεσμα στους οίνους να βρίσκονται και σε ελεύθερη μορφή. Στους ερυθρούς οίνους οι συγκεντρώσεις τους κυμαίνονται από 100 έως 200 mg/L, ενώ στους λευκούς από 10 έως 20 mg/L. Από τα βενζοϊκά οξέα το σταφύλι περιέχει κυρίως γαλλικό οξύ, το οποίο βρίσκεται συνήθως υπό τη μορφή εστέρων των φλαβανολών-3 (κατεχινών). Από τα κινναμωμικά οξέα, μια μικρή ποσότητα βρίσκεται σε ελεύθερη μορφή, τα περισσότερα είναι εστεροποιημένα, κυρίως με τρυγικό οξύ, ενώ κάποια είναι ενωμένα με γλυκόζη. Τα υδροξυκινναμωμικά οξέα είναι και τα επικρατέστερα στο σταφύλι και βρίσκονται στα χυμοτόπια των κυττάρων του φλοιού και της σάρκας υπό τη μορφή των εστέρων με τρυγικό οξύ (καφεοτρυγικό, π-κουμαροτρυγικό, φερούλοτρυγικό). Οι εστέρες αυτοί είναι ιδιαίτερα ευοξειδωτά συστατικά του γλεύκους και ευθύνονται για το καφέτισμα των λευκών γλευκών. Τα κινναμωμικά οξέα συνδυάζονται με ανθοκυανικούς μονογλυκοζίτες, προς σχηματισμό ακυλιωμένων ανθοκυανών, μέσω της εστεροποίησης του καφεϊκού και του π-κουμαρικού οξέος με τη γλυκόζη του γλυκοζίτη (Ribereau-Gayon, et al., 2006, Κοτσερίδης, 2006). Τα φαινολικά οξέα είναι άχρωμα όταν βρίσκονται σε αλκοολικό διάλυμα, αλλά αποκτούν κίτρινο χρώμα όταν οξειδωθούν. Δεν έχουν ιδιαίτερη γεύση ή οσμή, αλλά αποτελούν πρόδρομες ενώσεις πτητικών φαινολών που παράγονται από κάποιους μικροοργανισμούς, όπως ζύμες του γένους *Brettanomyces* και ορισμένα βακτήρια. Το ψήσιμο (toasting) στο οποίο υποβάλλεται το ξύλο που προορίζεται να χρησιμοποιηθεί στην παρασκευή δρύινων βαρελιών έχει σαν αποτέλεσμα τη διάσπαση της λιγνίνης και το σχηματισμό διάφορων προϊόντων με οσμές καπνιστού, ψημένου ή καμένου, όπως είναι η γουαϊακόλη, η μεθυλγουαϊακόλη, η προπυλγουαϊακόλη, η ισοευγενόλη, η συρινγγόλη και η μεθυλσυρινγγόλη. Οι ενώσεις αυτές εκχυλίζονται στους οίνους που παλαιώνουν στα καινούρια αυτά δρύινα βαρέλια (Ribereau-Gayon, et al., 2006, Proestos, et al., 2005). Άλλη μια ένωση της ίδιας ομάδας είναι η τυροσόλη, η οποία απαντάται σε ερυθρούς και λευκούς οίνους.

Παράγεται κατά την αλκοολική ζύμωση από την τυροσύνη. Η τυροσόλη, της οποίας η συγκέντρωση παραμένει σχετικά σταθερή κατά την παλαιώση του οίνου, συνυπάρχει με άλλες μη φαινολικές αλκοόλες. Οι κουμαρίνες είναι παράγωγα του κινναμωμικού οξέος και σχηματίζονται από την ενδομοριακή εστεροποίηση ενός φαινολικού ΟΗ. Είναι συστατικά του ξύλου της δρυός, είτε σε γλυκοζιτική μορφή στο πράσινο ξύλο, είτε σε άγλυκη μορφή στο ώριμο ξύλο. Αν και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις (μg/L), απαντώνται σε οίνους που έχουν παλαιώσει σε βαρέλια, επηρεάζοντας τις οργανοληπτικές τους ιδιότητες. Σαν γλυκοζίτες είναι πικρές και σε άγλυκη μορφή είναι όξινες, με κατώφλι αντίληψης σε ερυθρούς οίνους τα 3 μg/L (Ribéreau-Gayon, et al., 2006). Άλλη μια οικογένεια που αποτελείται από περισσότερο πολύπλοκες πολυφαινόλες και απαντώνται σε σταφύλια, οίνους, είναι τα στυλβένια. Πρόκειται για ενώσεις με δύο βενζολικούς δακτυλίους, οι οποίοι συνδέονται συνήθως με ένα αιθάνιο ή πιθανώς με μια αιθυλενική αλυσίδα. Μεταξύ αυτών των trans ισομερών συγκαταλέγεται και η ρεσβερατρόλη ή αλλιώς το 3,5,4'-τριυδροξυστυλβένιο, ενώ απαντάται και το παράγωγό της με γλυκόζη. Παράγεται σε περιπτώσεις στρες, όπως μετά από προσβολή από μύκητες. Βρίσκεται στους κυρίως στους φλοιούς, (υπάρχει και στα γίγαρτα), και η συγκέντρωση διαφέρει από ποικιλία σε ποικιλία. Εκχλιίζεται κυρίως κατά την αλκοολική ζύμωση των ερυθρών οίνων. Η συγκέντρωσή της κυμαίνεται από 1 έως 3 mg/L και έχει διαπιστωθεί πως είναι ευεργετική για την υγεία (Κοτσερίδης, 2006, Ribéreau-Gayon, et al., 2006, Dell' Agli et al., 2004, Nikfardjam, et al., 2006, Scheiber, et al., 2002).

Βασικό οξύ	Βασικός τύπος	Όνομασία φαινολοξέων	Θέση πρόσθετων ομάδων	
			- OH	- OCH ₃
Βενζοϊκό		σαλικυλικό οξύ	2	
		π-υδροξυβενζοϊκό οξύ	4	
		γαλλικό οξύ	3, 4, 5	
		πρωτοκατεχινικό οξύ	3, 4	
		βανιλλικό οξύ	4	3
		συριγγικό οξύ	4	3, 5
		γεντισικό οξύ	2, 5	
Κινναμωμικό		π-κουμαρικό οξύ	4	
		καφεϊκό οξύ	3, 4	
		χλωρογενικό οξύ	3, 4	
		φερουλικό οξύ	4	3

Εικόνα 3. Τα κυριότερα φαινολοξέα των σταφυλιών (Χαρβαλιά και Μπενά-Τζούρου, 1982)

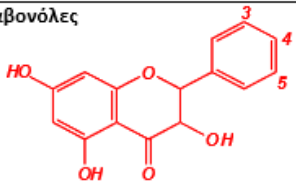
4.3. Φλαβονοειδείς ενώσεις

Τα φλαβονοειδή χαρακτηρίζονται από ένα βασικό σκελετό με 15 άτομα άνθρακα (C₆-C₃-C₆) του τύπου 2-φαινυλ-βενζοπυρόνη. Χωρίζονται σε πολλές ομάδες οι οποίες διαφοροποιούνται ανάλογα με το βαθμό οξειδωσης του πυρανικού δακτυλίου. Με την αυστηρή έννοια του όρου και με βάση τη δομή της 2-φαινυλ-βενζοπυρόνης, τα φλαβονοειδή αντιπροσωπεύονται μόνο από τις φλαβονόλες του σταφυλιού ενώ με την ευρεία έννοια του όρου συμπεριλαμβάνονται οι ανθοκυάνες και οι φλαβαν-3-όλες (Κοτσερίδης, 2006).

4.4 Φλαβονόλες

Οι φλαβονόλες (Εικόνα 4) ή 3-υδροξυ-φλαβόνες ή ανθοξανθίνες (λόγω του ανοιχτού κίτρινου χρώματος) απαντούν μόνο στους φλοιούς των ραγών (στις στιβάδες του υποδέρματος), τόσο των ερυθρών όσο και των λευκών σταφυλιών, υπό μορφή γλυκοζιτών στη θέση 3 ή μονογλυκουρονοζιτών-3. Σχηματίζονται με την προσκόλληση στη θέση -3 του κεντρικού δακτυλίου (βενζοπυρόνη) ενός μορίου μονοσακχαρίτη (κυρίως γλυκόζης) ή ενός μορίου γλυκουρονικού οξέος. Αποτελούν τις κίτρινες χρωστικές των φυτών (Κουράκου, 1998, Κοτσερίδης, 2005). Στην κατηγορία των φλαβονοειδών φαινολών περιλαμβάνονται οι πολυφαινόλες με 15 άτομα C (C₆-C₃-C₆) του τύπου 2-φαινυλ-βενζοπυρόνη. Χωρίζονται σε πολλές

ομάδες, οι οποίες διαχωρίζονται ανάλογα με το βαθμό οξείδωσης του πυρανικού δακτυλίου. Με βάση τη δομή της 2-φαινυλ-βενζοπυρόνης, αντιπροσωπεύονται μόνο από τις φλαβονόλες της σταφυλής, ενώ με την ευρεία έννοια του όρου συμπεριλαμβάνονται και οι ανθοκυάνες και οι φλαβονόλες-3. Στο σταφύλι βρέθηκαν οκτώ μονογλυκοζίτες και τρεις διγλυκοζίτες των φλαβονολών. Οι μορφές των γλυκοζιτών (με γλυκόζη) απαντούν σε πολύ μεγαλύτερες ποσότητες, αλλά βρίσκονται και σημαντικές ποσότητες των εστέρων τους με το γλυκουρονικό οξύ. Τα άλλα σάκχαρα που απαντούν είναι η γαλακτόζη, η ξυλόζη και η αραβινόζη. Τόσο οι λευκές, όσο και οι ερυθρές ποικιλίες αμπέλου περιέχουν τις ίδιες ποσότητες φλαβονολών, διαφέρουν όμως στην ποιοτική τους σύσταση. Η περιεκτικότητα των φλαβονολών ποικίλει από 10 έως 100 mg/kg ραγών. Τα παράγωγα της κερκετίνης είναι πάντα κυρίαρχα, ενώ αυτά της μυρικετίνης και του γλυκοζίτη-3 της ισοραμεντόλης φαίνεται ότι απαντούν μόνο στις λευκές ποικιλίες. Στους ερυθρούς οίνους απαντούν στην ποσότητα των 100 mg/L περίπου, ενώ στους λευκούς 1-3 mg/L (Κοτσερίδης, 2006).

Βασική ένωση	Βασικός τύπος	Άγλυκο φαινολικό παράγωγο	Θέση πρόσθετων ομάδων	
			- OH	- OCH ₃
Φλαβονόλες 		Καμπφερόλη	4	
		Κερκετρίνη (3-ραμνοζίτης)	3, 4	
		Μυρικετρίνη (3-ραμνοζίτης)	3, 4, 5	
		Ισοραμεντόλη	4	3

Εικόνα 4. Οι κυριότερες φλαβονόλες (Χαρβαλιά και Μπενά-Τζούρου, 1982)

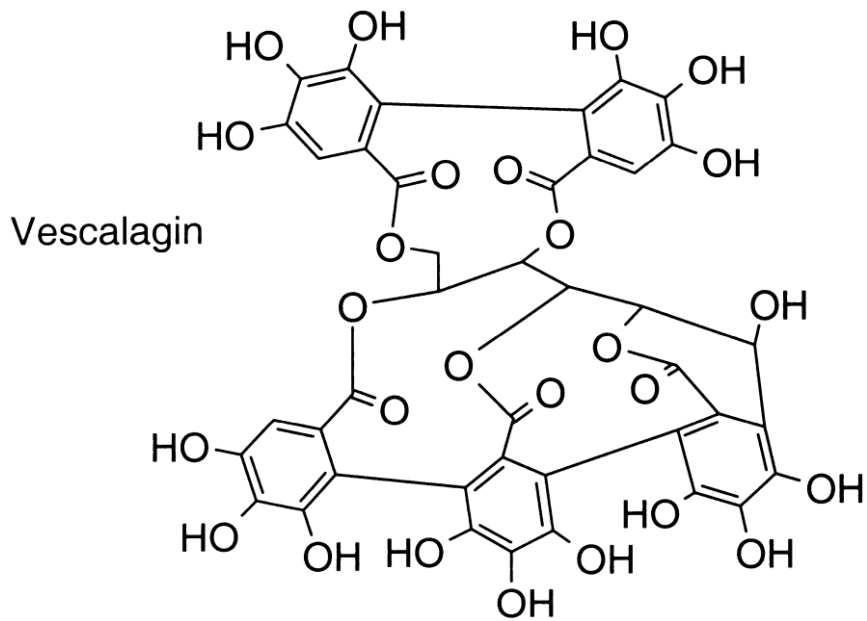
4.5. Ταννίνες

Το όνομά τους προέρχεται από την κελτική λέξη ‘tan’ που σημαίνει βελανιδιά, στα φύλλα της οποίας σχηματίζονται μεγάλες ποσότητες των ουσιών αυτών. Οι ενώσεις αυτές δεν παρουσιάζουν καμία ομοιομορφία στη χημική τους δομή και για αυτό προσπάθειες που έγιναν για να δοθεί συγκεκριμένος ορισμός απέτυχαν. Έτσι, για να οριστούν οι ταννίνες γίνεται χρήση των ιδιοτήτων τους, οι οποίες συνίστανται στο να συνενώνονται με τις πρωτεΐνες ή άλλα πολυμερή – όπως οι πολυσακχαρίτες – σχηματίζοντας αδιάλυτες ενώσεις (Σουφλερός, 2012). Οι ταννίνες απαντούν σε διάφορα είδη φυτών. Η σύνθεσή τους είναι εντονότερη μετά από κάποιο τραυματισμό του φυτικού ιστού, όπου καταστρέφονται τα κύτταρα και η υπάρχουσα διαμερισματοποίηση τους. Λόγω αυτής της καταστροφής, οι πολυφαινολικές οξειδάσες έρχονται σε επαφή με τα φαινολικά υποστρώματα όπως το γαλλικό οξύ, το χλωρογενικό οξύ, το καφεϊκό οξύ και τα φλαβονοειδή. Η οξείδωση των φαινολικών ενώσεων από τις πολυφαινολικές οξειδάσες παράγει κινόνες, οι οποίες

πολυμερίζονται και σχηματίζουν ταννίνες. Οι τελευταίες θεωρούνται προστατευτικές ουσίες απέναντι στην προσβολή των φυτών από μικροοργανισμούς. Από χημική άποψη, οι ταννίνες είναι μεγαλομόρια με φαινολικό δακτύλιο, που προκύπτουν από τον πολυμερισμό στοιχειωδών μορίων με φαινολική ομάδα. Είναι ουσίες ικανές να δώσουν σταθερές ενώσεις με πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες. Για να δώσουν σταθερές ενώσεις με τις πρωτεΐνες πρέπει να είναι ογκώδεις, αλλά όχι υπερβολικά διότι στην περίπτωση αυτή ενδέχεται να μη μπορούν να ενωθούν με τις δραστικές θέσεις των πρωτεϊνών. Τα M.B. των δραστικών ταννινών κυμαίνονται από 600 έως 3.500 (Ribéreau-Gayon et al., 2000, Κοτσερίδης, 2005). Ανάλογα με τη φύση της βασικής μονάδας, οι ταννίνες διακρίνονται σε συμπυκνωμένες (ή ταννίνες της κατεχίνης) και σε υδρολυόμενες (ή ταννίνες του γαλλικού οξέος). Η μεγάλη διαφοροποίηση στη δομή των ενώσεων – διμερείς, τριμερείς, ολιγομερείς, συμπυκνωμένες – εξηγεί την παρουσία, στις σταφυλές των διαφόρων ποικιλιών και στους αντίστοιχους οίνους, ταννινών με διαφορετικές ιδιότητες, ιδίως γευστικές. Η θέρμανση των ταννινών σε όξινο περιβάλλον οδηγεί στο σχηματισμό κυρίως ερυθρής κυανιδίνης, αποδίδοντάς τους τον όρο προκυανιδίνες (Κοτσερίδης, 2005).

4.6. Υδρολυόμενες ταννίνες

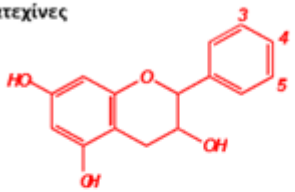
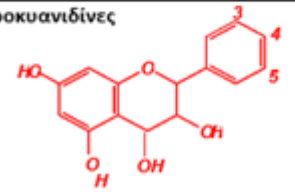
Οι ταννίνες της φύσης διακρίνονται στις υδρολυόμενες και τις συμπυκνωμένες, οι οποίες περιλαμβάνουν τις ταννίνες των οίνων. Αποτελούνται από ένα μόριο σακχάρου, κυρίως γλυκόζης, ή ένα μόριο πολυσακχαρίτη, του οποίου πολλά –OH είναι εστεροποιημένα με διάφορα φαινολοξέα, εκ των οποίων σημαντικότερα είναι το γαλλικό, το διγαλλικό και το ελλαγικό. Τέτοιες ταννίνες αφθονούν στο ξύλο της δρυός, οπότε οι οίνοι που παλαιώθηκαν σε ξύλινα βαρέλια περιέχουν διάφορες μικροποσότητες γαλλικού και ελλαγικού οξέος που είναι προϊόντα υδρόλυσης των ταννινών του ξύλου (Κουράκου, 1998). Αναφέρονται συχνά και σαν γαλλοταννίνες ή ελλαγικές ταννίνες (Εικόνα 5). Τα μόρια αυτά είναι υδατοδιαλυτά και καθιζάνουν γρήγορα σε μέσα τα οποία περιέχουν αλκοόλη όπως είναι οι οίνοι και τα μπράντυ (Moutounet et al., 1989). Παίζουν ιδιαίτερο ρόλο στην παλαιώση των ερυθρών και λευκών οίνων σε δρύινα βαρέλια, εξαιτίας της οξειδωσιμότητάς τους (Vivas and Glories, 1993, 1996) και των ιδιοτήτων της γεύσης τους (Pocock et al., 1994). Η σύσταση του ελλαγιταννικού περιεχομένου του ξύλου της δρυός εξαρτάται από το είδος της. Τέσσερις μονομερείς και τέσσερις διμερείς ελλαγιταννίνες (ρομπουρίνη Α, Β, C και D) απαντώνται στις ευρωπαϊκές δρυς, ενώ οι αμερικάνικες έχουν μόνο διμερείς. Εκτός από τις ταννίνες που προέρχονται από τα δρύινα βαρέλια, υδρολυόμενες είναι και οι οινολογικές ταννίνες που χρησιμοποιούνται για τη διαύγαση του οίνου. Οπότε σε οίνους που έχουν υποστεί κολλάρισμα με προσθήκη ταννίνης, βρίσκονται και υδρολυόμενες ταννίνες, εκτός από τις συμπυκνωμένες, που είναι φυσικά συστατικά του. Το ελλαγικό οξύ που βρίσκεται στους οίνους προέρχεται πάντα από το ξύλο ή την προσθήκη οινολογικής ταννίνης, ενώ το γαλλικό, επειδή υπάρχει στους φλοιούς και στα γίγαρτα, είναι πάντα παρόν (Ribéreau-Gayon, et al., 2006, Matejicek, et al., 2005).



Εικόνα 5. Ελλαγική ταννίνη από ξύλο δρυός (Waterhouse A. L., 2002)

4.7. Προκυανιδίνες

Οι προκυανιδίνες (Εικόνα 7) απαντούν στους φλοιούς, κυρίως όμως στα γίγαρτα των ραγών της σταφυλής. Από έρευνες που έγιναν σχετικά με την παρουσία των προκυανιδινών σε σταφυλές, διαπιστώθηκε ότι απαντώνται κατά μεγάλο ποσοστό στα γίγαρτα και το οποίο κατά μέσο όρο αγγίζει το 56%. Στους βοστρύχους και τους φλοιούς, οι εν λόγω ουσίες απαντώνται σε μικρότερο ποσοστό περί το 20%, ενώ ο χυμός είναι απαλλαγμένος αυτών των ουσιών. Δεν έχουν τη μορφή γλυκοζιτών, ενώ έχουν τη δυνατότητα να ενωθούν με πολυσακχαρίτες της σταφυλής και να εκχυλιστούν ως σύμπλοκα κατά την οινοποίηση (Ribéreau-Gayon, 2000). Λαμβάνοντας υπόψη τα συμπεράσματα των ερευνητικών εργασιών προκύπτει ότι, τελικά, οι ουσίες που διαμορφώνουν τη δομή και το «σώμα» των ερυθρών οίνων και καθορίζουν την αντοχή τους στο χρόνο, βρίσκονται στα γίγαρτα (Κουράκου, 1998).

Βασική ένωση	Βασικός τύπος	Άγλυκο φαινολικό παράγωγο	Θέση πρόσθετων ομάδων	
			-OH	-OCH ₃
Κατεχίνες 	Κατεχίνη	3, 4		
	Γαλλοκατεχίνη	3, 4, 5		
Προκυανιδίνες 	Προκυανιδίνη	3, 4		
	Προδελφινιδίνη	3, 4, 5		
	Προμαλβιδίνη	4	3, 5	
	Προπετουινιδίνη	4, 5	3	

Εικόνα 6. Οι κυριότερες κατεχίνες και προκυανιδίνες (Χαρβαλιά και Μπενά-Τζούρου, 1982)

5. Αντίδραση Maillard

Το φαγητό και το κρασί συνδυάζονται με ιδανικό τρόπο κυρίως λόγω της αντίθεσης μεταξύ της γεύσης του κρέατος και του φρουτώδη χαρακτήρα του οίνου και του τρόπου με τον οποίο το λίπος του κρέατος μαλακώνει τις ταννίνες του. Επίσης μοιράζονται έναν αριθμό κοινών αρωματικών συστατικών που προέρχονται από την αντίδραση Maillard (Charest, 2015). Η αντίδραση Maillard μεταξύ σακχάρων και αμινοξέων ή άλλων ουσιών που έχουν ως αποτέλεσμα την αμαύρωση με διάφορες μορφές, και κυρίως την καραμελοποίηση και την πυρόλυση. Η καραμελοποίηση και η πυρόλυση είναι υπεύθυνες για το χαρακτηριστικό και επιθυμητό χρώμα και άρωμα της κόρας του ψωμιού, του κέικ, του καβουρδισμένου καφέ ή των ξηρών καρπών, αλλά και των ψημένων και γενικά μαγειρεμένων φαγητών π.χ. ψητό κρέας. Στις έρευνες της η Stéphanie Marchand παρατήρησε ότι πολλοί οίνοι περιέχουν παρόμοια αρωματικά συστατικά, τα οποία οδηγούν σε άρωμα καφέ, ψημένου άρτου κ.τ.λ. Η παρουσία αυτών των ενώσεων δημιούργησε ένα μεγάλο ερώτημα, καθώς η αντίδραση Maillard λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασίες άνω των 150 °C και σε ξηρές συνθήκες. Η Marchand αντιλήφθηκε ότι η αντίδραση πραγματοποιείται σε δύο βήματα. Στο πρώτο βήμα τα σάκχαρα μετατρέπονται σε συγγενέων συστατικά που ονομάζονται καρβονύλια και αυτά με τη σειρά τους αντιδρούν με άλλα συστατικά όπως πεπτίδια και αμινοξέα για να σχηματίσουν ετεροκυκλικές ενώσεις. Στον οίνο τα καρβονύλια είναι υποπροϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης και ιδιαίτερα της μηλογαλακτικής ζύμωσης, κάτι που σημαίνει ότι οι απαραίτητες πρόδρομες ουσίες είναι παρόν για την έναρξη του δεύτερου βήματος. Με την πάροδο του χρόνου η

αντίδραση Maillard γίνεται μέρος των πολύπλοκων χημικών διεργασιών που βοηθούν στην ανάπτυξη του μπουκέτου παλαίωσης των παλαιών οίνων.

Όντως, σε μια εργασία της Ana Maria Monforte, όσον αφορά τις ετεροκυκλικές ενώσεις, αναφέρει ότι υπάρχει μια σύνδεση μεταξύ της αντίδρασης Maillard και της οξείδωσης κατά τη παλαίωση. Στην έρευνα της περιγράφει το σχηματισμό μιας συγκεκριμένης ετεροκυκλικής ένωσης (sotolon), που δίνει τα αρώματα των οίνων τύπου μαδέιρα της Πορτογαλίας καθώς και νότες κάρυ. Συνδέθηκε με παράγοντες όπως η θερμοκρασία και η έκθεση στο οξυγόνο και ιδιαίτερα σε οξειδωτικές συνθήκες παλαίωσης σε βαρέλια που οδηγούν στο σχηματισμό της ένωσης σολοτόνης (soloton), σε αντίθεση με την ωρίμαση στη φιάλη, στο ίδιο χρονικό διάστημα. Γενικά, η ακριβής σχέση μεταξύ του σχηματισμού των ετεροκυκλικών ενώσεων που σχηματίζονται κατά την αντίδραση Maillard και της παρουσίας οξυγόνου στον οίνο δεν είναι ξεκάθαρη.

5.1. Μηχανισμοί οξειδωτικής αμαύρωσης

Σύμφωνα με τα προαναφερθέντα, οι φαινόλες, ειδικά οι ο-διφαινόλες είναι οι κυρίως υπεύθυνες για την οξειδωτική αμαύρωση του οίνου. **Οι αντιδράσεις αμαύρωσης** μπορεί να είναι ενζυματικής ή μη-ενζυματικής (χημικής) φύσεως. Το καφέτιασμα συνήθως ξεκινά από τα αρχικά στάδια οινοποίησης από ενζυματικές αντιδράσεις όπου υδροξυκιναμικοί εστέρες παίζουν σημαντικό ρόλο. Μετά την ζύμωση, μη-ενζυματική οξείδωση μπορεί να συμβεί καταλήγοντας στην εμφάνιση ενός περισσότερο ή λιγότερου έντονου καφέ χρώματος (Καλλίθρακα, 2008).

5.2. Ενζυματικής φύσεως οξειδώσεις

Η οξείδωση του γλεύκους και του οίνου από το οξυγόνο του αέρα, επιταχύνεται πάρα πολύ από την παρουσία οξειδασών. Η οξυγονο-τρανσφερασες (οξειδάσες) είναι ένζυμα, τα οποία καταλύουν την μεταφορά του οξυγόνου σε ένα υπόστρωμα. Στην περίπτωση του σταφυλιού το υπόστρωμα είναι οι διάφορες φαινόλες του γλεύκους.

Φαινόλες + Οξυγόνο = προϊόντα οξείδωσης

Οι κυριότερες οξειδάσες που απαντούν στα γλεύκη και στην σταφυλόμαζα είναι οι πολυφαινολοξειδάσες (ένζυμα), οι οποίες χαρακτηρίζονται από την παρουσία χαλκού ενωμένου στο πρωτεϊνικό μόριο, το αποένζυμο. Τα ένζυμα αυτά, που προκαλούν την οξείδωση των φαινολικών παραγώγων, συνηθίζεται να διαιρούνται σε δύο κατηγορίες:

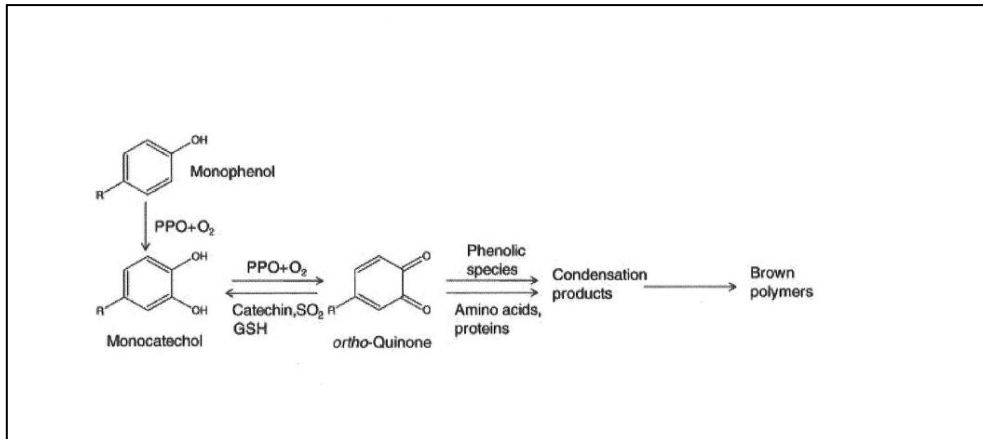
1. Ένζυμα τύπου **λακκάσης** (π- διφαινολοξειδάση)
2. Ένζυμα τύπου **τυροσινάσης** (ο- διφαινολοξειδάση)

Η λακκάση παράγεται από τον μύκητα *Botrytis cinerea*, ο οποίος είναι ένας ιδιαίτερα διαδεδομένος στον κόσμο μικροοργανισμός (Galet, 1997). Η δράση του συνίσταται στην καταστροφή και νέκρωση των ιστών του φυτού που προσβάλλει. Η παρουσία νερού πάνω στον φυτικό ιστό και θερμοκρασία 18 °C αποτελούν ιδανικές συνθήκες ανάπτυξής του. Ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα που προκαλεί είναι η οξείδωση των φαινολικών ουσιών. Η αντίδραση αυτή συμβαίνει λόγω μιας

καφεϊκού και τρυγικού οξέος οξειδώνεται στην αντίστοιχη κινόνη από την τυροσινάση, η GSH θα αντιδράσει γρήγορα με την κινόνη, σχηματίζοντας έτσι ένα άχρωμο προϊόν το επονομαζόμενο **grape reaction product** (GRP; 2-S- glutathionyl caftaric acid), το οποίο δεν αποτελεί πλέον υπόστρωμα για περαιτέρω οξείδωση από την τυροσινάση (Oliveira, et al 2011). Άρα ο σχηματισμός αυτού του προϊόντος θεωρείται ότι περιορίζει το καφέτιασμα του μούστου και εξαρτάται από τα σχετικά ποσοστά της GSH. Αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν σε παλαιωμένους οίνους έδειξαν ότι το GRP υδρολύεται σταδιακά σε παράγωγο του GSH- καφεϊκού οξέος (ο τρυγικός εστέρας υδρολύεται) (Chenyier, et al., 1986). Φαίνεται ότι οι υδροξυκινναμωμικές ουσίες αντιδρούν με φλαβαν-3όλες προς σχηματισμό έγχρωμων προϊόντων (Chenyier, et al., 1995, Chenyier, 1991).

Το διοξειδίο του θείου αναχαιτίζει την δράση της τυροσινάσης (Dybernet and Ribereau- Gayon, 1973) και εμποδίζει την παραγωγή του GRP. Έτσι διατηρούνται σε υψηλά επίπεδα τα ελεύθερα υδροξυκινναμωμικά με μεγάλο δυναμικό αμαύρωσης. Επιπλέον, σε αντίθεση με την τυροσινάση, η λακκάση καθίσταται πρόθυμη για οξείδωση του GRP. Παρατηρήθηκε ότι το GRP οξειδώνεται από την λακκάση, στην αντίστοιχη ορθο-κινόνη με αντικαταστάτη της τελευταίας από γλουταθειόνη. Όταν δεν υπάρχει διαθέσιμη γλουταθειόνη, ο πολυμερισμός των κινονών οδηγεί στο καφέτιασμα (αμαύρωση) του χυμού (Salgues et al., 1986). Έχει αποδειχθεί ότι η τυροσινάση είναι πιο ευαίσθητη στο SO₂ σε αντίθεση με την λακκάση, η οποία έχει και μεγαλύτερο φάσμα υποστρώματος οξείδωσης (Κουράκου-Δραγώνα, 2000). Γενικά, δεν είναι επιζήμια η όλη διαδικασία ενζυματικής αμαύρωσης που συμβαίνει στο λευκό μούστο. Η υπεροξυγόνωση του γλεύκους μειώνει το δυναμικό αμαύρωσης του οίνου με δύο τρόπους: με την εξαφάνιση της τυροσινάσης και την εξάντληση των οξειδώσιμων πολυφαινόλων κατά την διάρκεια των αντιδράσεων οξείδωσης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, οίνοι με χαμηλές συγκεντρώσεις πολυφαινόλων και υψηλό περιεχόμενο GRP να είναι πιο σταθεροί σε σχέση με εκείνους που παράγονται από μη-οξειδωμένο χυμό, στους οποίους υψηλές περιεκτικότητες πολυφαινόλων διατηρούνται με μεγάλο δυναμικό αμαύρωσης (Li, et al., 2008).

Αρχικά η υδροξυλίωση των μονοφαινόλων σε ο-διφαινόλες και των διαφαινόλων σε ο-κινόνες συμβαίνει με γρήγορες συζευγμένες οξειδώσεις των κινονών με ένα άλλο μόριο φαινόλης καταλήγοντας στον σχηματισμό διμερών ή την αναγέννηση των αρχικών φαινόλων (Εικόνα 7). Κατόπιν οι παραχθείσες κινόνες μπορούν επίσης να πολυμεριστούν και να συμπυκνωθούν με άλλες ενώσεις (συμπεριλαμβανομένων φαινολικών ειδών και μη) και τελικά να σχηματίσουν καφέ χρωστικές ουσίες, κάτι το οποίο επιταχύνεται σε υψηλότερα pH (Robards, et al. 1999; Wang, 1990).

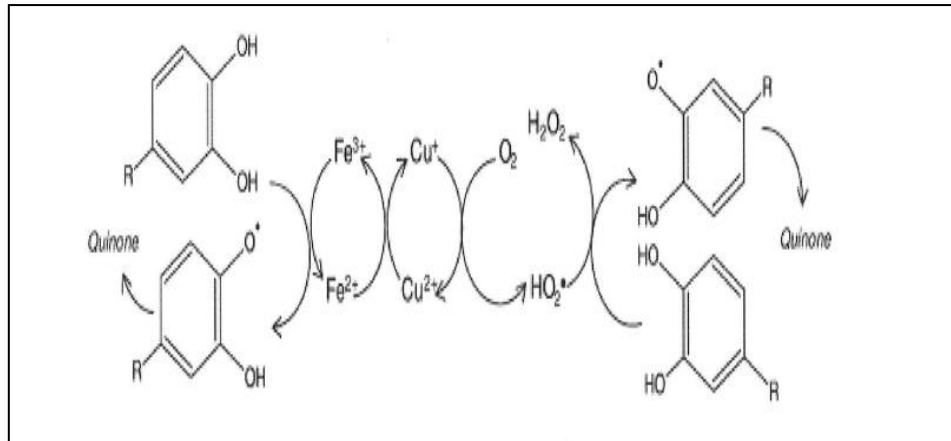


Εικόνα 7. Διαδικασία ενζυματικής αμαύρωσης στην σταφυλόμαζα.

5.3. Μη ενζυμικής φύσεως οξειδώσεις

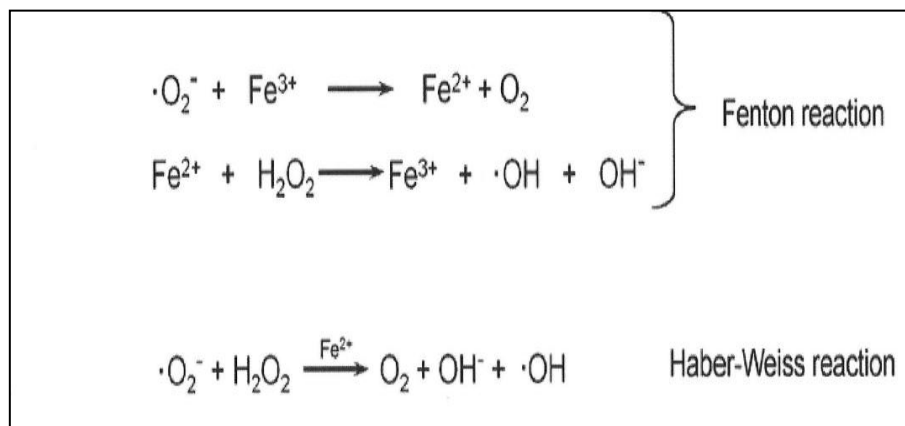
Κατά την διάρκεια της μη-ενζυματικής οξείδωσης, καλούμενη και ως χημική οξείδωση, η οξειδωτική διαδικασία ευνοείται από την οξείδωση φαινολών οι οποίες περιέχουν ένα ορθο-διυδροξυβενζολικό (δακτύλιος κατεχόλης) ή ένα 1,2,3, τριυδροξυβενζολικό τμήμα, όπως η (+) κατεχίνη/(-)–επικατεχίνη, γαλλοκατεχίνη, το γαλλικό οξύ και τους εστέρες του και το καφεϊκό οξύ, τα οποία είναι τα πιο ευαίσθητα στοιχεία του οίνου για οξείδωση. (Singleton, 1987, Waterhouse, 2001, Li, et al., 2007). Αυτά τα υποστρώματα οξειδώνονται σε αλληλουχία, σε ρίζες ημικινόνων και βενζοκινόνων ενώ το οξυγόνο μετατρέπεται σε υπεροξειδίο του υδρογόνου (Εικόνα 8) και η όλη διαδικασία προωθείται από τον οξειδοαναγωγικό κύκλο του Fe^{3+}/Fe^{2+} και Cu^{2+}/Cu^{+} (Εικόνα 8). Άλλες ενώσεις με πιο απομονωμένες φαινολικές ομάδες, όπως η μαλβιδίνη, η κύρια χρωστική ανθοκυάνη στους ερυθρούς, το p–κουμαρικό οξύ οξειδώνονται σε υψηλότερα δυναμικά. Οι κινόνες που σχηματίζονται μέσω της οξείδωσης των πολυφαινολών, όντας αρχικά προϊόντα, είναι ασταθείς και μπορούν να υποβληθούν σε περαιτέρω αντιδράσεις. Μπορούν αυθόρμητα αν συνδυαστούν με πυρηνόφιλες ενώσεις εξαιτίας του υψηλού ηλεκτρονιόφιλου χαρακτήρα τους. Επιπλέον τα παραγόμενα διμερή ή πολυμερή σε συζευγμένες αντιδράσεις οξείδωσης έχουν χαμηλότερο οξειδοαναγωγικό δυναμικό σε σχέση με τις αρχικές τους φαινόλες και οξειδώνονται πολύ πιο εύκολα. Συνεπώς, θεωρείται ότι η οξείδωση αυτών των προϊόντων καταλήγει στην επιτάχυνση της διαδικασίας πολυμερισμού.

Οι αντιδράσεις αυτές χαρακτηρίζονται από την αλλαγή της κατάστασης οξείδωσης των αντιδρώντων (Εικόνα 8). Κατά τις αντιδράσεις αυτές υπεισέρχεται μεταφορά ηλεκτρονίων από το ένα αντιδρών στο άλλο. Η ενεργότητα του H^{+} χρησιμοποιείται για να χαρακτηριστεί το υγρό όξινο ή βασικό και η ενεργότητα του e^{-} χρησιμοποιείται για να χαρακτηριστεί το υγρό όξινο ή αναγωγικό.



Εικόνα 8. Καταλυτική δράση ιόντων σιδηρού και χαλκού κατά την οξείδωση των κατεχολών προς σχηματισμό κινονών και υπεροξειδίου του υδρογόνου (Danilewicz, et al., 2008)

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε συνδυασμό με τον δισθενή σίδηρο σχηματίζουν ρίζες υδροξυλίου (HO), μια αντίδραση που είναι γνωστή ως **αντίδραση Fenton** (Εικόνα 9). Η ρίζα υδροξυλίου είναι ένα προϊόν μετατροπής του οξυγόνου το οποίο έχει την ικανότητα να οξειδώνει σχεδόν οποιοδήποτε οργανικό μόριο βρίσκεται στον οίνο (Waterhouse and Laurie, 2006). Επίσης, εξαιτίας της μεγάλης δραστηριότητας που το διακρίνει, αντιδρά με τα πρώτα μόρια που θα συναντήσει, ανάλογα με την συγκέντρωσή τους, όπως είναι η αιθανόλη, το τρυγικό οξύ, η γλυκερόλη, τα σάκχαρα και οργανικά οξέα. Η Fenton οξείδωση της αιθανόλης και του τρυγικού οξέος οδηγεί στον σχηματισμό ακεταλδεΐδης και γλυοξυλικού οξέος αντίστοιχα (Danilewicz, Singleton, 2000)



Εικόνα 9. Αντίδραση Fenton

Οι επιστήμονες κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το οξυγόνο δεν αντιδρά άμεσα με τα φαινολικά παράγωγα χωρίς την παρουσία μεταβατικών μεταλλικών ιόντων. Εξάλλου έχει παρατηρηθεί στην διαδικασία της οξείδωσης η μεσολάβηση ιόντων σιδήρου, χαλκού και μαγνησίου. Για παράδειγμα, παρουσία μεταλλικών ιόντων το υπεροξείδιο υδρογόνου οξειδώνει την αιθανόλη και το (+)-τρυγικό οξύ αυξάνοντας τα επίπεδα της ακεταλδεΐδης και γλυοξυλικού οξέος αντίστοιχα (Waterhouse and Laurie, 2006; Es-Safi, et al, 2006). Άλλες καρβονυλικές ομάδες που παράγονται κατά την διάρκεια της

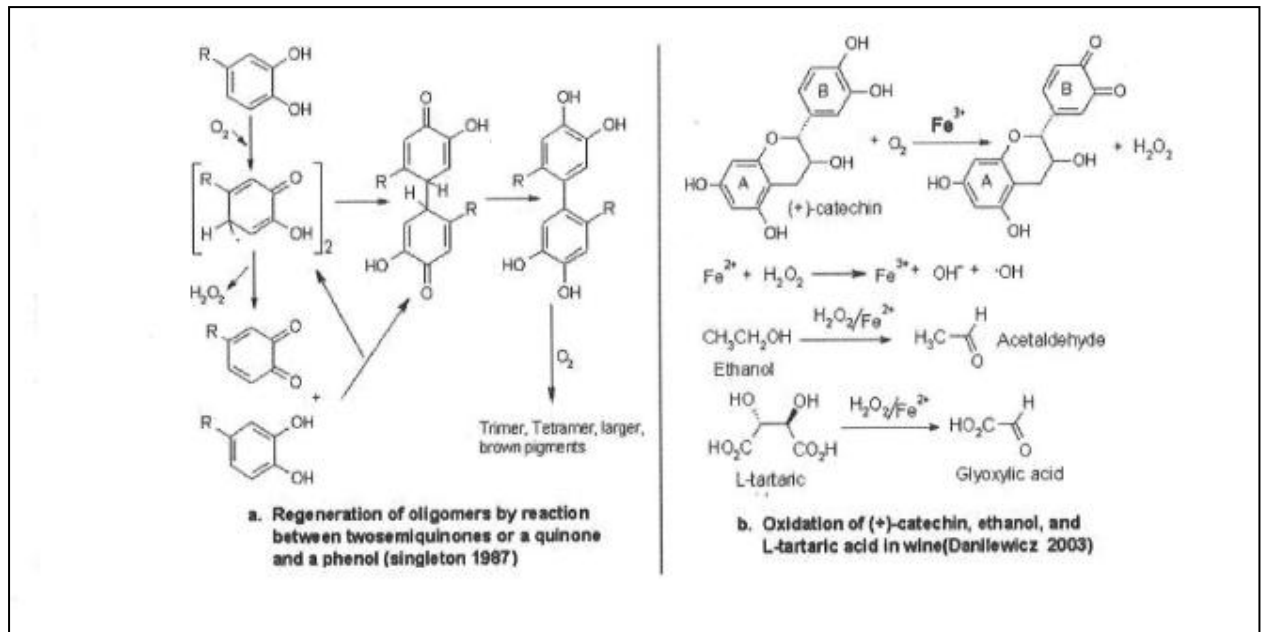
ζύμωσης (πυροσταφυλικό οξύ, 2-3 βουτανοδιόνη κ.α.) μπορεί επίσης να δρουν ως συνδετικά μόρια. Τέλος, η παρουσία κάποιων τεχνολογικών προσθέσεων και συμπληρωμάτων όπως το διοξείδιο του θείου και ασκορβικό οξύ παίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο (ή την ανάπτυξη) του φαινομένου του καφετιάσματος (αμαύρωση).

5.4. Συμμετοχή των Ιόντων Σιδήρου και Χαλκού κατά την Χημική Οξείδωση του οίνου

Στον οίνο, ιόντα σαν το σίδηρο και το χαλκό ανευρίσκονται σε υψηλά ποσοστά, λόγω της επιμόλυνσης που συμβαίνει σε αυτόν σε μεγάλο βαθμό από τα μηχανήματα που λαμβάνουν μέρος στην διαδικασία οινοποίησης. Βέβαια, με την αυξανόμενη χρήση των μονάδων από ανοξείδωτο χάλυβα, τα επίπεδα ιόντων αυτών έχουν μειωθεί αισθητά, με συγκεντρώσεις που κατά μέσον όρο δεν ξεπερνούν τα 0-5 mg/L και 0,1-0,3 mg/L για τον σίδηρο και τον χαλκό αντίστοιχα. Παρά το γεγονός ότι βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις, μπορούν να προκαλέσουν οξειδωτική αλλοίωση. Πέρα από τις συγκεντρώσεις τους, οι παρούσες μορφές και οι προδιαγραφές του χαλκού και του σιδήρου στον οίνο είναι οι πιο πιθανοί παράγοντες που οδηγούν στην αμαύρωση του (Scollary, 2002). Ο τρισθενής σίδηρος (Fe^{3+}) που υπάρχει στον οίνο δεν βρίσκεται σε ελεύθερη μορφή, αλλά συνδεδεμένος με άλλες ενώσεις, ενώ ο δισθενής μπορεί επίσης να σχηματίζει σύμπλοκα, με την διαφορά ότι τα τελευταία ιονίζονται πιο εύκολα (Hua Li, et al., 2008). Το γεγονός, ότι το μεγαλύτερο ποσοστό του σιδήρου είναι δεσμευμένο, είναι κάτι το πολύ σημαντικό στην κατανομή.

Η συμπλοκοποίηση μειώνει το pH του συστήματος, λόγω της ελευθέρωσης υδρογόνου-ιόντος (H^+) η οποία ευνοείται σε υψηλό pH και έτσι το δυναμικό αναγωγής του ζεύγους $Fe^{3+} - Fe^{2+}$ μειώνεται (Yang, et al, 2003). Υπό κανονικές συνθήκες, από την μία πλευρά οι φαινόλες είναι ασταθείς και πιο ευαίσθητες στην οξείδωση σχηματίζοντας κινόνες με απώλεια του υδροξυβενζοϊκού υποκαταστάτη, από την άλλη τα ιόντα σιδήρου σχηματίζουν σε μεγάλο ποσοστό υδροξείδιο τρισθενούς που καθιζάνει μέσω αντιδράσεων υδρόλυσης κατά τις οποίες σπάει η σύνδεση του με το σύμπλοκο.

Καθώς κάποιες φαινόλες δημιουργούν σύμπλοκο με τον τρισθενή σίδηρο, συμβαίνουν επίσης οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις. Οι φαινόλες οξειδώνονται προς τις αντίστοιχες κινόνες και ο τρισθενής σίδηρος μετατρέπεται σε δισθενή (Εικόνα 10). Όσο μικρότερη είναι η τιμή του pH του συστήματος τόσο μεγαλύτερη είναι η δύναμη της αναγωγής των φαινολών (Danilewicz, 2003, Moran et al., 1997, Yang et al., 2003). Άρα η συμπλοκοποίηση μειώνει σε κάποιο βαθμό, το δυναμικό των ιόντων σιδήρου, σταθεροποιεί την κατάσταση οξείδωσης του Fe^{3+} και αυξάνει την δύναμη της αναγωγής του Fe^{2+} , κάτι το οποίο αποδεικνύει ότι οι οργανικοί υποκαταστάτες που υπάρχουν στον οίνο διασφαλίζουν την γρήγορη οξείδωση του Fe^{2+} . Συνεπώς, παρουσία οξυγόνου, αυτό μετατρέπεται σε υπεροξείδιο του υδρογόνου και ο Fe^{3+}/Fe^{2+} ή την ευκινησία του σιδήρου στην διαδικασία οξείδωσης.



Εικόνα 10. Αντιδράσεις χημικής οξείδωσης στο κρασί

5.5. Άλλοι Πιθανοί Μηχανισμοί Χημικής Αμαύρωσης

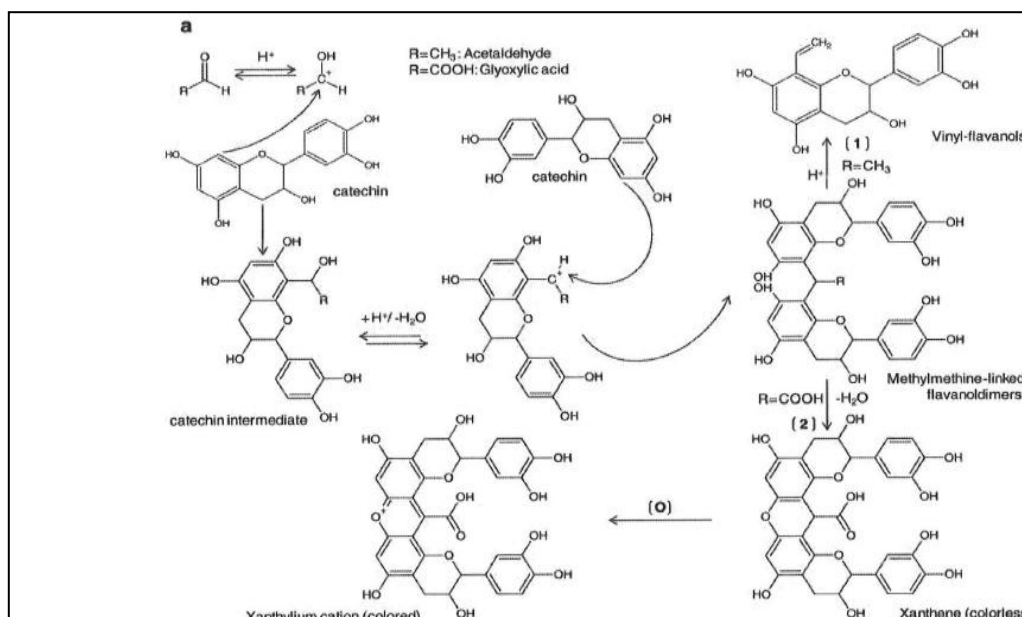
5.5.1. Ακεταλδεΐδη

Η ακεταλδεΐδη χαρακτηρίζεται από μια δυσάρεστη γεύση η οποία προσδίδει πικράδα στον οίνο. Στην περίπτωση που τα επίπεδα συγκέντρωσης της ξεπερνούν τα 50 mg/L στον επιτραπέζιο οίνο σημαίνει ότι αυτός έχει οξειδωθεί. Παράγεται κατά την διάρκεια της ζύμωσης μέσω μεταβολισμού των ζυμομυκήτων, μέσω της αιθανόλης, μια αντίδραση που καταλύεται από τα μεταβατικά μέταλλα (Fe, Cu). Ο τελευταίος τρόπος αποτελεί και τον πιο σημαντικό για τους οίνους, ενώ ο πρώτος πραγματοποιείται κυρίως σε ισπανικούς οίνους (sherry wines).

Η αντίδραση μεταξύ της ακεταλδεΐδης και των φαινολών πιστεύεται ότι ξεκινά με την πρωτονίωση της ακεταλδεΐδης σε καρβοκατιόν υπό όξινες συνθήκες ακολουθούμενη από την πυρηνόφιλη προσθήκη της φλαβανόλης στο καρβοκατιόν. Αφού χάσει ένα μόριο νερού, η αιθανόλη (ένωση προσθήκης) σχηματίζει ένα καινούργιο καρβοκατιόν το οποίο αντιδρά με μια δεύτερη πυρηνόφιλη μονάδα φλαβανόλης αποδίδοντας μια διμερή ένωση φλαβανόλης αιθυλίου. Η αντίδραση ξεκινά πάλι από τα νεοσχηματισμένα διμερή καταλήγοντας σε πολυμερή (Fulcrand, Duenas, Salas and Chenyier, 2006). Παρόλο, που οι υπόξανθες χρωστικές ουσίες δεν έχουν παρατηρηθεί όταν η ακεταλδεΐδη αντιδρά με φλαβανόλες, ο πορτοκαλί χρωματισμός του αρχικού διαλύματος είναι χαρακτηριστικός των υπόξανθων χρωμοφόρων.

5.5.2. Γλυοξυλικό οξύ

Το 1996, ο Oszmianski et al., παρατήρησε ότι τα προϊόντα οξείδωσης που προερχόταν ύστερα από την οξείδωση της (+) – κατεχίνης ήταν άχρωμα ή κιτρινωπά, με τις κίτρινες ενώσεις να έχουν μέγιστη απορρόφηση στα 440-460 nm (Fulcrand, Chenyier, 1997). Αμέσως, πραγματοποιήθηκε ανάλυση της δομής αυτών των ουσιών και βρέθηκε ότι ένα δεύτερος τρόπος αμαύρωσης μπορεί να υπάρχει. Παρουσία σιδήρου, η οξείδωση της κατεχίνης δεν πραγματοποιούνταν άμεσα, αλλά μέσω του τρυγικού οξέος το οποίο έδινε το γλυοξυλικό οξύ. Μόλις σχηματιζόταν το γλυοξυλικό οξύ, αντιδρούσε με δύο μονάδες φλαβονόλης με σκοπό την δημιουργία άχρωμου διμερούς. Το άχρωμο διμερές σχηματίζει κιτρινωπές ουσίες μέσω αφυδάτωσης. Με την πάροδο του χρόνου μελέτες επιβεβαίωσαν αυτόν τον τρόπο αμαύρωσης (Εικόνα 11). Κατά την διάρκεια αποθήκευσης και παλαίωσης του οίνου, σε αντίθεση με τις αντιδράσεις που υποκινούνται από την ακεταλδεΐδη όπου η εμπλοκή των φλαβονολών φαίνεται να παίζει καθοριστικό ρόλο στην σταθεροποίηση του χρώματος, οι αντιδράσεις που προκαλούνται από το γλυοξυλικό οξύ είναι οι κύριες υπεύθυνες για τον αποχρωματισμό και τον σχηματισμό κιτρινωπών ενώσεων οι οποίες είναι περισσότερο σημαντικές στην αμαύρωση και στην μείωση της στυπτικότητας απ' ό τι στην σταθεροποίηση του χρώματος.



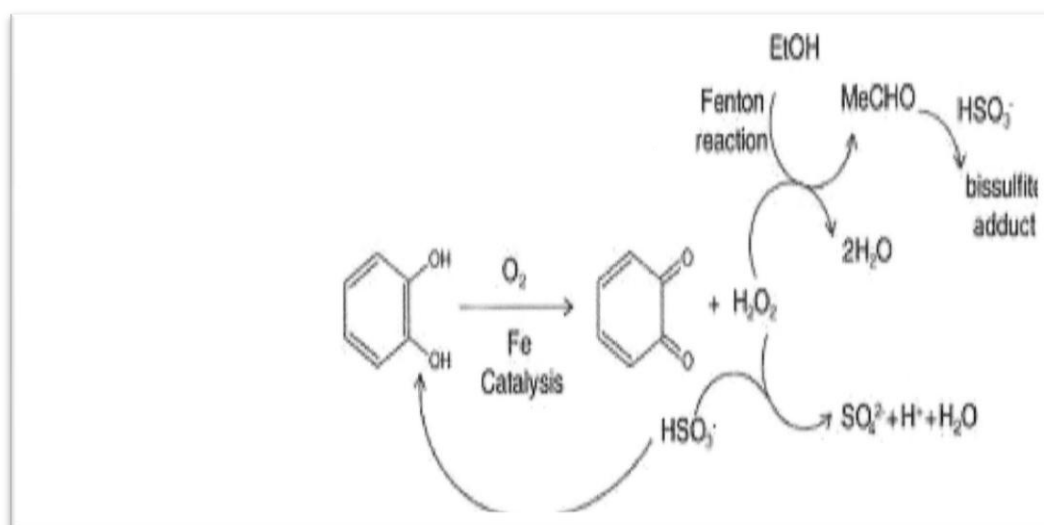
Εικόνα 11. Μηχανισμοί πολυμερισμού των φλαβονολών μέσω ακεταλδεΐδης και γλυοξυλικού οξέος

5.6. Προστασία Γλεύκους και Οίνου Από Τις Οξειδώσεις

Στον λευκό οίνο το οξυγόνο αλλοιώνει το άρωμα, εξαφανίζει τη φρεσκάδα και σκουραίνει το χρώμα. Κατά την διάρκεια της πίεσης των σταφυλιών που έχουν υποστεί έκθλιψη λαμβάνει χώρα απορρόφηση αέρα μεγάλης επιφάνειας επαφής. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, υπεύθυνες για τις οξειδώσεις ενζυματικής φύσεως είναι η τυροσινάση (οξειδωτικό ένζυμο που βρίσκεται στα στερεά μέρη της ράγας) και η λακκάση που υπάρχει στα σταφύλια που έχουν προσβληθεί από φαιά σήψη. Η προστασία του γλεύκους συνίσταται στην καταστροφή των οξειδασών και την αποφυγή των οξειδώσεων. Οι κυριότερες μέθοδοι προστασίας παρουσιάζονται παρακάτω.

5.6.1. Θείωση

Το SO_2 χρησιμοποιείται ευρέως στην οινοποίηση λόγω της αντιμικροβιακής και αντιοξειδωτικής δραστηριότητάς του. Προστατεύει τον οίνο από το καφέτιασμα και ρυθμίζει την ανάπτυξη των ζυμών και βακτηρίων τα οποία ευθύνονται για την αλλοίωση του. Επιπλέον, το διοξείδιο του θείου μπορεί να μειώσει την δυσάρεστη επίδραση των καρβονυλικών συστατικών στο άρωμα αντιδρώντας με αυτά και σχηματίζοντας άοσμα όξινα θειώδη στοιχεία. Λαμβάνοντας υπ' όψιν τον τρόπο δράσης του πιστεύεται ότι η κύρια αντιοξειδωτική του λειτουργία στηρίζεται στην καταστολή του υπεροξειδίου του υδρογόνου το οποίο προέρχεται από την μετατροπή του οξυγόνου, περιορίζοντας έτσι τον σχηματισμό αλδεϋδης (λόγω ανταγωνισμού μεταξύ των για το H_2O_2) και εμποδίζοντας τον σχηματισμό εύκολα οξειδώσιμων συστατικών (Εικόνα 12). Τέλος, μετατρέπει τις σχηματιζόμενες κατά την διάρκεια της οξείδωσης κινόνες στην αρχική τους ο-διαφαινολική μορφή, επαναφέροντας την φαινολική σύσταση του οίνου. Στον οίνο υπάρχουν δύο κλάσματα του διοξειδίου του θείου, το ελεύθερο SO_2 που αναφέρεται στο όξινο θειώδες και το διοξείδιο του θείου, και το συνδεδεμένο κυρίως με ακόρεστες ενώσεις. Η θείωση αποτελεί αρκετά ικανοποιητική λύση στο θέμα προστασίας από τις οξειδώσεις, με την προϋπόθεση της προσθήκης σε σχετικά υψηλές δόσεις (6-12 g/hl) (Chinnici, et al., 2012).



Εικόνα 12. Η αλληλεπίδραση του SO_2 με το H_2O_2 και τις κινόνες ακολουθούμενη από την οξείδωση της κατεχόλης.

5.6.2 Ασκορβικό οξύ

Το ασκορβικό οξύ είναι ένα άλλο πρόσθετο το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως για την αποτροπή της οξειδωσης των λευκών οίνων, κυρίως εξαιτίας της άμεσης αντίδρασης του με το μοριακό οξυγόνο εμποδίζοντας την οξειδωση αυτού με τα φαινολικά συστατικά. Όπως και το SO₂, θεωρείται ότι και αυτό μετατρέπει τις κινόνες σε πρόδρομες κατεχίνες, ακόμα και αν η δραστηριότητα του αυτή πρόσφατα αμφισβητήθηκε. Παρ' όλα αυτά, η οξειδωση του ασκορβικού οξέος σε δευδροασκορβικό οξύ παράγει υπεροξειδίο του υδρογόνου το οποίο με την σειρά του, παρουσία μεταλλικών ιόντων, θα υποκινούσε την οξειδωτική αλλοίωση των οίνων. Έτσι λοιπόν επικρατεί η άποψη ότι το ασκορβικό οξύ αποτελεί επαρκή προστασία ενάντια στην αμαύρωση μόνο εάν κατάλληλη ποσότητα ελεύθερου SO₂ είναι ταυτόχρονα παρούσα με σκοπό την δέσμευση του υπεροξειδίου του υδρογόνου που παράγεται από την οξειδωση του ασκορβικού οξέος. Οι δόσεις που απαιτούνται είναι 10-20g/hl. (Chinnici, et al., 2012).

5.6.3. Απολάσπωση και κατεργασία με μπετονίτη

Η απολάσπωση έχει σκοπό την απομάκρυνση των στερεών σωματιδίων που βρίσκονται στο γλεύκος σε αραίωση και τα οποία είναι ικανά να δώσουν στον οίνο χορτώδη οσμή. Επειδή η τυροσινάση κατά ένα μέρος είναι συνδεδεμένη με τα στερεά σωματίδια (η λακκάση είναι πλήρως διαλυτή) η απολάσπωση αφαιρεί μέρος από τις οξειδάσες, περιορίζοντας έτσι τις οξειδώσεις. Ο μπετονίτης δρα χάρη στην ιδιότητα που έχει να απορροφά τις πρωτεΐνες. Δρα μόνο στο διαλυτό τμήμα της τυροσινάσης. Προσθήκη 100 mg/hl μειώνει την δραστηριότητα κατά 30-40%. Σε συνδυασμό με προσθήκη 80 g/hl θειώδη ανυδρίτη μπορούμε να πετύχουμε ολική παύση της δραστηριότητας της τυροσινάση. Στη λακκάση ο μπετονίτης έχει μικρή μόνο δράση (Κοντός, 1980).

5.6.4. Ψύξη του γλεύκους

Προκαλεί μείωση της ταχύτητας κατανάλωσης του οξυγόνου ελαττώνοντας την ενζυματική δράση. Η γρήγορη ψύξη του γλεύκους παρουσιάζει το πλεονέκτημα να ελαττώνει την ποσότητα του αναγκαίου θειώδη ανυδρίτη. Επιπλέον, η καθυστέρηση έναρξης της αλκοολικής ζύμωσης επιτρέπει το κατακάθισμα της λάσπης κάνοντας την απολάσπωση πιο εύκολη (Κοντός, 1980, Κουράκου-Δραγώνα 1998).

5.6.5. Θέρμανση του γλεύκους

Σε θερμοκρασία μεγαλύτερη από τους 35-40 °C η δραστηριότητα των οξειδασών μειώνεται σημαντικά για να μηδενιστεί στους 65 °C. Γι' αυτό η θέρμανση του γλεύκους αμέσως μετά την έκθλιψη δοκιμάστηκε σαν μέθοδος αποφυγής οξειδώσεων. Η αύξηση όμως των φαινομένων εκχύλισης είναι αρνητική για την ποιότητα του λευκού οίνου (Κουράκου-Δραγώνα 1998). Άλλα αποτελέσματα της θέρμανσης είναι η καλή σταθερότητα του χρώματος, η καταστροφή των ιθαγενών ζυμών που δημιουργεί την ανάγκη προσθήκης και η καταστροφή των πηκτινολυτικών ενζύμων με αποτέλεσμα ο οίνος να διαυγάσει εύκολα.

5.6.6. Προσθήκη PVPP

Η πολυβινυλ-πολύ-πυρολιδόνη (PVPP) είναι μια σκόνη αδιάλυτη στο νερό, στα οξέα, στα αλκάλια και στους οργανικούς διαλύτες και παρασκευάζεται με πολυμερισμό της η βινυλ-πυρολιδόνης. Έχει την ιδιότητα να σταθεροποιεί το χρώμα των λευκών οίνων, απομακρύνοντας το ευοξειδωτο φαινολικό υπόστρωμα. Αυτό γίνεται χάρη στην επιλεκτική απορροφητική δράση έναντι των πολυφαινολών με μικρό μοριακό βάρος. Οδηγεί σε σταθερότητα χρώματος, χωρίς ο οίνος να χάνει την φρεσκάδα του και χωρίς να μεταβάλλονται οι αρωματικοί χαρακτήρες τους. Η ανώτερη επιτρεπόμενη δόση ανέρχεται στα 80g/hl οίνου (Κοντός, 1980, Κουράκου-Δραγώνα 1998).

5.7. Μέθοδοι προσδιορισμού

5.7.1 Η μέθοδος Folin - Ciocalteu (προσδιορισμός ολικών φαινολών)

Οι πολυφαινόλες (φλαβανόλες, φλαβονόλες, ανθοκυανίνες, φαινολικά οξέα, κλπ.) είναι γνωστές ως ενώσεις με υψηλή αντιοξειδωτική δράση λόγω των ακόλουθων χαρακτηριστικών τους όπως η ικανότητα για χύλωση ιόντων μετάλλων, η υψηλή δραστηριότητά τους ως δότες υδρογόνου ή ηλεκτρονίων και το δυναμικό της ρίζας πολυφαινόλης να σταθεροποιήσουν και αποκέντρωση το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο. (Rice-Evans et al., 1997). Η μέθοδος του αντιδραστήριου Folin-Ciocalteu (FC) είναι ένας τρόπος για τον καθορισμό του περιεχομένου ολικών φαινολών. Η αρχή της συνολικής ανιχνεύσεως φαινολών περιλαμβάνει μεταφορές ηλεκτρονίων μεταξύ των φαινολικών ενώσεων (ή άλλα αναγωγικά) και μολυβδαινίου υπό αλκαλικές συνθήκες, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό των μπλε συμπλοκών που μπορούν να ανιχνευθούν φασματοφωτομετρικά στα 725 έως 765 nm. Η ένταση της απορρόφησης του φωτός σε αυτό το μήκος κύματος είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση των φαινολών. Έχει παρατηρηθεί ότι το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu αντικατοπτρίζει πραγματικά την μείωση της ικανότητας ενός δείγματος, αντί για τη μέτρηση της συνολικής ποσότητας των φαινολικών ενώσεων.

Η ευκολία της εκτέλεσης, το χαμηλό κόστος της και ικανοποιητική επαναληψιμότητα είναι τα πιο σημαντικά πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου. Πειράματα έχουν αποδείξει ότι υπό κατάλληλες συνθήκες, η μέθοδος αυτή παράγει μια σταθερή ποσότητα της μπλε χρωστικής η οποία μπορεί να προβλεφθεί από την αντίδραση με τις κατάλληλες γνωστές φαινόλες. Αυτή η δοκιμασία πραγματοποιείται σε υδατικά μέσα, έτσι δεν εφαρμόζεται για τις λιπόφιλες μήτρες/αντιοξειδωτικά. Είναι επίσης γνωστό, και τα πειράματα έχουν αποδείξει, ότι το αντιδραστήριο Folin- Ciocalteu δεν αποτελεί απόλυτη μέτρηση των φαινολικών ενώσεων που υπάρχουν στο δείγμα. Ορισμένες ενώσεις μπορεί επίσης να παρεμβαίνουν με τον προσδιορισμό αυτό, ο οποίος οδηγεί σε υπερεκτίμηση των ολικών φαινολικών ενώσεων (Huang κ.α., 2005). Σύμφωνα με άλλες μελέτες, διάφορες φαινολικές ενώσεις έχουν διαφορετικές αποκρίσεις σε αυτή τη δοκιμασία, ανάλογα με τη θέση και το βαθμό της υδροξυλίωσης. Φυσικά, η τιμή που λαμβάνεται για το TPC του δείγματος εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το πρότυπο που χρησιμοποιείται για την βαθμονόμηση. Εάν κάποιο πρότυπο που έχει υψηλή αντιδραστικότητα, η οποία δίνει μια υψηλή τιμή απορρόφησης, αυτό θα έχει ως αποτέλεσμα τον υπολογισμό των τιμών TCP των

δειγμάτων χαμηλότερα από τα πραγματικά τους. Αυτά τα γεγονότα επιβάλλουν μια προσεκτική απόφαση σχετικά με το καταλληλότερο πρότυπο φαινολικών. (Appel, et al., 2001, Koivikko, 2008).

5.7.2 Η μέθοδος DPPH (2,2-διφαινυλο-1-πικρυλυδραζυλικής ρίζας)

Η μέθοδος DPPH έχει εφαρμοστεί συχνά, λόγω της εύκολης εφαρμογής, της ταχύτητας, της ανέξοδης και ακριβής για την εκτίμησή της ικανότητας των φαινολικών αντιοξειδωτικών να σαρώνουν τις ελεύθερες ρίζες, σε ένα ορισμένο δείγμα (Nenadis and Tsimidou, 2002). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην σταθερή μορφή ελεύθερων ριζών του μορίου του DPPH (2,2-διφαινυλο-1-πικρυλυδραζυλικής ρίζας). Το DPPH παραμένει στη μονομερή του μορφή σε διαλύματα, δεν διμερίζεται, αντιστέκεται στην οξειδωση και παρουσιάζει ένα βαθύ βιολετί χρώμα σε διάλυμα αιθανόλης με μια A (Absorbance) περίπου 520 nm σε μία ευρεία περιοχή του pH λόγω της μετεγκατάστασης των πλεοναζόντων ηλεκτρονίων επί του μορίου ως σύνολο. (Molyneux, 2004, Nenadis and Tsimidou, 2002). Επιπλέον, είναι εμπορικά διαθέσιμο και δεν πρέπει να δημιουργείται αμέσως πριν από τη δοκιμασία. Σε σύγκριση με τις άλλες ελεύθερες ρίζες, όπως υδροξύλιο και ρίζες ανιόντος υπεροξειδίου, η χρήση του σταθερής DPPH ρίζας έχει το πλεονέκτημα ότι δεν επηρεάζεται από ορισμένες πλευρικές αντιδράσεις, όπως αναστολή ενζύμου και αποσιδήρωσης μεταλλικού ιόντος (Wang, 2009).

Τα φαινολικά συστατικά του κρασιού δεσμεύουν την ελεύθερη ρίζα DPPH και η μείωση της ελέγχεται με τη μείωση της απορρόφησης στα 517 nm. Το χρώμα από μωβ στο αρχικό διάλυμα μετατρέπεται σε κίτρινο όταν όλο το ποσό της ελεύθερης ρίζας έχει δεσμευτεί από τα αντιοξειδωτικά του κρασιού.

6. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

6.1. Σκοπός εργασίας

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι ο προσδιορισμός των ποιοτικών χαρακτηριστικών των οίνων με βάση τόσο την αντιοξειδωτική τους δράση όσο και του ολικού φαινολικού περιεχομένου τους.

Μελετήθηκε η κινητική του φαινομένου της οξειδωτικής αμαύρωσης στην ποικιλία Μαλαγουζιά σε οίνους προερχόμενους από διαφορετικά σημεία ενός επιλεγμένου αμπελώνα. Για τον σκοπό αυτό επιλέχθηκε ο αμπελώνας του κτήματος Ρωζάνη Μάτσα, που βρίσκεται στην Κάντζα Αττικής, μια περιοχή γνωστή από το παρελθόν για την καλλιέργεια και την παραγωγή οίνων υψηλής ποιότητας. Ο αγρός χωρίστηκε σε 20 τμήματα και από αυτά επιλέχθηκαν τα 10 για την περαιτέρω μελέτη. Η έρευνα βασίστηκε στην εφαρμογή της μεθόδου της επιταχυνόμενης οξειδωσης στον λευκό οίνο.

6.1.2 Κτήμα Μάτσα στην περιοχή της Κάντζας

Η ονομασία της Κάντζας (το σημερινό χωριό Λεοντάρι της κοινότητας Παλλήνης) ανήκει σε μια περιοχή άγονου ασβεστολιθικού εδάφους κοντά στο Κορωπί, με υψόμετρο 170 μέτρων πάνω από το Αιγαίο. Ίσως η ονομασία δόθηκε στους Καμπάδες ως ένδειξη αναγνώρισης των προσπαθειών τους για το ελληνικό κρασί, εφόσον η έδρα τους και ο ιδιόκτητος αμπελώνας τους βρίσκεται στην Κάντζα εδώ κι έναν αιώνα (Lambert, 2008)

Το κτήμα Μάτσα είναι ένας ιστορικός αμπελώνας 122 στρεμμάτων, που καλλιεργείται από τα τέλη του 19ου αιώνα. Με τη συνεργασία της εταιρείας Μπουτάρη, τη συνέχιση αυτής της παράδοσης έχει αναλάβει η Ρωξάνη Μάτσα, μια αυθεντική αμπελοκαλλιεργήτρια, Οινική Προσωπικότητα της Ένωσης Ελλήνων Δημοσιογράφων Οίνου για το 2001.

Σήμερα το κτήμα αποτελείται από ένα ξεχωριστό οινοποιείο με ένα μοναδικό οίκημα που πρόσφατα αναπαλαιώθηκε και αποτελεί το σπίτι της Ρωξάνης Μάτσα. Η ζωή μέσα στο κτήμα της δίνει τη χαρά της καθημερινής φροντίδας του αμπελώνα, των κρασιών και την ενεργή συμμετοχή σε όλη της διαδικασία παραγωγής και οινοποίησης βάζοντας έτσι την προσωπική της σφραγίδα (www.boutari.gr).

6.1.3. Μαλαγουζιά

Η Μαλαγουζιά θα μπορούσε να χαρακτηριστεί η ποικιλία-πεμπουσία της αναγέννησης που έχουν σημειώσει τα σύγχρονα ελληνικά κρασιά, όπως διαπιστώνεται τα τελευταία είκοσι χρόνια. Είναι η σχηματοποίηση του τρόπου με τον οποίο οι Έλληνες οινοπαραγωγοί ανακαλύπτουν ξανά το δυναμικό της.

Στη δεκαετία του 1970, η Μαλαγουζιά θεωρείτο εξαφανισμένη και την ήξεραν ελάχιστοι. Σήμερα, μετά από επίπονη εργασία πανεπιστημιακών καθηγητών, κορυφαίων καλλιεργητών και οινολόγων, η μαλαγουζιά θεωρείται ευρέως ως σταφύλι παγκόσμιας εμβέλειας, που δίνει έξοχους λευκούς οίνους. Η μαλαγουζιά δίνει οίνους με μέτρια απαλό κιτρινοπράσινο χρώμα και πολύ έντονη, εξαιρετικά εκφραστική μύτη, με νύξεις ροδάκινου, πράσινης πιπεριάς, βασιλικού και λουλουδιών. Στο στόμα, ο οίνος είναι στρόγγυλος, γεμάτος, με μετρίως υψηλά επίπεδα αλκοόλης.

Φυτεύτηκε στον αμπελώνα Μάτσα στα πλαίσια της αναμπέλωσης στα τέλη της δεκαετίας του '80 και ήταν μία από τις ποικιλίες που επέδειξε άριστο εγκλιματισμό στο οικοσύστημα του κτήματος. Το αποτέλεσμα είναι ένα κρασί το οποίο ξεχειλίζει τόσο πολύ από το έντονο αρωματικά μπουκέτο του, το οποίο το καθιστά πραγματικά μοναδικό.

Όπως περιγράφει χαρακτηριστικά η κ.Μάτσα: «Από το 1985 ξεκίνησα βιολογική καλλιέργεια και το 1998 πιστοποιήθηκαν όλα. Εκεί που έδωσα μάχη με την φύση ήταν για την Μαλαγουζιά ποικιλία της περιοχής της Ναυπακτίας. Φύτεψα το 1990 και το πρώτο κρασί το έβγαλα το 1997. Αυτό και μόνο δείχνει πόσο παιδεύεσαι με τη φύση. Θα λένε κάποτε ήτανε μια τρελή που έβγαλε τη Μαλαγουζιά. Υπάρχουν σήμερα φυτώρια στην Ιταλία που πουλάνε ρίζες που γράφουν επάνω 'Μαλαγουζιά Ρωξάνης Μάτσα'».

Το 1970, το Ινστιτούτο Αμπέλου, το οποίο διέθετε συλλογή ποικιλιών στη Λυκόβρυση της Αττικής, ενδιαφέρθηκε να συμπεριλάβει και τη Μαλαγουζιά. Ο κ. Κοτίνης του προμήθευσε εμβολιοκληματίδες από την επαρχία Μεσολογγίου, στην πεδιάδα ανατολικά του Αχελώου. Μερικές απ' αυτές τις κληματίδες, έστειλε το Ινστιτούτο Οίνου - αδελφό Ίδρυμα του Ινστιτούτου Αμπέλου - στη Σιθωνία της Χαλκιδικής, στην αμπελουργική εκμετάλλευση Πόρτο Καρράς, με την οποία συνεργαζόταν.

Διαμορφώνεται σε κύπελλο αλλά και σε γραμμικό αμφίπλευρο κορδόνι (Royat) και δέχεται κλάδεμα κοντά στα 2-3 μάτια ή μακρύ (αμολυτή) ιδιαίτερα όταν επικρατούν δύσκολες συνθήκες στην ωρίμανση και ο κίνδυνος βοτρυτή είναι μεγάλος. Ξεκινά την βλάστηση στα μέσα Μαρτίου και ωριμάζει στα τέλη Αυγούστου. Προέλευση ης εν λόγω ποικιλίας θεωρείται η δυτική πλευρά της κεντρικής Ελλάδας (Αιτωλοακαρνανία).



Εικόνα 13. Σταφυλή της ποικιλίας Μαλαγουζιά

Από το γλεύκος της ποικιλίας, που έχει περιεκτικότητα σε σάκχαρα κατά την πλήρη ωρίμανση 210-230 g/l , ολική οξύτητα 4,8-7 g/l σε τρυγικό οξύ και pH 3,4-3,6, παρασκευάζονται ποικιλιακοί οίνοι ποιότητας με χαρακτηριστικό πλούσιο σώμα και άρωμα.

Οι γλυκοί οίνοι παράγονται από σταφύλια όψιμου τρύγου, γεγονός που τους καθιστά ακόμα πιο πυκνούς και αρωματικούς. Πρόκειται για φυτό ζωηρό, εύρωστο, παραγωγικό, ευαίσθητο στο βοτρυτή και το ωίδιο, ανθεκτικό στην ξηρασία.

6.2. Περιοχή έρευνας



Εικόνα 14. Αεροφωτογραφία κτήματος Ρωζάνης Μάτσα (Κελιά-plots αμπελώνα προς πειραματισμό της ποικιλίας Μαλαγουζιά)

Για την διεξαγωγή της έρευνας, επιλέχτηκε ο αμπελώνας του κτήματος Ρωζάνη Μάτσα, που βρίσκεται στην Κάντζα Αττικής, μια περιοχή γνωστή από το παρελθόν για την καλλιέργεια και την παραγωγή κρασιών υψηλής ποιότητας. Το Κτήμα, συνολικής έκτασης 122 στρεμμάτων, καλλιεργείται σύμφωνα με τις αρχές της βιολογικής καλλιέργειας.

Οι κύριες ποικιλίες του κτήματος είναι η Μαλαγουζιά, το Savignion Blanc, το Syrah, το Ασύρτικο, το Σαββατιανό και ο Ροδίτης. Το κτήμα καλλιεργείται σε συνεργασία με την εταιρεία οινοποίησης «Μπουτάρη», μία από τις μεγαλύτερες εταιρίες στον τομέα παραγωγής οίνου υψηλής ποιότητας στην Ελλάδα.

Η πτυχιακή αυτή μελέτη, περιορίστηκε σε έκταση 10 στρεμμάτων, τα οποία καλλιεργούνται αποκλειστικά με την ποικιλία Μαλαγουζιά (Malagouzia) βιολογικής καλλιέργειας. Ο πρώτος αμπελώνας είναι σχήματος «Γ» και έχει Νοτιοανατολική κατεύθυνση. Η κλίση του εδάφους είναι της τάξεως 5% με κατεύθυνση από το βορρά προς το νότο και παρατηρήθηκε μόνο στο άνω μέρος. Οι γραμμές του αμπελώνα είναι εγκατεστημένες κάθετα στην κλίση του εδάφους. Η απόσταση μεταξύ των γραμμών είναι 2.8 m, ενώ η απόσταση μεταξύ των φυτών επί της γραμμής είναι 1.8 m.

Ο αγρός χωρίστηκε σε 20 κελιά (plot), όπως φαίνεται στη Εικόνα 14, και κατά μήκος των γραμμών είχε φυτευτεί βίκος με σκοπό την ενσωμάτωσή του στο έδαφος κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου.



Εικόνα 15. Οι γραμμές του αμπελώνα είναι εγκατεστημένες κάθετα στην κλίση του εδάφους. Η απόσταση μεταξύ των γραμμών είναι 2.8 m, ενώ η απόσταση μεταξύ των φυτών επί της γραμμής είναι 1.8 m.

Ο αμπελώνας με πρέμνα Μαλαγουζιάς, αποτελείται από χαμηλά κύπελλα φυτεμένα με νοτιοανατολική κατεύθυνση.

7. Υλικά και μέθοδοι

7.1. Μελέτη της Μαλαγουζιάς

Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στον εργαστηριακό χώρο του γεωπονικού πανεπιστήμιου Αθηνών το έτος 2015 μελετήσαμε 10 διαφορετικά δείγματα της ποικιλίας Μαλαγουζιάς από τις αντίστοιχες περιοχές που είχε τμηματοποιηθεί ο πειραματικός αγρός.

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήσαμε στο εργαστήριο ήταν: η μέθοδος επιταχυνόμενης οξείδωσης, η μέθοδος Folin-Ciocalteu και η μέθοδος DPPH.



Εικόνα 16. Διαφορετικά δείγματα λευκού οίνου με βάση την οξειδωτική αμαύρωση που έχουν υποστεί σε σχέση με τον χρόνο.

7.1.1. Μέθοδος επιταχυνόμενης οξείδωσης

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη της αμαύρωσης του οίνου (Sioumis, et al., 2006) είναι μια παραλλαγή αυτής που περιγράφηκε από τους Singleton και Kramling (1976).

Συγκεκριμένα σε ένα μπουκάλι πειράματος αντιστοιχούν 3 φιαλίδια βιδωτά με καπάκι («vials»: 7,5cm μήκος, 2,1 cm εσωτερική διάμετρο, χωρητικότητας 15ml) πάνω από τα οποία επισημαίνεται ο αντίστοιχος κωδικός του οίνου (1A,1B,...3Γ). Στα φιαλίδια αυτά τοποθετούνται 10 ml από τον οίνο με την βοήθεια πιπέτας και στη συνέχεια υποβάλλονται για διάστημα 12 ημερών σε θέρμανση, υπό σταθερή θερμοκρασία $55^{\circ}\text{C} \pm 0,2$ (τακτική παρατήρηση με θερμοκρασία θερμομέτρου) μέσα σε ειδικό υδατομέτρου (συνθήκες σκότους). Τα vials αποσύρονται από το υδατομέτρου κάθε 24 ώρες και αφού αφεθούν για διάστημα περίπου 20 λεπτών, ώστε να αποκτήσουν θερμοκρασία περιβάλλοντος με την βοήθεια του φασματοφωτόμετρου καταγράφεται η απορρόφηση των δειγμάτων στα 420 nm. Για τον μηδενισμό του φασματοφωτόμετρου χρησιμοποιείται διάλυμα αιθανόλης 12%, ενώ οι μετρήσεις πραγματοποιούνται με πλαστικές κυψελίδες και με χρήση λάμπας αλογόνου. Το περιεχόμενο των κυψελίδων επιστρέφει στα φιαλίδια από τα οποία αντλήθηκε ώστε να διατηρηθεί ο αρχικός όγκος) και τοποθετούνται ξανά στο υδατόλουτρο. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται για 12 ημέρες. Τέλος τα φιαλίδια είναι 3 για κάθε εμφιαλωμένο οίνο με σκοπό την μεγαλύτερη ακρίβεια, τον έλεγχο της επαναληψιμότητας και συνεπώς πιο ακριβή αποτελέσματα.

7.1.2. Μέθοδος Folin-Ciocalteu

Με την μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται η μέτρηση της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών. Πρόκειται για φωτομετρική μέθοδο που βασίζεται στην οξείδωση των φαινολικών ενώσεων του οίνου από το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu. Χρησιμοποιείται για την μέτρηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου χωρίς να γίνεται διάκριση μεταξύ μονομερών, διμερών ή μεγαλύτερων συστατικών. Το κύριο αντιδραστήριο της μεθόδου, το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu, είναι διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφο-μολυβδαινικά ($\text{H}_3\text{PMO}_{12}\text{O}_{40}$) και φωσφο-βολφραμικά ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) ετεροπολυμερή οξέα. Τα φαινολικά ιόντα οξειδώνονται με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων. Κατά την οξείδωση των φαινολών, το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu ανάγεται προς μείγμα κυανών οξειδίων του βολφραμίου (W_8O_{23}) και του μολυβδαινίου (Mo_8O_{23}). Το σχηματιζόμενο κυανό χρώμα παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση περίπου στα 750nm και είναι ανάλογο με τη συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων. Η αλκαλικότητα ρυθμίζεται με διάλυμα Na_2CO_3 . Τέλος, ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών πραγματοποιείται μέσω της πρότυπης καμπύλης αναφοράς της κατεχίνης και τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mg/L γαλλικού οξέος.

Υλικά και εξοπλισμός

- Πιπέτες ή σιφώνια
- Tips, κυψελίδες, μαγνήτες
- Ποτήρια ζέσεως
- Αναδευτήρας
- Ζυγός
- Ογκομετρικές φιάλες των 20 mL
- Αντιδραστήριο Folin- Ciocalteu

- Διαλύματα : Ανθρακικό νάτριο (Na_2CO_3) 20% (w/v) και κατεχίνη 1g/L
- Φασματοφωτόμετρο
- Αιθανόλη 12%

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται είναι :

- A. Folin**
- B. Διάλυμα Na_2CO_3 20%**
- C. Πρότυπο διάλυμα γαλλικού οξέος**

Διαλύματα:

B. διάλυμα ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3) 20% (w/v): Μηδενίζεται ο ζυγός με το ποτήρι ζέσεως που θα χρησιμοποιηθεί και προσθέτουμε σε αυτό ακριβώς 20g άνυδρου Na_2CO_3 . Το ποτήρι ζέσεως τοποθετείτε στον αναδευτήρα, αφού έχει συμπληρωθεί με μια κατάλληλη ποσότητα απιονισμένου νερού και προστίθεται ο μαγνήτης, όπου σε χαμηλές στροφές αφήνετε το διάλυμα να ομογενοποιηθεί. Τέλος το διάλυμα τοποθετείτε σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml και συμπληρώνεται με απιονισμένο νερό μέχρι χαραγής. Το διάλυμα διατηρείτε εκτός ψυγείου και για δυο εβδομάδες.

C. Διάλυμα γαλλικού οξέος 1g/L: 100mg γαλλικού οξέος διαλύονται σε 10 ml αιθανόλης σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml. Η ογκομετρική φιάλη συμπληρώνεται με απιονισμένο νερό μέχρι τα 100 ml.

Διαδικασία προσδιορισμού

Σύμφωνα με τα προαναφερόμενα, πραγματοποιήσαμε δειγματοληψία σε 10 διαφορετικά τμήματα στα οποία είχε χωριστεί ο πειρατικός αγρός στην ποικιλία Μαλαγουζιά. Στο κάθε δείγμα αντιστοιχούν τρεις επαναλήψεις, άρα συνολικά υπήρχαν 30 φιαλίδια.

Σε ογκομετρική φιάλη των 10 ml με περίπου 5ml H_2O τοποθετούνται:

- 100μl δείγματος (αραίωση 1:4)
- Folin 500μL
- Na_2CO_3 1500 μL

Συμπληρώνεται νερό μέχρι τα 10 mL. Στο μάρτυρα (blank) χρησιμοποιείται νερό (100μL νερού 500 μL Folin, 1500 μL Na_2CO_3). Μετά από παραμονή 30 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος μετριέται η απορρόφηση στα 765 nm (ορατό φάσμα). Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος γίνεται μέσω πρότυπης καμπύλης διαδικασία επαναλαμβάνεται για κάθε ένα από τα 10 δείγματα που υπάρχουν.

Πίνακας 1. Ποσοτική προσθήκη διαλυμάτων μεθόδου Folin-Ciocalteu για την μέτρηση της συγκέντρωσης των ολικών φαινολών.

Οίνος	Folin-Ciocalteu	Na_2CO_3 20% (w/v)	H_2O
100μL	500μL	1500μL	5mL
blank	500μL	1500μL	5mL

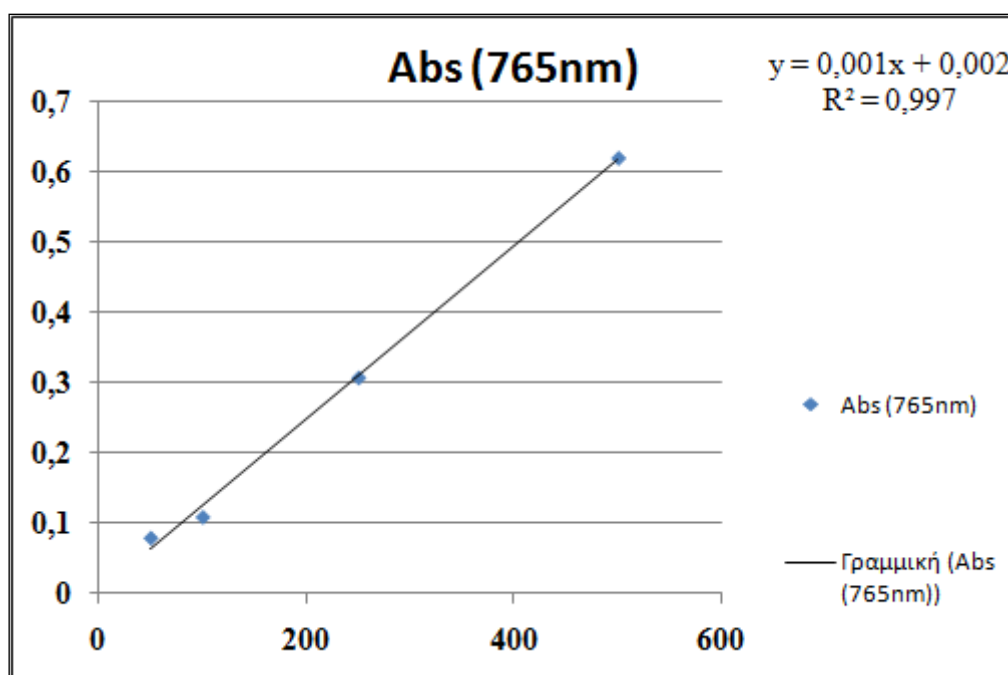
Καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος

Για την πρότυπη καμπύλη αναφοράς παρασκευάζεται διάλυμα γαλλικού οξέος 1g/L. Η καμπύλη αναφοράς γίνεται για τις συγκεντρώσεις 50, 100, 250, 500 mg/L. Σε ογκομετρικές φιάλες των 10mL προστίθενται 0.5, 1, 2.5, 5 mL διαλύματος γαλλικού οξέος 1g/L και συμπληρώνεται ο όγκος με νερό. Έτσι δημιουργούνται συγκεντρώσεις 50, 100, 250, 500 mg/L γαλλικού οξέος. Στη συνέχεια μετράται η απορρόφηση κάθε διαλύματος ύστερα από αντίδραση με το διάλυμα Folin.

Πίνακας 2. Ποσοτική προσθήκη διαλυμάτων για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς κατεχίνης

Συγκέντρωση γαλλικού οξέος (μL)	H ₂ O (μL)
0	1000
50	950
100	900
250	750
500	500
1ml	0

- Μετριοούνται οι απορροφήσεις στα 765nm με πλαστική κυψελίδα πάχους 10mm και με χρήση λάμπας αλογόνου.

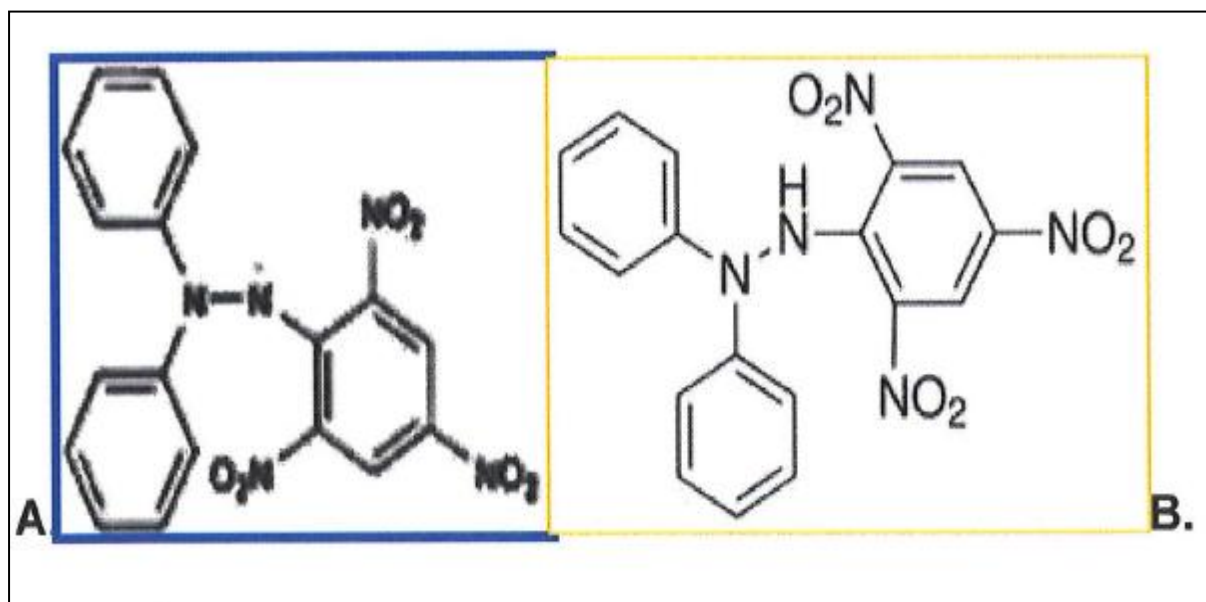


Εικόνα 17. Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος υπολογισμένη στα 765nm.

7.2. Μέθοδος DPPH

Με την μέθοδο DPPH πραγματοποιείται η μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Η μέθοδος, που αποτελεί μία παραλλαγή της μεθόδου που περιγράφηκε από τον

Brand-Williams και τους συνεργάτες του (1995), στηρίζεται στην απορρόφηση της ρίζας 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH) (Εικόνα 14). Όταν στο διάλυμα προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα DPPH ανάγεται με πρόσληψη ενός ατόμου υδρογόνου (ή ενός e^-) και μετατρέπεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (Εικόνα 18), η οποία έχει κίτρινο χρώμα, με αποτέλεσμα να ελαττώνεται η οπτική απορρόφηση. Η μέτρηση της απορρόφησης πραγματοποιείται στα 515 nm.



Εικόνα 18. Α. Χημική δομή της ρίζας 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο, Β. Χημική δομή της 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνης

Υλικά και εξοπλισμός

- Πιπέτες, tips, κυψελίδες
- Ποτήρια ζέσεως
- Ζυγός
- Ογκομετρικός κύλινδρος
- Ογκομετρική φιάλες των 250, 25, 5 ml
- Φασματοφωτόμετρο
- Eppendorf
- Vortex
- DPPH (υπό την μορφή κόκκων σε μικρό vial καλυπτόμενο με αλουμινόχαρτο για προστασία από το φως. Συντήρηση εντός ψυγείου)
- Μεθανόλη
- Αιθανόλη 12%

Διαλύματα

Α. Μητρικό διάλυμα DPPH: Ο ζυγός μηδενίζεται με το ποτήρι ζέσεως που θα χρησιμοποιηθεί και προστίθεται σε αυτό ακριβώς 5,9 mg DPPH με την βοήθεια ειδικής σπάτουλας. Ακολούθως, πραγματοποιείται προσθήκη κάθε φορά μικρής ποσότητας μεθανόλης στο ποτήρι ζέσεως με ταυτόχρονη ανάδευση μέχρι διάλυσης των κόκκων DPPH. Τέλος, τοποθέτηση του περιεχομένου του ποτηριού σε ογκομετρική φιάλη των 250 ml και προσθήκη μεθανόλης μέχρι χαραγής. Το διάλυμα πρέπει να χρησιμοποιείται αμέσως. Διατηρείται στο ψυγείο μόνο μία μέρα.

B. Διάλυμα T (Trolox 2mM) : Ο ζυγός μηδενίζεται με το ποτήρι ζέσεως που θα χρησιμοποιηθεί και προστίθεται σε αυτό ακριβώς 12,5 mg trolox με την βοήθεια ειδικής σπάτουλας. Αυτά διαλύονται σε 3 ml αιθανόλης 12% και το διάλυμα μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 25 ml όπου και συμπληρώνεται με απιονισμένο νερό μέχρι χαραγής.

Διαδικασία προσδιορισμού

Σε erpendorf προστίθενται 25 μ L δείγματος οίνου (από 1/10 έως 1/20 δηλαδή 500 μ L/5ml έως 500 μ L/10ml αραιώση ανάλογα με την συγκέντρωση των φαινολικών με απιονισμένο νερό) και 975 μ l μητρικού διαλύματος DPPH.

Μετά την ανάδευση σε vortex για 30 sec μετράται η απορρόφηση σε μήκος κύματος 515 nm (t=0) σε κυβελίδες με στένωση και χρήση λάμπας αλογόνου. Μετά το πέρας 30 λεπτών , πραγματοποιείται vortex και μετράται η απορρόφηση ξανά (t=30) . Το φασματοφωτόμετρο μηδενίζεται με απιονισμένο νερό.

Από τις δύο απορροφήσεις υπολογίζεται η % διαφορά στην απορρόφηση σύμφωνα με τον τύπο:

$$\% \Delta A (515) = [A(0) - A(30)] / A(0) \times 100$$

Μέσω της καμπύλης της αναφοράς σε trolox εκφράζεται η αντιοξειδωτική ικανότητα σε mM trolox.

Έστω C η τιμή από την καμπύλη αναφοράς, τότε αντιοξειδωτική ικανότητα δείγματος : C* αραιώση mM trolox.

Καμπύλη αναφοράς σε trolox

Για την πρότυπη καμπύλη αναφοράς παρασκευάζεται διάλυμα trolox με συγκέντρωση 2mM (διάλυμα A) .Η καμπύλη αναφοράς γίνεται για τις συγκεντρώσεις 0.08, 0.5, 1, 1.5, 2 mM trolox.

Σε ογκομετρικές φιάλες των 5 ml προστίθενται οι ανάλογες ποσότητες 0.2, 1.25, 2.5, 3.75 ml διαλύματος A και ο όγκος συμπληρώνεται με καθαρή αιθανόλη (Πίνακας 4).

Πίνακας 3. Συγκέντρωση trolox και διαλύματος A για τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης

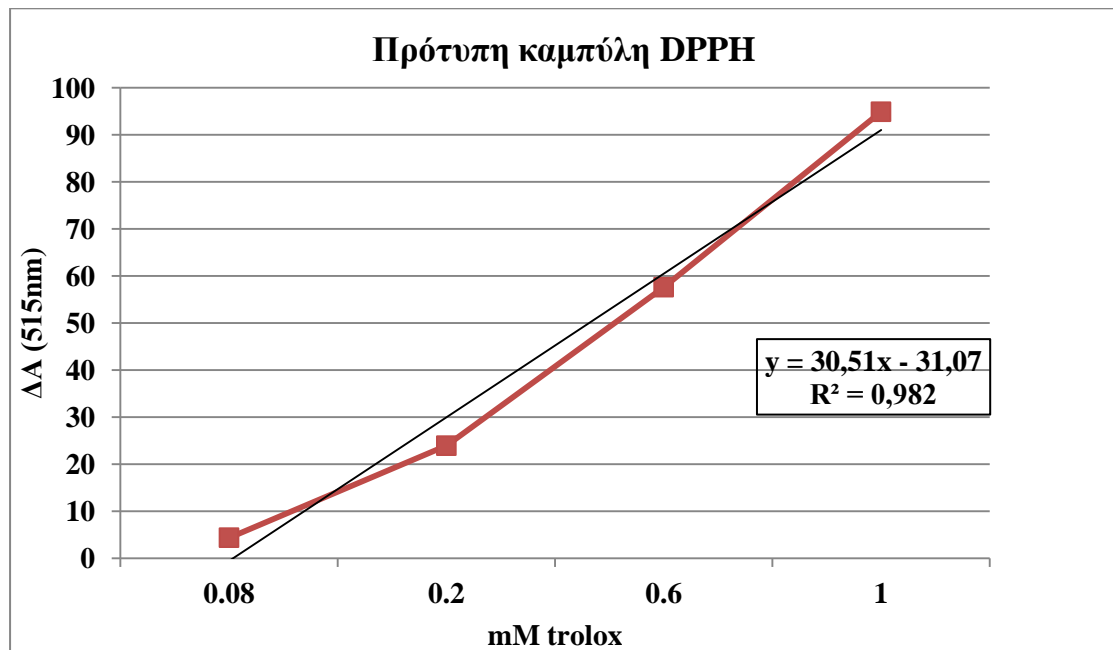
	Τελική συγκέντρωση trolox σε mM	Ποσότητα δ/τος A σε τελικό όγκο 5 ml με αιθανόλη
1	0,08	0,2 ml
2	0,5	1,25 ml
3	1	2,5 ml
4	1,5	3,75 ml
5	2	Διάλυμα A χωρίς αραιώση

Σε erpendorf προστίθενται 25 μ L του κάθε διαλύματος trolox και 975 μ l μητρικού διαλύματος DPPH.

Μετά την ανάδευση σε vortex για 30 sec μετράται η απορρόφηση σε μήκος κύματος 515 nm (t=0) σε κυβελίδες με στένωση και χρήση λάμπας αλογόνου. Μετά το πέρας 30 λεπτών , πραγματοποιείται vortex και μετράται η απορρόφηση ξανά (t=30) . Το φασματοφωτόμετρο μηδενίζεται με απιονισμένο νερό. Από τις δυο απορροφήσεις υπολογίζεται η % διαφορά στην απορρόφηση

$$\% \Delta A (515) = [A(0) - A(30)] / A(0) \times 100$$

Η καμπύλη αναφοράς γίνεται μεταξύ των συγκεντρώσεων trolox και της % διαφοράς στην απορρόφηση όπως φαίνεται στην εικόνα 19.



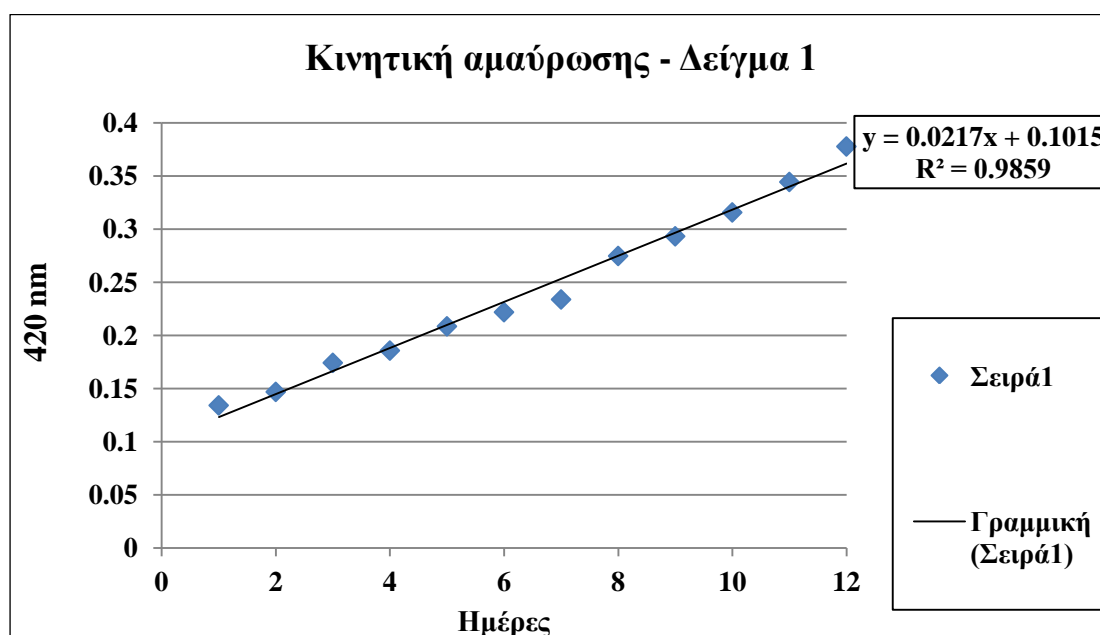
Εικόνα 19. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς DPPH

8. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Σε αυτό το κεφάλαιο παρουσιάζονται τα αποτελέσματα, οι τιμές των δειγμάτων δηλαδή, που μετρήθηκαν στον εργαστηριακό χώρο της οινολογίας του Γ.Π.Α., ύστερα από την επεξεργασία αυτών με τις προαναφερθέντες μεθόδους. Η παρουσίαση πραγματοποιείται με την βοήθεια διαγραμμάτων.

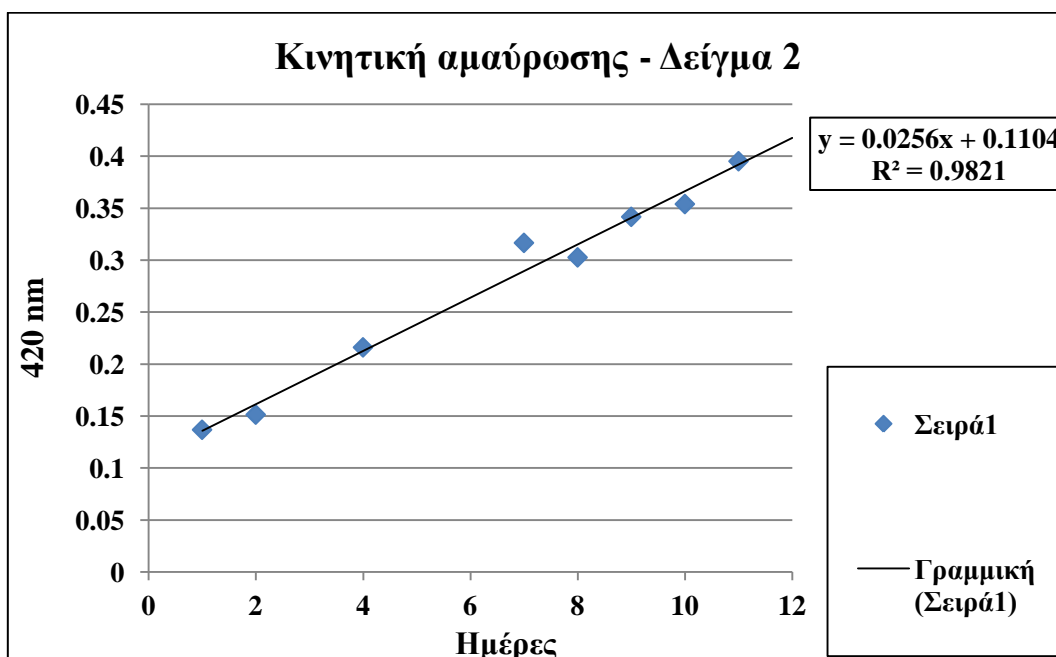
8.1. Κινητική μελέτη της έντασης της οξειδωτικής αμαύρωσης

Για την μελέτη της οξειδωτικής αμαύρωσης, όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενο κεφάλαιο τα δείγματα της ποικιλίας παρέμειναν καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος υπό συνθήκες σκότους μέσα σε υδατόλουτρο με την θερμοκρασία να είναι ρυθμισμένη στους $55^{\circ}\text{C} \pm 0,2$. Κάθε 24 ώρες (συγκεκριμένα πρωινές ώρες) με την βοήθεια του φασματοφωτόμετρου καταγραφόταν η απορρόφηση των δειγμάτων στα 420 nm (A_{420}). Για τον μηδενισμό του φασματοφωτόμετρου χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο νερό, ενώ οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με χρήση λάμπας αλογόνου. Στα παρακάτω διαγράμματα παρατηρούμε την καμπύλη κινητικής της αμαύρωσης. Οι τιμές προκύπτουν από τον μέσο όρο των τριών επαναλήψεων του κάθε δείγματος στο διάστημα των δώδεκα ημερών μελέτης στο εργαστήριο.



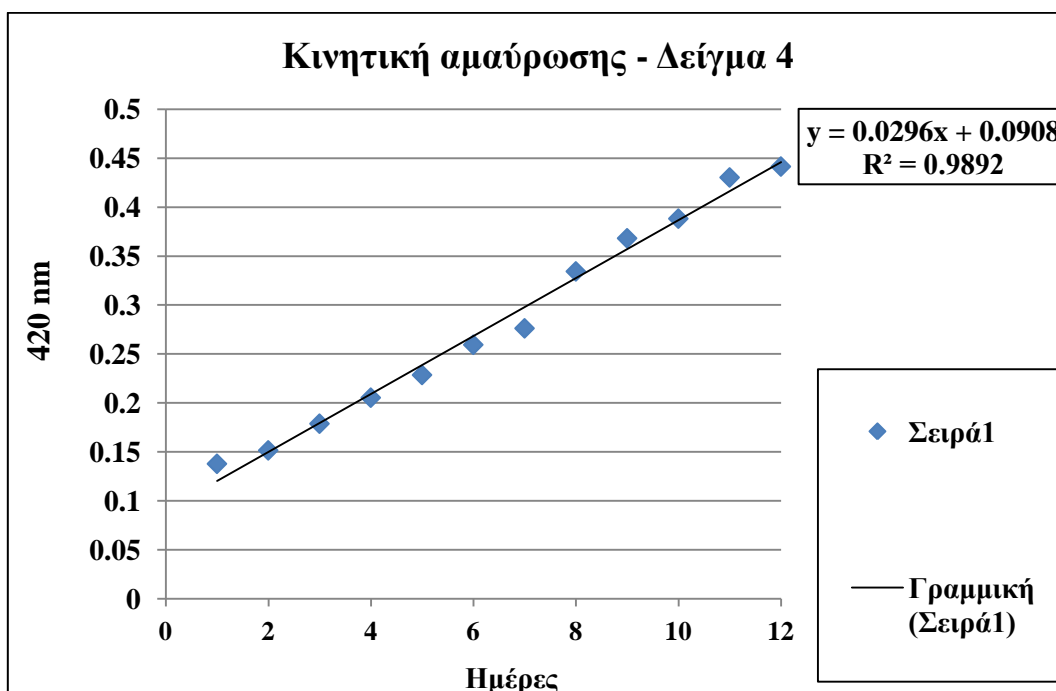
Εικόνα 20. Κινητική μελέτη αμαύρωσης οίνου δείγματος 1 (όπου X μέρες των μετρήσεων και όπου Y οι αντίστοιχες απορροφήσεις στα 420 nm)

Στην Εικόνα 20 παρουσιάζεται η μελέτη κινητικής αμαύρωσης σε διάστημα 12 ημερών του δείγματος 1. Η απορρόφηση την πρώτη ημέρα είναι 0,134 και αυξάνεται γραμμικά μέχρι τη δωδέκατη ημέρα (0,375).



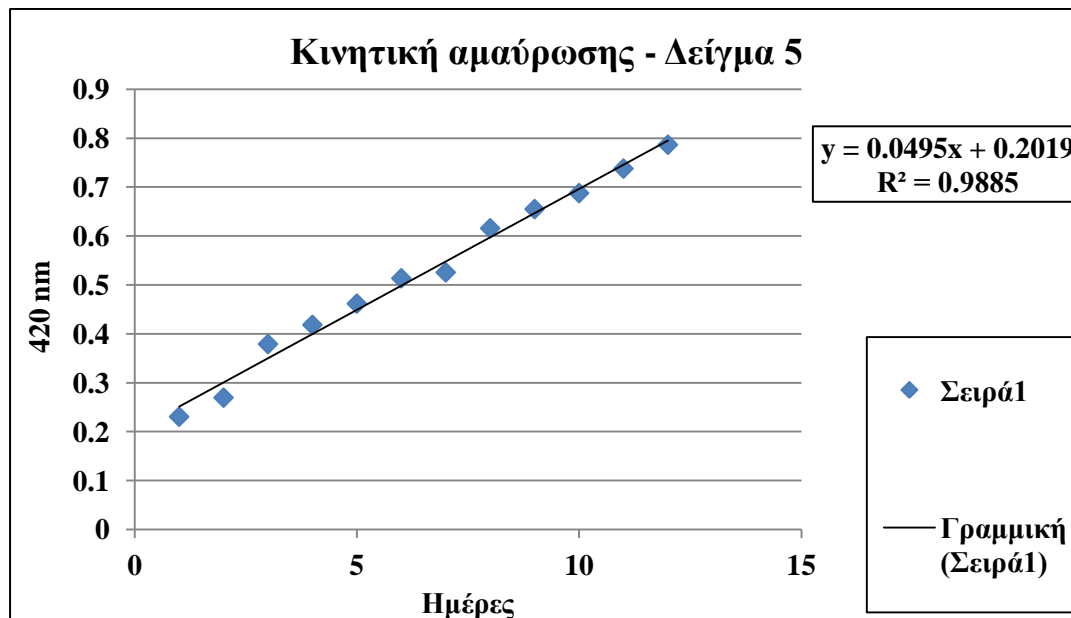
Εικόνα 21. Κινητική μελέτη αμαύρωσης οίνου δείγματος 2 (όπου X μέρες των μετρήσεων και όπου Y οι αντίστοιχες απορροφήσεις στα 420 nm)

Στην Εικόνα 21 παρουσιάζεται η μελέτη κινητικής αμαύρωσης σε διάστημα 12 ημερών του δείγματος 2. Η απορρόφηση την πρώτη ημέρα είναι 0,1368 και αυξάνεται γραμμικά μέχρι τη δωδέκατη ημέρα (0,3951).



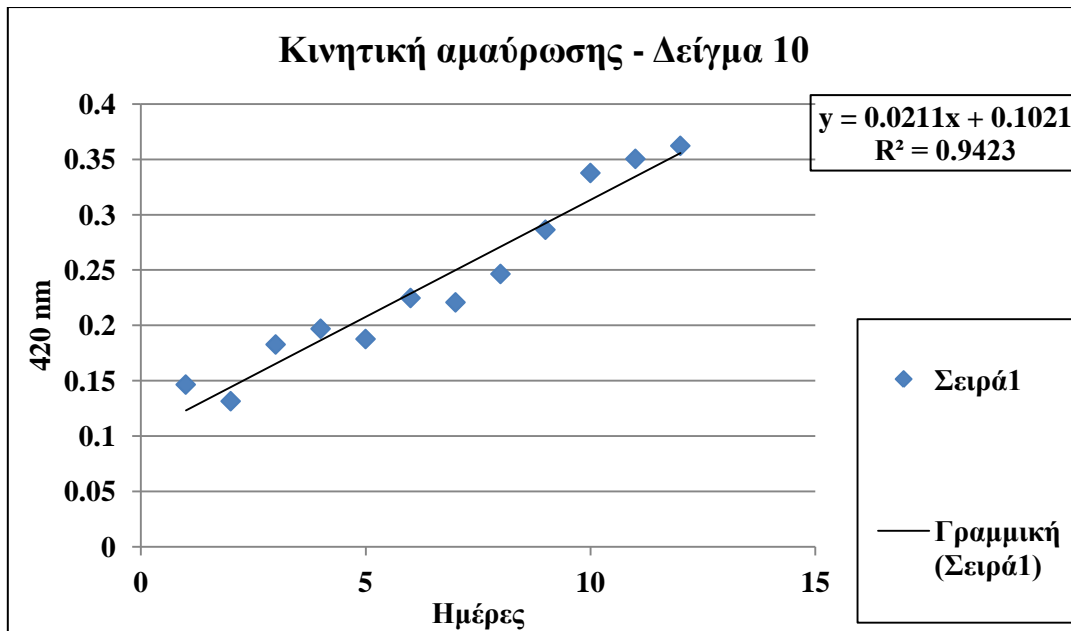
Εικόνα 22. Κινητική μελέτη αμαύρωσης οίνου δείγματος 4 (όπου X μέρες των μετρήσεων και όπου Y οι αντίστοιχες απορροφήσεις στα 420 nm)

Στην Εικόνα 22 παρουσιάζεται η μελέτη κινητικής αμαύρωσης σε διάστημα 12 ημερών του δείγματος 4. Η απορρόφηση την πρώτη ημέρα είναι 0,1376 και αυξάνεται γραμμικά μέχρι τη δωδέκατη ημέρα (0,4413).



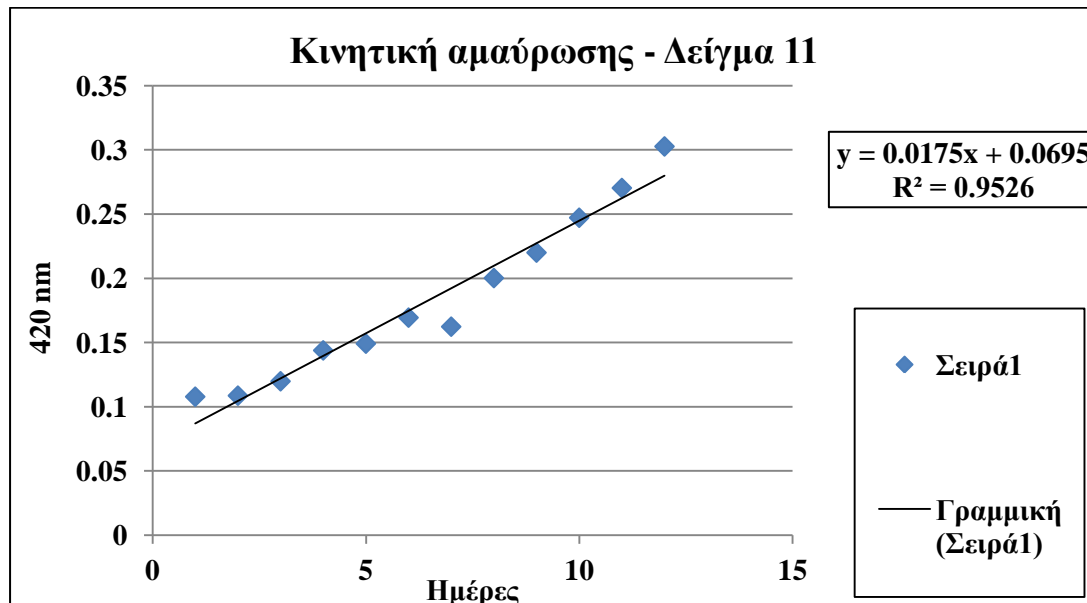
Εικόνα 23. Κινητική μελέτη αμαύρωσης οίνου δείγματος 5. (όπου X μέρες των μετρήσεων και όπου Y οι αντίστοιχες απορροφήσεις στα 420 nm)

Στην Εικόνα 23 παρουσιάζεται η μελέτη κινητικής αμαύρωσης σε διάστημα 12 ημερών του δείγματος 5. Η απορρόφηση την πρώτη ημέρα είναι 0,2305 και αυξάνεται γραμμικά μέχρι τη δωδέκατη ημέρα (0,786566667).



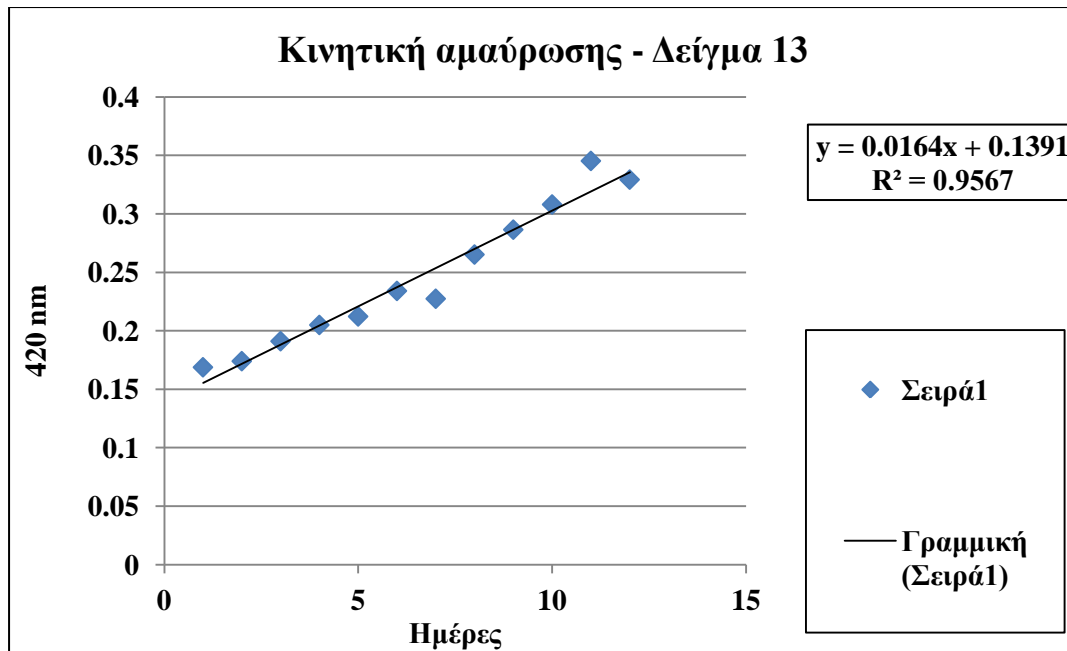
Εικόνα 24. Κινητική μελέτη αμαύρωσης οίνου δείγματος 10. (όπου X μέρες των μετρήσεων και όπου Y οι αντίστοιχες απορροφήσεις στα 420 nm)

Στην Εικόνα 24 παρουσιάζεται η μελέτη κινητικής αμαύρωσης σε διάστημα 12 ημερών του δείγματος 10. Η απορρόφηση την πρώτη ημέρα είναι 0,1465 και αυξάνεται γραμμικά μέχρι τη δωδέκατη ημέρα (0,3622).



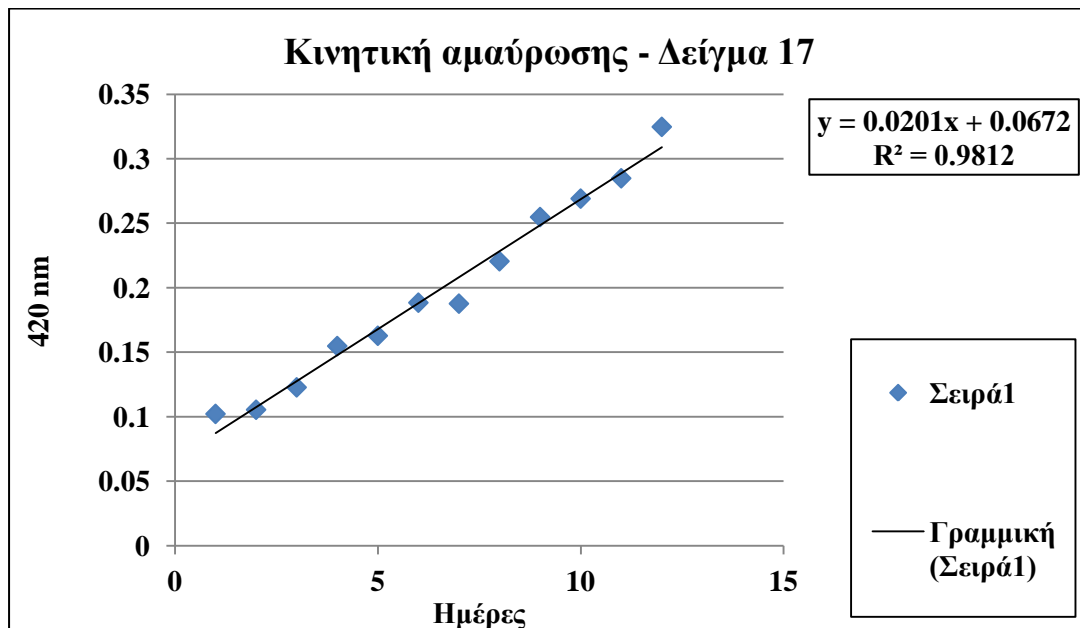
Εικόνα 25. Κινητική μελέτη αμαύρωσης οίνου δείγματος 11. (όπου X μέρες των μετρήσεων και όπου Y οι αντίστοιχες απορροφήσεις στα 420 nm)

Στην Εικόνα 25 παρουσιάζεται η μελέτη κινητικής αμαύρωσης σε διάστημα 12 ημερών του δείγματος 11. Η απορρόφηση την πρώτη ημέρα είναι 0,1079 και αυξάνεται γραμμικά μέχρι τη δωδέκατη ημέρα (0,3027).



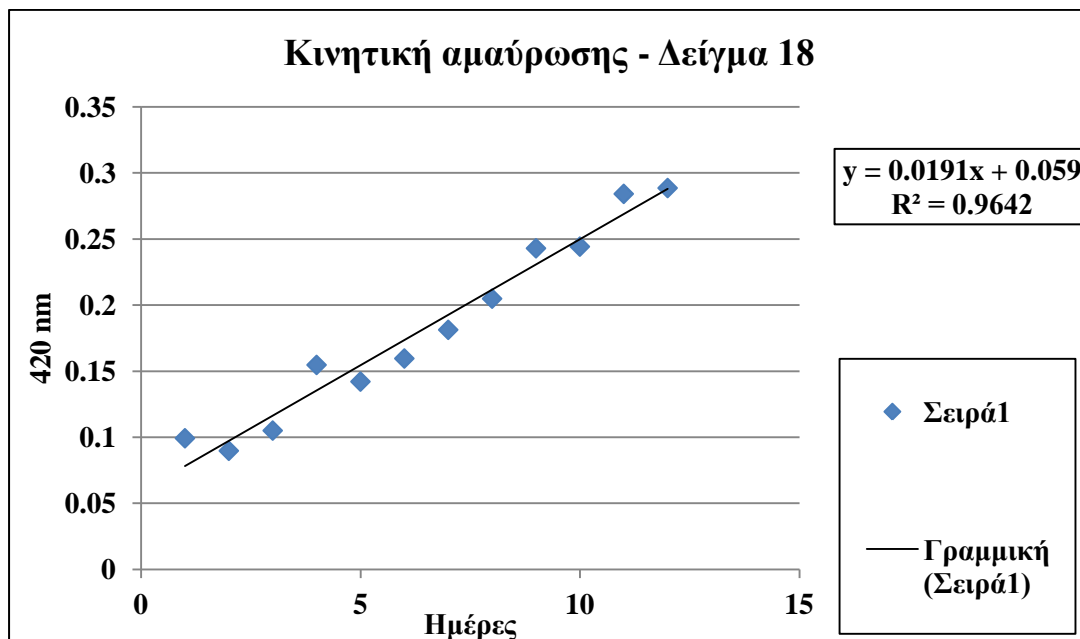
Εικόνα 26. Κινητική μελέτη αμαύρωσης οίνου δείγματος 13. (όπου X μέρες των μετρήσεων και όπου Y οι αντίστοιχες απορροφήσεις στα 420 nm)

Στο διάγραμμα 3 παρουσιάζεται η μελέτη κινητικής αμαύρωσης σε διάστημα 12 ημερών του δείγματος 13. Η απορρόφηση την πρώτη ημέρα είναι 0,1688 και αυξάνεται γραμμικά μέχρι τη δωδέκατη ημέρα (0,3293).



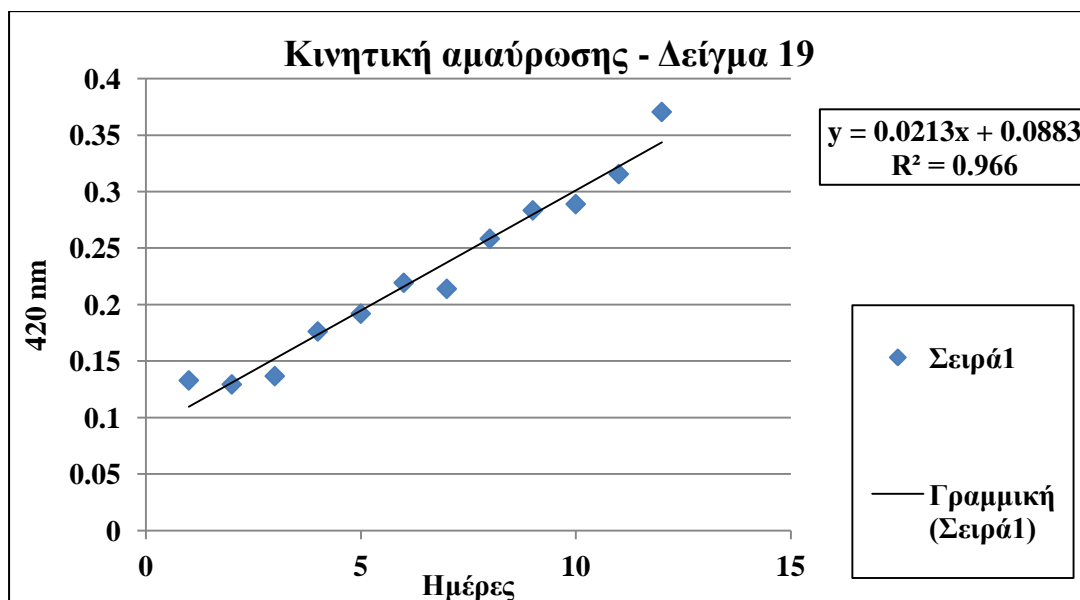
Εικόνα 27. Κινητική μελέτη αμαύρωσης οίνου δείγματος 17. (όπου X μέρες των μετρήσεων και όπου Y οι αντίστοιχες απορροφήσεις στα 420 nm)

Στην Εικόνα 27 παρουσιάζεται η μελέτη κινητικής αμαύρωσης σε διάστημα 12 ημερών του δείγματος 17. Η απορρόφηση την πρώτη ημέρα είναι 0,1021 και αυξάνεται γραμμικά μέχρι τη δωδέκατη ημέρα (0,3246).



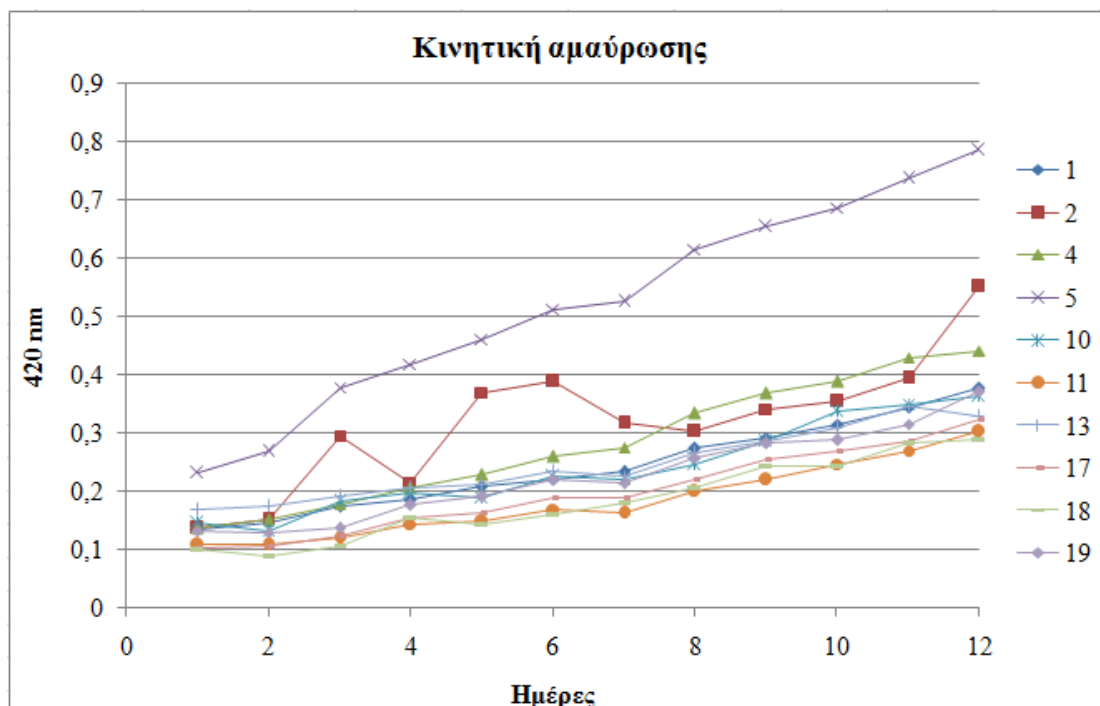
Εικόνα 28. Κινητική μελέτη αμαύρωσης οίνου δείγματος 18. (όπου X μέρες των μετρήσεων και όπου Y οι αντίστοιχες απορροφήσεις στα 420 nm)

Στην Εικόνα 28 παρουσιάζεται η μελέτη κινητικής αμαύρωσης σε διάστημα 12 ημερών του δείγματος 18. Η απορρόφηση την πρώτη ημέρα είναι 0,0992 και αυξάνεται γραμμικά μέχρι τη δωδέκατη ημέρα (0,2885).



Εικόνα 29. Κινητική μελέτη αμαύρωσης οίνου δείγματος 19. (όπου X μέρες των μετρήσεων και όπου Y οι αντίστοιχες απορροφήσεις στα 420 nm)

Στην Εικόνα 29 παρουσιάζεται η μελέτη κινητικής αμαύρωσης σε διάστημα 12 ημερών του δείγματος 19. Η απορρόφηση την πρώτη ημέρα είναι 0,133 και αυξάνεται γραμμικά μέχρι τη δωδέκατη ημέρα (0,3706).



Εικόνα 30. Κινητική μελέτη αμαύρωσης οίνου όλων των δειγμάτων. (όπου X μέρες των μετρήσεων και όπου Y οι αντίστοιχες απορροφήσεις στα 420 nm)

Στην εικόνα 30 παρουσιάζεται η κινητική μελέτη αμαύρωσης όλων των δειγμάτων. Όπως φαίνεται τις μεγαλύτερες τιμές απορρόφησης στα 420 nm παρουσιάζει το δείγμα με κωδικό 5 με σημαντική διαφορά από τα υπόλοιπα δείγματα, ενώ ακολουθεί το δείγμα 4. Τις μικρότερες τιμές εμφανίζουν τα δείγματα 11 και 18.

Στα παραπάνω διαγράμματα παρατηρούμε ότι η εξίσωση που περιγράφει την οξείδωση είναι ευθεία γραμμή της μορφής $y=ax+b$. Ως γνωστόν ο όρος (**a**) ονομάζεται κλίση της ευθείας και εκφράζει τον ρυθμό μεταβολής του υπό μελέτη παράγοντα. Οι τιμές των σταθερών αμαύρωσης (**k**) υπολογίστηκαν γραφικά από την κλίση των παραπάνω ευθειών ($k=a \times 10^3$) και παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 5.

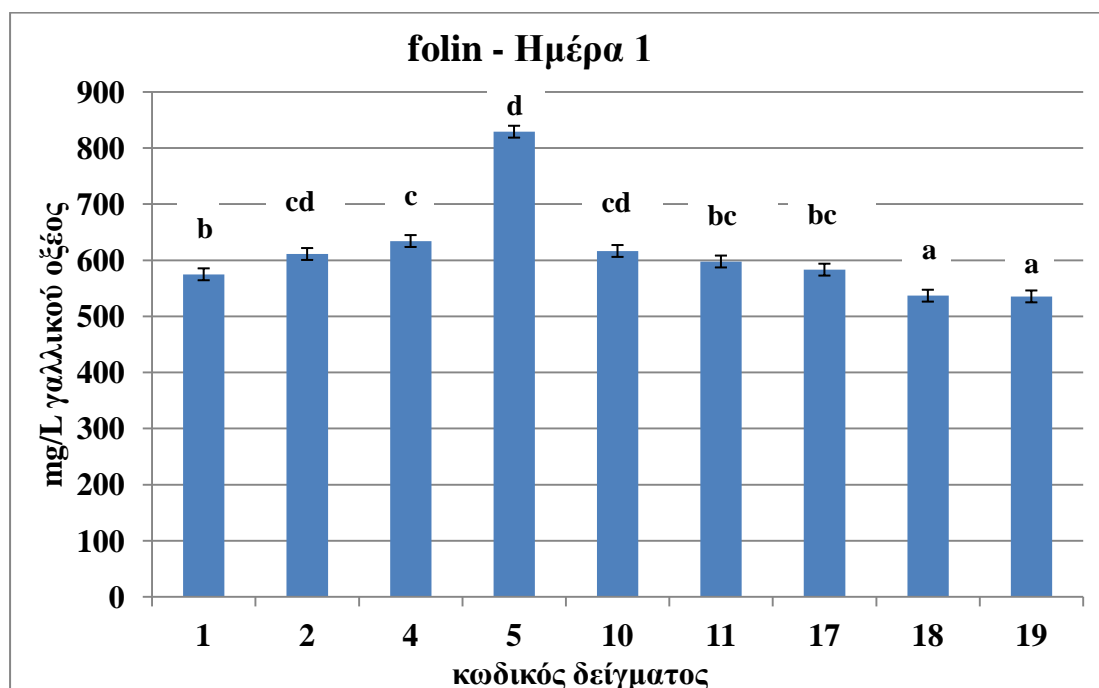
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα λοιπόν, η τιμή της απορρόφησης στα 420 nm αυξήθηκε σε σημαντικό βαθμό κατά την διάρκεια της επιταχυνόμενης οξείδωσης, με τις σταθερές αμαύρωσης να ποικίλουν έχοντας εύρος τιμών από 16 έως 49, εύρος το οποίο συμπίπτει με αυτό που καταγράφηκε στην μελέτη των Sioumis et al., (2006) (k από 15,3-74,5). Οι οίνοι που παρουσίασαν μικρότερο ρυθμό μεταβολής απορρόφησης στα 420 nm είναι αυτοί με την μικρότερη τιμή k. Το δείγμα οίνου **13** με **k=16 (και $r^2=0,956$)** παρουσίασε την χαμηλότερη τιμή k, ενώ ακλουθούν οι τιμές του δείγματος 11 με (k=17, $R^2=0,952$) και των δειγμάτων 1,10,19 (k=21). Ο μεγαλύτερος ρυθμός μεταβολής της απορρόφησης 420nm αποτυπώθηκε στο δείγμα οίνου 5 με (**k=49 και $R^2=0,988$**). Από τα παραπάνω δεδομένα παρατηρούμε ότι η σταθερά αμαύρωσης για την ποικιλία Μαλαγουζιά διαφέρει ανάλογα με το τμήμα του αμπελώνα που μελετήθηκε. Στην αντίστοιχη μελέτη των Sioumis et al., (2006), η συμπεριφορά της καμπύλης κινητικής αμαύρωσης χωρίζεται σε δύο διακριτές φάσεις. Στην πρώτη φάση έχουμε απότομη αύξηση τις τρεις πρώτες ημέρες, η οποία ακολουθείται από μια δεύτερη φάση που χαρακτηρίζεται από μια σχεδόν γραμμική αύξηση μέχρι τη δέκατη ημέρα. Στη δική μας περίπτωση όμως έχουμε ουσιαστικά

μόνο τη δεύτερη φάση και σε πολύ μικρό βαθμό αυτή την απότομη αύξηση των τριών πρώτων ημερών που φαίνεται στο δείγμα 5. Επίσης οι Sioumis et al., διαπίστωσαν ότι η επικατεχίνη φαίνεται να εμπλέκεται σε μεγάλο βαθμό στις αντιδράσεις αμαύρωσης, όπως υποδεικνύεται από την ιδιαίτερα υψηλή συσχέτιση της συγκέντρωσης του με τιμές τις τιμές του k.

Πίνακας 4 Τιμές σταθερών αμαύρωσης (k) όπως υπολογίστηκαν από την κλίση των ευθειών.

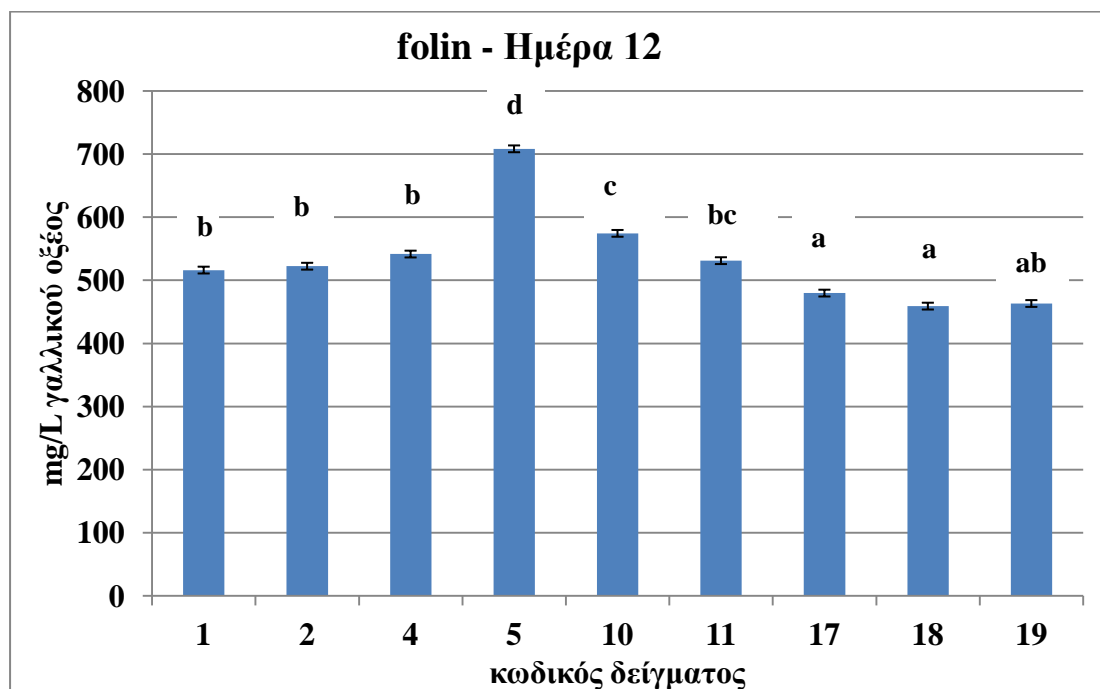
Κωδικοί οίνων	k ($a \times 10^3$)	R ²	Εξίσωση
1	21	0,985	$y = 0,021x + 0,101$
4	29	0,989	$y = 0,029x + 0,090$
5	49	0,988	$y = 0,049x + 0,201$
10	21	0,942	$y = 0,021x + 0,102$
11	17	0,952	$y = 0,017x + 0,069$
13	16	0,956	$y = 0,016x + 0,139$
17	20	0,981	$y = 0,020x + 0,067$
18	19	0,964	$y = 0,019x + 0,059$
19	21	0,966	$y = 0,021x + 0,088$

8.2. Ολικά φαινολικά με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu



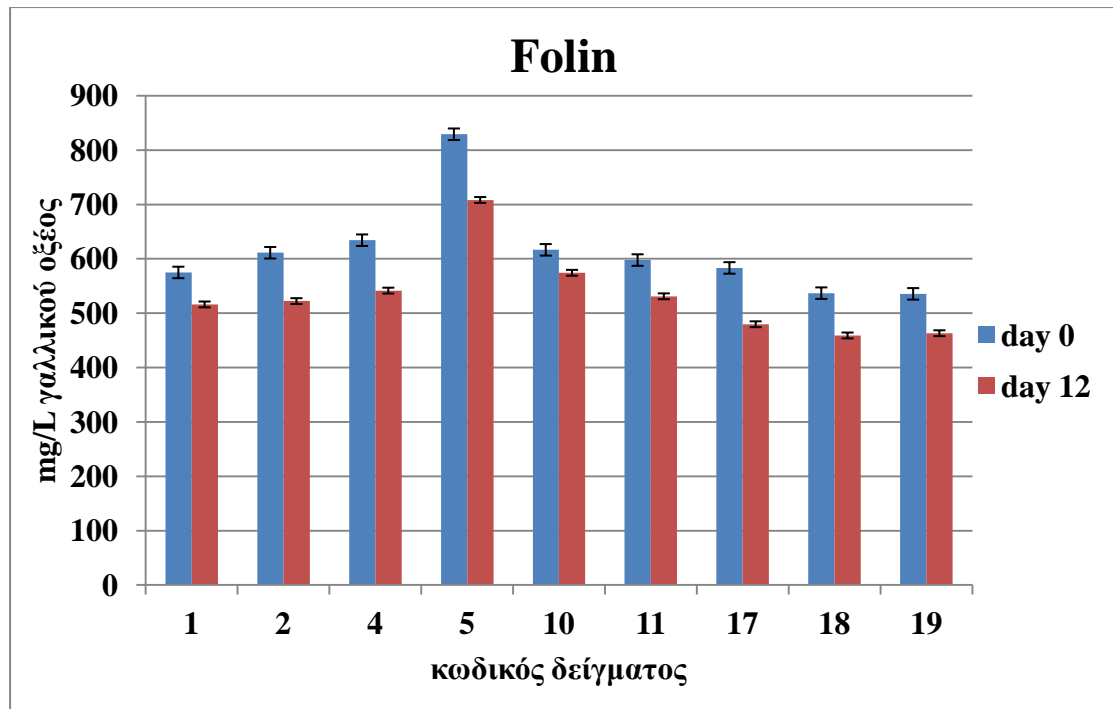
Εικόνα 31. Δείκτης φαινολικών ουσιών οίνων την ημέρα 1 (τιμές με διαφορετικά γράμματα a, b, c, είναι σημαντικά διαφορετικές, Fisher's LSD test, $p < 0,05$).

Στην Εικόνα 31 φαίνονται οι τιμές των ολικών φαινολικών με την μέθοδο Folin-Ciocalteu για την πρώτη ημέρα, με το δείγμα 5 (829,2 mg γαλλικού οξέος/L οίνου) να παρουσιάζει την μεγαλύτερη συγκέντρωση και σημαντικά διαφορετικές τιμές από όλα τα άλλα δείγματα. Την χαμηλότερη τιμή ολικών φαινολικών εκφρασμένη σε mg γαλλικού οξέος εμφανίζει το δείγμα 19 (535,6) και το δείγμα 18 (536,9) με σημαντική στατιστική διαφορά από τα υπόλοιπα δείγματα. Τα δείγματα 2, 4, 10, 11 δεν έχουν σημαντική διαφορά μεταξύ τους.



Εικόνα 32. Δείκτης φαινολικών ουσιών οίνων την ημέρα 12 (τιμές με διαφορετικά γράμματα a, b, c, d, e είναι σημαντικά διαφορετικές, Fisher's LSD test, $p < 0,05$).

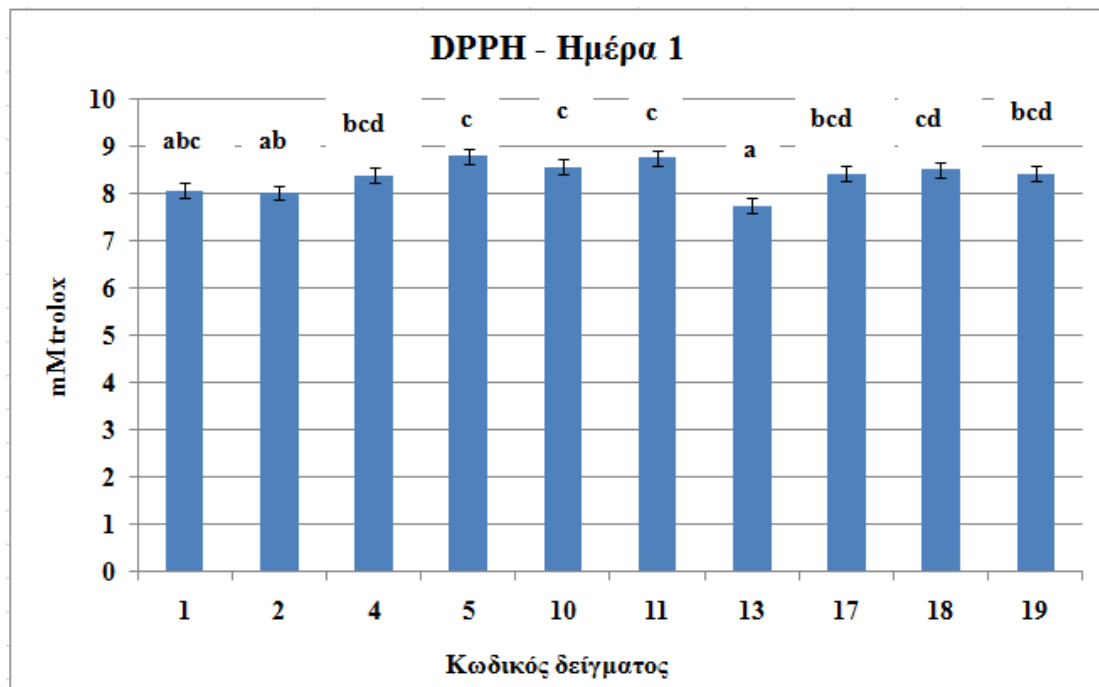
Στην Εικόνα 32 φαίνονται οι τιμές των ολικών φαινολικών με την μέθοδο Folin-Ciocalteu για την πρώτη ημέρα, με το δείγμα 5 (708,3 mg γαλλικού οξέος/L οίνου) να παρουσιάζει την μεγαλύτερη συγκέντρωση και σημαντικά διαφορετικές τιμές από όλα τα άλλα δείγματα. Την χαμηλότερη τιμή ολικών φαινολικών εκφρασμένη σε mg γαλλικού οξέος εμφανίζει το δείγμα 18 (459) και το δείγμα 19 (463) με σημαντική στατιστική διαφορά από τα υπόλοιπα δείγματα εκτός από το 19. Τα δείγματα 1, 2, 4, 11 δεν έχουν σημαντική διαφορά μεταξύ τους.



Εικόνα 33. Δείκτης φαινολικών ουσιών οίνων της πρώτης σε σχέση με τη δωδέκατη ημέρα όλων των δειγμάτων

Στην εικόνα 33 παρουσιάζεται η μεταβολή στις τιμές των ολικών φαινολικών με την μέθοδο Folin-Ciocalteu, για όλα τα δείγματα από την πρώτη μέχρι τη δωδέκατη ημέρα. Όπως φαίνεται στο διάγραμμα οι τιμές είναι σημαντικά υψηλότερες αρχικά σε όλα τα δείγματα και παρουσιάζουν πτώση μέχρι την ημέρα 12. Το δείγμα 5 έχει υψηλότερες τιμές τόσο στα ολικά φαινολικά, όσο και στη μελέτη κινητικής της αμαύρωσης δείχνοντας ότι η υψηλότερη συγκέντρωση φαινολικών ουσιών συσχετίζεται με τις αντιδράσεις αμαύρωσης.

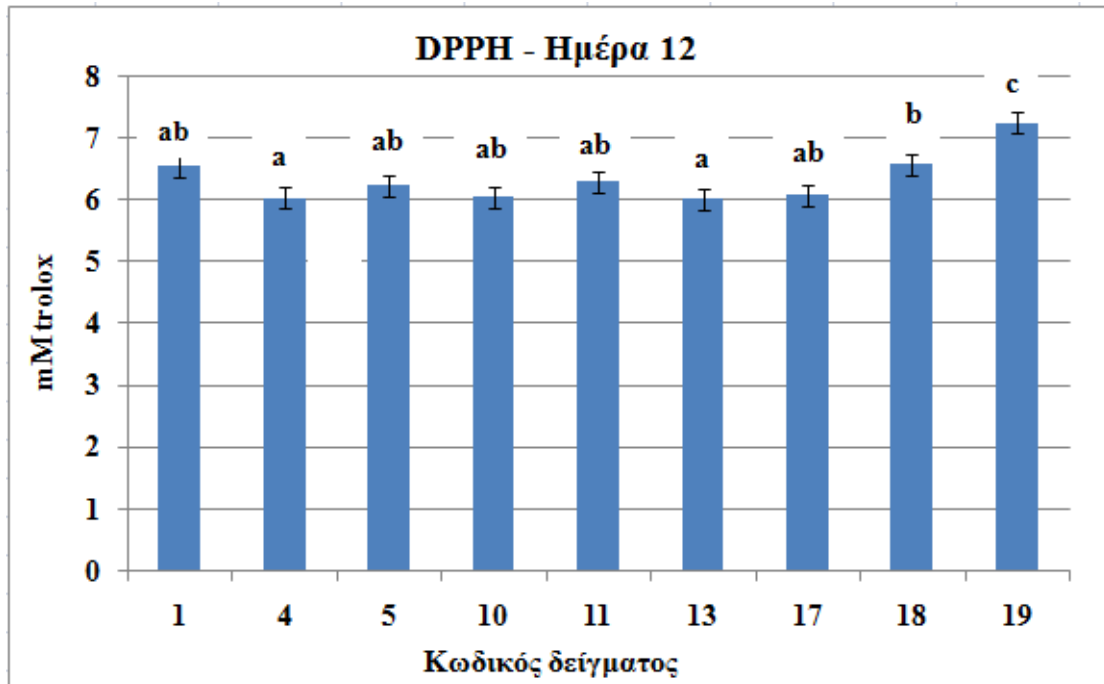
8.3. Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας – μέθοδος DPPH



Εικόνα 34. Αντιοξειδωτική ικανότητα οίνων την ημέρα 1 (mM Trolox) (τιμές με διαφορετικά γράμματα a, b, c, είναι σημαντικά διαφορετικές, Fisher's LSD test, $p < 0,05$).

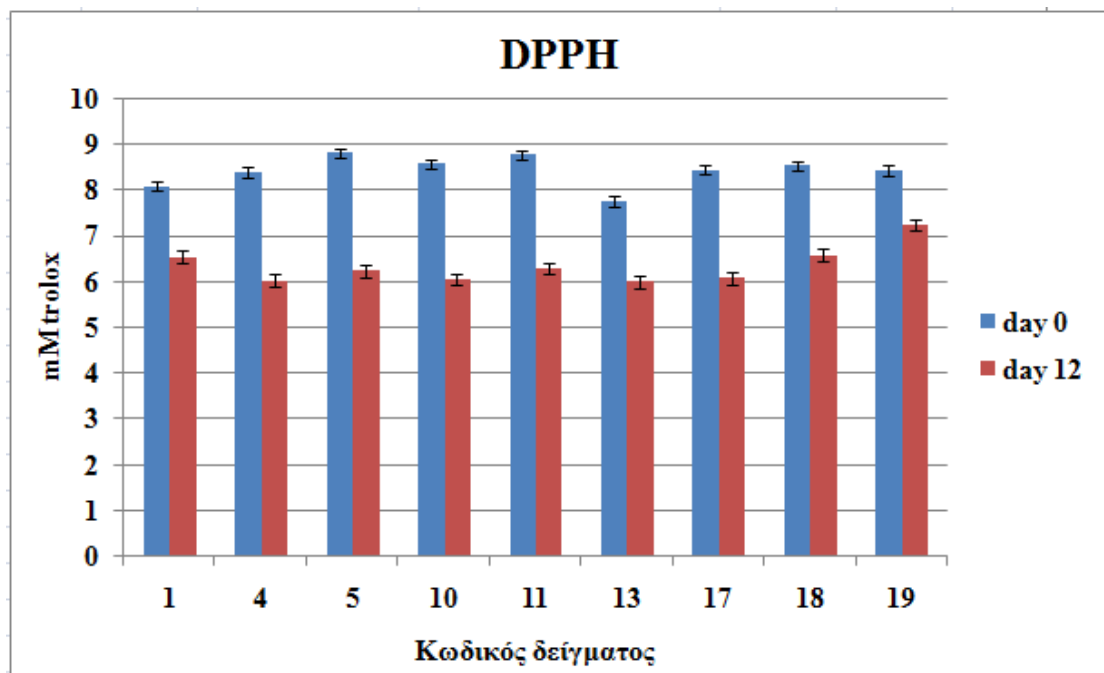
Ως αντιοξειδωτική ικανότητα χαρακτηρίζεται η ικανότητα κάποιας ένωσης να αναστέλλει ή να εμποδίζει την οξειδωτική υποβάθμιση. Στη συγκεκριμένη περίπτωση οι ενώσεις αυτές είναι τα φαινολικά συστατικά του οίνου. Για την εκτίμησή της χρησιμοποιήθηκε μία μέθοδος, η οποία στηρίζεται στην ικανότητα των φαινολικών ουσιών να δεσμεύουν μία σταθερή, ελεύθερη, οργανική ρίζα αζώτου, το 1,1 διφαινυλο-2-πικρυλ-υδραζύλιο (DPPH).

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των δειγμάτων για την πρώτη ημέρα παρουσιάζεται στην εικόνα 34 και όπως φαίνεται η υψηλότερη τιμή εμφανίζεται στο δείγμα 5 (8,80 mM trolox) με τα δείγματα 11 (8,77) και 10 (8,57) να ακολουθούν χωρίς σημαντική στατιστική διαφορά. Τη μικρότερη τιμή παρουσίασε το δείγμα 13 (7,76 mM trolox) με τα δείγματα 1 και 2 να ακολουθούν χωρίς σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι οι τιμές ολικών φαινολικών και αντιοξειδωτικής ικανότητας συσχετίζονται κυρίως στα δείγματα 5, 10 και 11 που εμφανίζουν τις υψηλότερες τιμές και στις δύο μετρήσεις.



Εικόνα 35. Αντιοξειδωτική ικανότητα οίνων την ημέρα 12 (mM Trolox) (τιμές με διαφορετικά γράμματα a, b, c, είναι σημαντικά διαφορετικές, Fisher's LSD test, $p < 0,05$).

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των δειγμάτων για τη δωδέκατη ημέρα παρουσιάζεται στην εικόνα 35 και όπως φαίνεται η υψηλότερη τιμή εμφανίζεται στο δείγμα 19 (7,23 mM trolox) με σημαντική στατιστική διαφορά από τα υπόλοιπα δείγματα. Τα υπόλοιπα δείγματα δεν είχαν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ τους κάτι που δείχνει ότι με την πάροδο των ημερών η αντιοξειδωτική ικανότητα του οίνου φτάνει στα ίδια επίπεδα.



Εικόνα 36. Αντιοξειδωτική ικανότητα οίνων της πρώτης σε σχέση με τη δωδέκατη ημέρα (mM Trolox)

Στη εικόνα 36 φαίνονται οι τιμές αντιοξειδωτικής ικανότητας της πρώτης σε σχέση με τη δωδέκατη ημέρα. Όπως φαίνεται οι τιμές αρχικά είναι υψηλές και στη δωδέκατη ημέρα πέφτουν, με την πτώση να είναι ιδιαίτερα εμφανής στα δείγματα 5, 10 και 11. Αντίθετα τα δείγματα 1 και 19 εμφάνισαν τη μικρότερη πτώση από την πρώτη ως τη δωδέκατη ημέρα.

Πίνακας 5. Αρχικές μετρήσεις αντιοξειδωτικής δράσης (mM trolox) και ολικών φαινολών (mg γαλλικού οξέος/L) των εξεταζόμενων δειγμάτων της ποικιλίας Μαλαγουζιά

Κωδικοί οίνων	Αντιοξειδωτική Ικανότητα (mM Trolox)	Κωδικοί οίνων	Ολικές φαινόλες (mg γαλλικού οξέος/L οίνου)
1	8,08±0,304	1	575±9,67
4	8,39±0,554	2	611,2±8,22
5	8,80±0,132	4	634,3±9,31
10	8,57±0,224	5	829,2±8,12
11	8,77±0,264	10	616,6±8,84
13	7,76±0,384	11	597,8±10,65
17	8,44±0,545	17	583,3±10,4
18	8,52±0,475	18	536,9±9,23
19	8,43±0,853	19	535,6±8,32

Πίνακας 6. Τελικές μετρήσεις αντιοξειδωτικής δράσης (mM trolox) και ολικών φαινολών (mg γαλλικού οξέος/L) των εξεταζόμενων δειγμάτων της ποικιλίας Μαλαγουζιά (μετά από 12 ημέρες πειραματισμού)

Κωδικοί οίνων	Αντιοξειδωτική Ικανότητα (mM Trolox)	Κωδικοί οίνων	Ολικές φαινόλες (mg γαλλικού οξέος/L οίνου)
1	6,541±0,239	1	516,1±6,1
4	6,015±0,208	2	522,3±5,3
5	6,230±0,110	4	541,5±5,0
10	6,044±0,131	5	708,3±6,2
11	6,284±0,320	10	574,3±6,2
13	6,001±0,195	11	531,1±5,9
17	6,072±0,076	17	479,7±5,4
18	6,570±0,878	18	459,0±5,4
19	7,236±0,093	19	463,2±5,1

Οι αρχικές τιμές μέτρησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας (Πίνακας 5) κυμάνθηκαν μεταξύ **6,001** και **7,23** ενώ οι αντίστοιχες τιμές των ολικών φαινολικών ενώσεων κυμάνθηκαν από 535,6 έως 829 mg γαλλικού οξέος/L. Με την πάροδο του χρόνου, παρατηρήθηκε μείωση της αντιοξειδωτικής δράσης σε όλα τα δείγματα όπως φαίνεται στον Πίνακα 6. Επίσης οι τιμές της συγκέντρωσης των ολικών φαινολών μειώθηκαν σε όλα τα δείγματα. Αυτό ίσως οφείλεται στις χημικές αντιδράσεις που

λαμβάνουν χώρα κατά την διάρκεια της θέρμανσης οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την αλλαγή της δραστηριότητας των φαινολικών ενώσεων με το αντιδραστήριο (Folin) που χρησιμοποιείται για την μέτρηση.

Πίνακας 7. Στατιστικές παράμετροι υπολογισμένοι μετά από ανάλυση παλινδρόμησης των ολικών φαινολικών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη σταθερά αμαύρωσης (k)

	R²	P
Follin	0,8656	0,0098
DPPH	0,2082	0,6426

Στον πίνακα 7 παρουσιάζονται οι στατιστικές παράμετροι που προκύπτουν από την ανάλυση παλινδρόμησης μεταξύ της συγκέντρωσης φαινολικών ουσιών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη σταθερά αμαύρωσης k. Από τη στιγμή που η τιμή P είναι μικρότερη από 0,05 υπάρχει στατιστική συσχέτιση μεταξύ των εξεταζόμενων παραμέτρων. Πιο συγκεκριμένα η μέτρηση Follin που αφορά τη συγκέντρωση φαινολικών ουσιών εκφρασμένη σε γαλλικό οξύ και η σταθερά αμαύρωσης έχουν μια γραμμική σχέση η οποία εκφράζεται από τη σχέση: $folin1 = 405,67 + 8,44335 * k$
Ο συντελεστής συσχέτισης αυτών των δύο παραμέτρων 0,94065 είναι κάτι που δείχνει ισχυρή συσχέτιση μεταξύ τους. Αντίθετα η μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας δεν φαίνεται να παρουσιάζει υψηλή συσχέτιση όπως φαίνεται και στον πίνακα 7.

8.4. Οξειδωσιμότητα οίνου

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της επί της εκατό (%) διαφοράς που εμφάνισε η απορρόφηση στα 420 nm των δειγμάτων αρχικά και μετά την πάροδο των 12 ημερών.

Πίνακας 8. Τιμές απορρόφησης των δειγμάτων της ποικιλίας Μαλαγουζιάς αρχικά και μετά την πάροδο 12 ημερών καθώς και επί τις εκατό διαφορά τους (%Δ.A_{420nm})

Κωδικός δειγμάτων	A _{420nm} αρχικό	A _{420nm} τελικό	%Δ.A _{420nm}
1	0,1344	0,3468	158,03
4	0,1393	0,4455	230,24
5	0,2309	0,7795	244,83
10	0,1286	0,3768	215,85
11	0,1083	0,3005	193,35
13	0,1683	0,3342	85,08
17	0,1061	0,3255	226,80
18	0,0969	0,2944	143,29
19	0,1339	0,3945	194,18

- οι τιμές εκφράζουν τον μέσο όρο ύστερα από τρεις επαναλήψεις

- η %Δ.Α δίνεται από τον τύπο:

$$\% \Delta . A (420) = [(A420_{\text{ΤΕΛΙΚΟ}} - A420_{\text{ΑΡΧΙΚΟ}}) / A420_{\text{ΑΡΧΙΚΟ}}] \times 100$$

Την μεγαλύτερη μεταβολή στον **πίνακα 8** παρουσιάζει το δείγμα **5** με $\Delta . A_{420\text{nm}} = 244,83$ και την μικρότερη τιμή την έχει το δείγμα **13** με $\Delta . A_{420\text{nm}} = 85,08$.

Στην συνέχεια μελετήθηκε η στατιστική συσχέτιση των τιμών της k με αναλυτικές παραμέτρους των οίνων που αφορούν την σύστασή τους. Στον πίνακα 9 παρουσιάζονται οι στατιστικά σημαντικά συσχετίσεις.

Πίνακας 9. Συντελεστές συσχέτισης μεταξύ των σταθερών τιμών αμαύρωσης (k) των δειγμάτων και της χημικής σύστασης των δειγμάτων

	Baume	pH	Συγκέντρωση Αμινοξέων	Συγκέντρωση Ολικού αζώτου
Σταθερά τιμή αμαύρωσης δειγμάτων (k)	,789*	,705*	,826**	,832**

** . Η συσχέτιση είναι στατιστικά σημαντική κατά 99.99%

* . Η συσχέτιση είναι στατιστικά σημαντική κατά 99.95%

Παρατηρούμε θετική συσχέτιση της σταθεράς αμαύρωσης με την τιμή του baume, του pH, της συγκέντρωσης των αμινοξέων και του ολικού αζώτου. Οι τιμές που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη της συσχέτισης παρουσιάζονται παρακάτω, στον Πίνακα 11. Στην εικόνα 37 παρουσιάζεται ο αμπελώνας και τα τμήματα από τα οποία προήρθαν τα δείγματα που αναλύθηκαν.



Εικόνα 37. Τα τμήματα του αμπελώνα που μελετήθηκαν χωρισμένα σε plots.

Στην **εικόνα 37**, παρατηρούμε τους κωδικούς οίνου του **πίνακα 8** με τον τρόπο που κατηγοριοποιούνται στον επιλεγμένο αμπελώνα του κτήματος Ρωξάνη Μάτσα, που βρίσκεται στην Κάντζα Αττικής. Το Κτήμα, συνολικής έκτασης 122 στρεμμάτων, καλλιεργείται σύμφωνα με τις αρχές της βιολογικής καλλιέργειας.

Στον πίνακα 10 παρουσιάζονται οι αρχικές τιμές της συγκέντρωσης σακχάρων, της ενεργούς και της ολικής οξύτητας για του κωδικούς δείγματος που μελετήθηκαν.

Πίνακας 10. Αρχικές μετρήσεις μούστου των εξεταζόμενων δειγμάτων

Κωδικός Δείγματος	Baume	pH	Οξύτητα (τρυγικό οξύ)
1	13,6	3,43	4,65
2	12,85	3,44	5,1
4	13,7	3,5	4,95
5	14,5	3,54	5,4
10	12,8	3,42	4,35
11	13,35	3,28	4,87
13	12,7	3,17	5,02
17	12,9	3,35	4,27
18	12,3	3,19	5,32
19	12,3	3,16	5,77

Πίνακας 11. Αποτελέσματα μετρήσεων των παρακάτω παραμέτρων στα διάφορα τμήματα του πειραματικού αγρού

Δείγμα	Baume	pH	Οξύτητα	Αμμωνιακά	Αμινοξέα	Ολικό άζωτο	Πτητική	Ανάγοντα	Ελεύθερο SO ₂
1	13,75	3,43	4,65	2,14	182,29	184,43	0,33	0,5475	10,24
4	13,75	3,5	4,95	2,3	185,97	188,27	0,15	0,596	10,24
5	14,9	3,54	5,4	2,3	224,91	227,21	0,216	0,497	10,24
10	13,4	3,42	4,35	2,59	129,9	132,49	0,213	0,535	7,68
11	13,7	3,28	4,87	2,44	122,92	125,36	0,303	0,5725	10,24
13	13,25	3,17	5,02	2,01	81,84	83,85	0,24	1,623	2,56
17	13,35	3,35	4,27	16,73	109,16	125,89	0,228	0,951	5,12
18	12,5	3,19	5,32	26,63	123,16	149,79	0,18	0,6975	7,68
19	12,75	3,16	5,77	27,33	99,99	127,32	0,249	0,385	7,68

9. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη του φαινομένου της οξειδωτικής αμαύρωσης στους λευκούς οίνους. Πρέπει να σημειωθεί το γεγονός ότι η θερμοκρασία πειράματος ($55^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$) η όποια εφαρμόστηκε στα δείγματα της ποικιλίας για 12 ημέρες δεν καθόρισε τις αντιδράσεις οξειδωτικής αμαύρωσης που θα λάμβαναν χώρα αλλά τον χρόνο πραγματοποίησής τους, μειώνοντας τον (Fernandez-Zurbano et al., 1995).

Με βάση τον **πίνακα 9** παρατηρούμε ότι η οξειδωτική αμαύρωση έχει θετική σχέση με την συγκέντρωση των ζαχάρων και το **pH** τα οποία παρατηρούνται στο νοτιοδυτικό κομμάτι του πειρατικού αγρού (μέγιστη τιμή αμαύρωσης το **δείγμα 5**).

Αυτό οφείλεται ίσως στις κύριες αντιδράσεις χημικής οξείδωσης που λαμβάνουν μέρος κατά την θέρμανση του γλεύκους ή κατά την αποθήκευση όπως είναι η καρραμελοποίηση και η αντίδραση Maillard, οι οποίες εξαρτώνται κατά πολύ από τις τιμές της θερμοκρασίας.

Η αντίδραση **Maillard**, είναι μια αντίδραση στην οποία εμπλέκονται τα αναγωγικά σάκχαρα, τα αμινοξέα και οι πρωτεΐνες και πραγματοποιείται κατά την διάρκεια της αποθήκευσης. Επιπλέον, ειδικές συνθήκες όπως η θερμοοινοποίηση και εμφιάλωση υπό υψηλές θερμοκρασίες, ευνοούν την αντίδραση. Αρκετές πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι σημαντικό ποσοστό πτητικών ενώσεων που είναι υπεύθυνο για το τυπικό άρωμα ή για το άρωμα παλαίωσης που αποκτούν ορισμένοι φυσικοί γλυκοί οίνοι κατά την παλαίωση, φαίνεται να συνδέεται με χημικές αντιδράσεις, όπως η Maillard, μεταξύ σακχάρων και αμινοξέων (Marchand, et al., 2002, Ferreira et al., 2011).

Η τιμή pH έχει άρρηκτη σχέση με την ενζυμική αμαύρωση καθώς επηρεάζει την δράση των πολυφαινολοξειδασών και τον πολυμερισμό των κινονών. Οι πολυφαινολοξειδάσες ενεργούν βέλτιστα σε τιμές pH μεταξύ 4 και 7 και παρουσιάζουν πολύ μικρή δραστηριότητα σε pH μικρότερα του 3. Είναι πιθανόν, η οξείδωση και ο πολυμερισμός των φαινολικών ενώσεων να ευνοούνται από υψηλότερες τιμές pH και αυτό να έχει ως αποτέλεσμα μεγαλύτερες απορροφήσεις στα 420 nm.

Όπως παρατηρήθηκε παραπάνω με την ανάλυση ολικών φαινολών τα κρασιά με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση σε ολικές φαινόλες είχαν και τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση κάτι που φαίνεται στα δείγματα 5, 10 και 11, συμπέρασμα το οποίο συμφωνεί και με τη μελέτη των Farkas et al., (2004).

Η ανάλυση παλινδρόμησης της μέτρησης Follin που αφορά τη συγκέντρωση φαινολικών ουσιών εκφρασμένη σε γαλλικό οξύ και της σταθεράς αμαύρωσης έχουν μια γραμμική σχέση με $R^2=0,8656$, εν αντιθέσει με τη μέτρηση DPPH που δεν έχει υψηλή συσχέτιση με τη σταθερά αμαύρωσης k.

Στην παρούσα εργασία οι μετρήσεις συμφωνούν απόλυτα με τα προαναφερόμενα για το λόγο ότι στο νοτιοδυτικό κομμάτι το οποίο εμφάνισε τις υψηλότερες τιμές pH και συγκεντρώσεις ζαχάρων τα δείγματα εμφάνισαν μεγαλύτερες τιμές αμαύρωσης σε σχέση με τα δείγματα του βορειοδυτικού τμήματος που παρουσίασαν μικρότερες τιμές. Πιο συγκεκριμένα το δείγμα 5 είχε τιμή Baume 14, τη μεγαλύτερη από όλα τα δείγματα και pH 3,54 δηλαδή μικρότερο του 4, pH στο οποίο είναι πιο δραστικές οι πολυφαινολοξειδάσες (**πίνακας 10**).

Με βάση τον πίνακα 9 παρατηρούμε ότι και **τα αμινοξέα** καθώς και το ολικό άζωτο συσχετίζονται θετικά με τις τιμές της σταθεράς αμαύρωσης. Προφανώς, η υπερβολική οξείδωση άλλων συστατικών με αντιοξειδωτική δράση θα μπορούσε να

προκαλέσει περαιτέρω διατάραξη της ισορροπίας οξειδοαναγωγής, με μάλλον αρνητικές συνέπειες για την αντιοξειδωτική ικανότητα των λευκών κρασιών, και το θέμα αυτό αξίζει μια πιο εκτεταμένη και σε βάθος μελέτη.

10. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Arno, J., Martinez-Casasnovas, J.A., Ribes-Dasi, M. & Rosell, J.R. (2009), Review: precision viticulture. Research topics, challenges and opportunities in site-specific vineyard management. *Spanish Journal of Agricultural Research* 7, 779-790.

Bisson, L. (2001), University of California at Davis, University Extension, Copyright 2001.

Blackmore, S., Godwin, R. & Fountas, S. (2003), The analysis of spatial and temporal trends in yield map data over six years. *Biosystems Engineering* 84 (4), 455-466.

Bowers, C.G., Roberson, G.T., Cassel, D.K., Naderman, G.C. & Brownie, C. (2001), Variable Rate Liquid Nitrogen Application for Cotton and Corn Production. ASAE Annual International Meeting, Sacramento, CA, ASAE Paper No. 01-1201.

Bramley, R.G.V., Le Moigne, M., Evian, S., Ouzman, J., Florin, L., Fadali, E.M., Hizne, C.J. and Cerovic, Z.G. (2011c), On the go sensing of grape berry anthocyanins during commercial harvest Development and prospects. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 17, 316–326.

Bramley, R G V., Trought, M.C.T. & Praat, J.P. (2011a), Vineyard variability in Marlborough, New Zeland: characterizing variation. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 17, 72-78.

Bramley, R.G.V and Hamilton, R.P. (2007b), Terroir is a scale-dependent and manageable attribute. In: Blair RJ, Williams PJ and Pretorius IS (eds), Proceedings of the Thirteenth Australian Wine Industry Technical Conference, *Australian Wine Industry Technical Conference*, Inc., Adelaide, SA, 367–368.

Bramley, R.G.V and Williams, S.K. (2001), A protocol for the construction of yield maps from

data collected using commercially available grape yield monitors, *Cooperative Research Centre for Viticulture*, Adelaide, SA, available at: www.cse.csiro.au/client_serv/resources/CRCVYield_Mapping_Protocol.pdf (accessed November 2009).

Bramley, R.G.V. and Hamilton, R.P. (2007a), Terroir and Precision Viticulture: Are they compatible? *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, **41**, 1–8.

Bramley, R.G.V. and Hamilton, R.P. (2005), Hitting the zone – making viticulture more precise. In: R.J. Blair, P.J. Williams & I.S. Pretorius (Eds.), *Proceedings of the 12th Australian Wine Industry Technical Conference*, 57-61. Winetitles, Adelaide SA.

Bramley, R.G.V. (2005), Understanding variability in winegrape production systems 2. Within vineyard variation in quality over several vintages. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11, 33–45.

Bramley, R.G.V., Ouzman, J. and Thorton, C. (2011b), Selective harvesting is a feasible and profitable strategy even when grape and wine production is geared towards large fermentation volumes. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 17, 298–305.

Bramley, R.G.V. (2005), Understanding variability in winegrape production systems 2. Within vineyard variation in quality over several vintages. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11, 33–45.

Cozzolino, D., Cowey, G., Lattey, K. A., Godden, P., Cynkar, W. U., Damberg, R. G., Janik, L. J. and Gishen, M. (2008b), Relationship between wine quality scores and visible – near infrared spectra in Australian red wines, *Anal Bioanal Chem*, 391, 975–981.

Cozzolino, D., Smyth H. E., Lattey, K. A., Cynkar, W., Janik, L., Damberg, R. G., Francis, I. L. and Gishen, M. (2005b), Relationship between sensory analysis and near

infrared spectroscopy in Australian Riesling and Chardonnay wines, *Anal Chim Acta*, 539, 341–348.

Elms, M.K. & Green, C.J. (1997). Spatial variability of yield in irrigated cotton. In: Dugger P. & Richter D.A. (Eds.), *Proceedings Beltwide Cotton Conference* (pp. 598-600), 6-10 January 1997, New Orleans, LA. National Cotton Council of America, Memphis, TN.

Farkas Orsolya, Judit Jakus and Károly Héberger * *Molecules* 2004, 9, 1079-1088

Ferreira, V., Lopez, R., Escudero, A., and Cacho, J.F. (1998), The aroma of Grenache red wine: Hierarchy and nature of its main odorants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77, 259-267.

Francis, I. L. and Newton, J. L. (2005), Determining wine aroma from compositional data, *Aust J Grape Wine Res*, 11, 114–126.

Gishen, M., Damberg, R. G. and Cozzolino, D. (2005), Grape and wine analysis - enhancing the power of spectroscopy with chemometrics. A review of some applications in the Australian wine industry, *Aust J Grape Wine Res*, 11, 296–305.

Huang, Y. B., Lan Yi-Bin, and Lacey, R. E. (2004), Artificial senses for characterization of food quality, *J Bionics Eng*, 3, 159–173.

Jellema, R. H., Janssen, A. M., Terpstra, M. E. J., de Wijk, R. A. and Smilde, A. K. (2005), Relating the sensory sensation ‘creamy mouthfeel’ in custards to rheological measurements, *J Chemometrics*, 19, 191–200.

Johnson, H. and Robinson, J. (2001), *The World Atlas of Wine*. 5th edition. Mitchell Beazley: London.

Laville P. (1990), Le terroir, un concept indispensable à l’élaboration et à la protection des

appellations d'origine comme à la gestion des vignobles: le cas de la France. *Bulletin de L'O.I.V.*, **709-710**, 217-241.

Martens, M. (1999), A philosophy for sensory science, *Food Qual Prefer*, 10, 233-244.

Martin, S.R and Dunn, G.M. (2000), Effect of pruning time and hydrogen cyanamide on budburst and subsequent phenology of *Vitis vinifera* L. variety Cabernet Sauvignon in central Victoria. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 6(1), 31-39.

Martinez-Casasnovas, J.A., Agelet-Fernandez, J., Arno, J. and Ramos, M.C. (2012), Analysis of vineyard differential management zones and relation to vine development, grape maturity and quality. *Spanish Journal of Agricultural Research* **10**(2), 326-337.

McCauley, J.D. (1999), Simulation of Cotton Production for Precision Farming. *Precision Agriculture* 1, 81-94.

McKinion, J.M., Jenkins, J.N., Akins, D., Turner, S.B., Willers, J.L., Jallas, E. & Whisler, F.D. (2001), Analysis of a precision agriculture approach to cotton production. *Computers and Electronics in Agriculture* 32, 213-228.

Olivier (1800/1 – 1807), Voyage dans l' Empire Ottoman, l' Egypt et la Perse, fait par ordre du Gouvernement pendant les six premieres annees de la Republique, 6 τόμοι, Paris 1800/1-1807.

Papageorgiou, E.I., Aggelopoulou, K.D., Gemtos, T.A. and Nanos, G.D. (2013), Yield prediction in apples using Fuzzy Cognitive Map learning approach. *Computers and Electronics in Agriculture* 91, 19-29

Plutowska, B., and Wardencki, W. (2007), Aromagrams – Aromatic profiles in the appreciation of food quality. *Food Chemistry*, 101, 845-872.

Reynolds, A. G., (2010), *Managing Wine Quality. Volume 1: viticulture and wine quality.* Woodhead Publishing Limited.

Reynolds, A.G, Senchuk, I.V., van der Reest, C. and de Savigny, C. (2007), Use of GPS and GIS

for elucidation of the basis for terroir: variation in an Ontario Riesling vineyard.

American

Journal of Enology and Viticulture, **58**, 145–162.

Santesteban, L.G., Guillaume, S., Royo, J.B. and Tisseyre, B. (2013), Are precision agriculture tools and methods relevant at the whole-vineyard scale. *Precision Agriculture* 14, 2–17.

Seguin, G. (1986), ‘Terroirs’ and pedology of wine growing. *Experientia*, 42, 861-872.

Smyth, H. E. (2005), The Compositional Basis of the Aroma of Riesling and Unwooded Chardonnay Wine, PhD Thesis, University of Adelaide, SA, Australia.

Sudduth, K.A., Kitchen, N.R., Wiebold, W.J., Batchelor, W.D., Bollero, G.A., Bullock, D.G., Clay, D.E., Palm, H.L., Pierce, F.J., Schuler, R.T. and Thelen, K.D. (2005), Relating apparent electrical conductivity to soil properties across the North-Central USA. *Computers and Electronics in Agriculture*, 46, 263–283.

Taylor, J. A. (2004), Digital Terroirs and Precision Viticulture: Investigations into the application of information technology in Australian vineyards. A thesis submitted to University of Sidney. Australian Centre for Precision Agriculture. MMIV.

Tisseyre, B. & McBratney, A.B. (2007), A technical opportunity index based on mathematical morphology for site-specific management using yield monitor data: application to viticulture. In: *Proceedings of the 6th European Conference on Precision Agriculture*, Skiathos, Greece.

van Leeuwen, C., Friant, P., Choné, X., Tregoat, O., Koundouras, S. and Dubourdieu, D. (2004), Influence of climate, soil and cultivar on terroir. *American Journal of Enology and Viticulture*, **55**, 207–217.

van Wyk, C.J., Augustyn O.P.H., de Wet P., Joubert A., (1979), Isoamylacetate- akey fermentation volatile of wines of *V. vinifera* cv. Pinotage Am. J. Enol. Vitic. 2, 71-81.

White, E.(2003), *Soils for Fine Wines*. Oxford University Press, New York.

Wilson, J.E. (1998), *Terroir: The role of Geology, Climate and Culture in the making of French wines*. Mitchell: Beazley, London.

Zeemann, W., Snyman, J.P., van Wyk, C.J. (1980), The Influence of Yeast strain and malolactic fermentation on some volatile Bouquet Substances and on Quality of Table wines, *Grape and Wine Centennial. Symp.Proceedings*, Davis, 79-90.

Βουκίδης, Ε. Ι. (2014), “Μελέτη Αρωματικών Συστατικών Οίνων λευκών ποικιλών με χρήση Χρωματογραφίας - Ολφακτομετρίας”. Μεταπτυχιακή Ερευνητική Μελέτη. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.

Δήμου, Φ. Ε. (2012), “Μελέτη των πτητικών συστατικών που συμμετέχουν στο άρωμα των οίνων από τις ερυθρές ποικιλίες Ξινόμαυρο και Μαυροτράγανο”. Μεταπτυχιακή Ερευνητική Μελέτη. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.

Καλύβα, Φ. (2014), “Εφαρμογή Γεωργίας Ακριβείας σε αμπελώνα της Νεμέας”. Μεταπτυχιακή Ερευνητική Μελέτη. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.

Κουράκου Σ. (1997), *Οιηρές Επιλογές*. Εκδόσεις Τροχαλία, Αθήνα.

Κουράκου Σ. (2000), *Τα Κυριακάτικα της Σταυρούλας Κουράκου*. Εκδόσεις Στάχυ, Αθήνα.

Κουράκου Σ. (1998), *Θέματα Οινολογίας*. Εκδόσεις Τροχαλία, Αθήνα.

Σουφλερός Η. Ε. (2012), *Οινολογία. Επιστήμη και Τεχνογνωσία*. Εκδόσεις Θεσσαλονίκη.

Σταυρακάκης Ν.Μ. (2013)., *Αμπελουργία*. Εκδόσεις Τροπή, Αθήνα.

Σταύρακας Ε. Δ. (2010), *Αμπελογραφία*. Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη.

Τάσκος, Γ. Δ. (2012), *Τεχνολογίες Γεωργίας Ακριβείας στην Αμπελουργία*. Πρακτικά 1^{ης} Αμπελουργικής Συνάντησης, Καπανδρίτι.

Τραγάκης, Α.-Χ.(2014), “Σύγχρονη διαχείριση αμπελώνων με χρήση συστημάτων πληροφορικής και τηλεπικοινωνιών στο πλαίσιο εφαρμογής γεωργίας ακριβείας”.

Διδακτορική διατριβή , Εργαστήριο Γεωργικής Μηχανολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Βόλος.

Χατζημιχάλης Δ. (1995), Αμπελουργείν. Κτήμα Χατζημιχάλη-Φάρμα Αταλάντης Αγροτική Α.Ε, Αθήνα.

Biau S., Dumon M.C., Glories Y.and Vercauteren J., Actualites (Enologiques 95, 5th International Symposium Enologie, Bordeaux, p. 649, 1 996

Brand-Williams, W., Cuvelier M.E. and Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel- Wissenschaft und -Technologie/ Food science and Technology, 28:25-30

Carla Maria Oliveira, Antonio C.S. Ferreira, Victor De Freitas, Artur M.S. Silva, 2011. Oxidation mechanisms occurring in wines. Food Research f nternation al 44, 1 1 1 5-1 126

Cheynier, V.F., Trousdale, e.k., Singleton, V. L., Salgues, M. J., Wylde, R., (1986). Characterization of 2-S-glutathioylcaftaric acid and it's hydrolysis in relation to grape wines. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 34, 217-221.

Cheynier, V. F., Van Hulst, M. W. J. (1988). Oxidation of trans-caftaric acid and 2-S-glutathioylcaftaric acid in model solutions. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 36. 10-15.

Cheynier, V., Fulcrand, H., Guyot, S., Oszmianski, J., & Moutounet, M. (1995). Reactions of enzymically generated quinones in relation to browning in grape musts and wines C. Y. Lee & J. R. Whitaker (Eds.). Enzymatic browning and its prevention. ACS Symposium Series, 600, 1 30-1 43.

Danilewicz, J. C. (2003). Review of reaction mechanisms of oxygen and proposed intermediate reduction products in wine: Central role of iron and copper. American Journal of Enology and Viticulture, 54(2), 73-85.

Danilewicz, J. C. (2007). Interaction of sulfur dioxide, polyphenols, and oxygen in a wine-model system: Central role of iron and copper. American Journal of Enology and Viticulture, 58(1), 53-60.

7L

Danilewicz, J. C., Secombe. J.T., & Whelan, J. (2008). Mechanism of interaction of polyphenols, oxygen and sulfur dioxide in model wine. American Journal of Enology and Viticulture, 59, 128-136.

Dubernet, M., Ribereau-Gayon, P. (1973). Presence et signification dans les moutes et les vins de la tyrosine du raisin. *Connaissance de la vigne et du vin*, 7,283-302.

Es-Safi, N. E., Le Guerneve', C., Fulcrand, H., Cheynier, V., & Moutounet, M. (1999). New polyphenolic compounds with xanthylium skeletons formed through reaction between (+)-catechin and glyoxylic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 (1 2), 521 1 -5217 .

Fabio Chinnici, Francesca Sonni, Nadia Natali, Claudio Riponi, 2012. Oxidative evolution of (+)-catechin in model wine solutions containing sulfur dioxide, ascorbic acid or gallotannins. *Food Research International* 2-5

Fernandez-Zurbano, P., Ferreirâ,V., Pen-a, C., Escudero,4., Serrano, F., & Cacho, J. (1995). Prediction of oxidative browning in white wines as a function of their chemical composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(1 1'), 2813-28'17 .

a Fulcrand, H., Cheynier, V., Oszmianski, J., & Moutounet, M. (1997). An oxidized tartaric acid residue as a new bridge potentially competing with acetaldehyde in flavan-3-ol condensation. *Phytochemistry*, 46(2), 223-227

Fulcrand, H., Duenas, M., Salas, E., & Cheynier, V. (2006). Phenolic reactions during winemaking and aging. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(3), 289-297

a Galet, P.: *Les maladies et les parasites de la vigne*. Paysan du Midi, Montpellier, France, 1977

Klimartin, P.A., Zou, H., Waterhouse, A. L.,(2001). A cyclic voltammetry method suitable for characterizing antioxidant properties of wine and wine phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1957-1965.

a Hua Li, Anque Guo, Hua Wang, 2008. Mechanisms of oxidative browning of wine. *Food Chemistry* 108, 1-13

Marchand, S., De Revel, G., & Alain Bertrand, J. V. (2002). Possible mechanism for involvement of cysteine in aroma production in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 6160-6164
72

Maria-loanna Salacha, Stamatina Kallithraka & Irini Tzourou, 2007. Browning of white wines: correlation with antioxidant characteristics, total polyphenolic composition and flavanol content. *International Journal of Food Science and Technology* 2008, 43,1073-1077

Moran, J. F., Klucas, R. V., Grayer, R. J., Abian, J., & Becana, M. (1997). Complexes of iron with phenolic compounds from soybean nodules and other legume tissues: Prooxidant and antioxidant properties. *Free Radical Biology and Medicine*, 22(5), 861 -870.

Nikos Sioumis, Stamatina Kallithraka, Dimitris P. Makris, Panagiotis

Kefalas 2004. Kinetics of browning onset in white wines: influence of principal redox-active polyphenols and impact on the reducing capacity. *Food Chemistry* 94 (2006), 98-104

Stamatina Kallithraka, Maria-Ioanna Salacha & Irini Tzourou, 2008. Changes in phenolic composition and antioxidant activity of white wine during bottle storage: Accelerated browning test versus bottle storage. *Food Chemistry* 113 (2009), 500-505.

Oszmianski, J., Cheynier, V., & Moutounet, M. (1996). Iron-catalyzed oxidation of (+)catechin in model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(7), 1712-1715.

Ribereau-Gayon P. (1965) *C.R. Acad. Sciences*, 260, 341
a Ribereau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2000). *Handbook of enology. The chemistry of wine stabilization and treatments (Vol. 2)*. Chichester, England: John Wiley and Sons Ltd.

Rigaud, J., Cheynier, V., Souquet, J. M., & Moutounet, M. (1991). Influence of must composition on phenolic oxidation kinetics. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 57(1), 55-63.

a Robards, K., Prenzler, P. D., Tucker, G., Swatsitang, P., & Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, 66(4), 401-436.

Salgues, M., Cheynier, V., Gunata, A., & Wylde, R. (1986). Oxidation of grape juice 2-S-glutathionylcaffeoyltartaric acid by *Botrytis cinerea* laccase and characterization of a new substance: 2,5-di-S-glutathionylcaffeoyltartaric acid. *Journal of Food Science*, 51, 1191-1194.

Sapis J.-C (1967). *These de Docteur en Enologie*, Universite de Bordeaux II
Scollary, G. R. (2002). Factors determining wine oxidation: The critical role of ascorbic acid. National Wine & Grape Industry Centre. Final report 73 to Grape and Wine Research & Development Corporation, 31 May 2002.

Singleton, V. L., & Kramling, T.E. (1976). Browning of white wines and an accelerated test for browning capacity. *American Journal of Enology and Viticulture*, 27, 157-160.

Singleton, V. L. (1987). Oxygen with phenols and related reactions in musts, wines, and model systems: Observations and practical implications. *American Journal of Enology and Viticulture*, 38(1), 69-77.

Singleton, V. L. A. (2000). Survey of wine ageing reactions, especially with oxygen. *Proceedings of the ASEV 50th Anniversary Annual Meeting* (pp. 323-336). Davis, California: American Society for Enology and Viticulture.

Wang, Z. (1990). *Food enzymology*. Beijing: China Light Industry Press.

Waterhouse, A. L., & Laurie, V. F. (2006). *Oxidation of wine phenolics: A*

critical evaluation and hypotheses. American Journal of Enology and Viticulture, 57(3), 306-313.

Yang, X., Wang, Y., & Chen, L. (2003). Chemistry of tea polyphenols' Shanghai: Science and Technology Press of Shanghai.

Zhu, M., Li, W., & Guo, O. (1983). Wine enology (revised ed.). Beijing: Light Industry Press.

Πηγές από διαδίκτυο
www.winesofathens.gr
www.boutari.gr

11. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 10. Αποτελέσματα μετρήσεων των παρακάτω παραμέτρων στα διάφορα τμήματα του πειραματικού αγρού.

Δείγμα	Baume	pH	Οξύτητα	Αμμωνιακά	Αμινοξέα	Ολικό άζωτο	Πτητική	Ανάγοντα	Ελεύθερο SO ₂
1	13,75	3,43	4,65	2,14	182,29	184,43	0,33	0,5475	10,24
4	13,75	3,5	4,95	2,3	185,97	188,27	0,15	0,596	10,24
5	14,9	3,54	5,4	2,3	224,91	227,21	0,216	0,497	10,24
10	13,4	3,42	4,35	2,59	129,9	132,49	0,213	0,535	7,68
11	13,7	3,28	4,87	2,44	122,92	125,36	0,303	0,5725	10,24
13	13,25	3,17	5,02	2,01	81,84	83,85	0,24	1,623	2,56
17	13,35	3,35	4,27	16,73	109,16	125,89	0,228	0,951	5,12
18	12,5	3,19	5,32	26,63	123,16	149,79	0,18	0,6975	7,68
19	12,75	3,16	5,77	27,33	99,99	127,32	0,249	0,385	7,68

