



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΙΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
I) ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΑ II) ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Προσθήκη τανινών γιγάρτων και φλοιών σε ερυθρούς οίνους:
μελέτη της μεταβολής της αντιοξειδωτικής δράσης και της χημικής τους σύστασης

Ανδρέας Α. Μπενέκης

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:

Καλλίθρακα Σταματίνα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΓΠΑ

**ΑΘΗΝΑ
2022**

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΙΝΟΛΟΓΙΑΣ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Προσθήκη τανινών γιγάρτων και φλοιών σε ερυθρούς οίνους:
μελέτη της μεταβολής της αντιοξειδωτικής δράσης και της χημικής τους σύστασης

“Addition of tannins of grape seeds and skins to red wines:
study of the change of antioxidant activity and their chemical composition”

Ανδρέας Α. Μπενέκης

Εξεταστική Επιτροπή:

Καλλίθρακα Σταματίνα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΓΠΑ (επιβλέπουσα)

Μανούρας Αθανάσιος, Καθηγητής Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Παπάς Χρήστος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Προσθήκη τανινών γιγάρτων και φλοιών σε ερυθρούς οίνους: μελέτη της μεταβολής της αντιοξειδωτικής δράσης και της χημικής τους σύστασης

*ΠΜΣ Σύγχρονη Τεχνολογία Τροφίμων I) Γαλακτοκομία II) Οινολογία
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου
Εργαστήριο Οινολογίας*

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε προσθήκη ταννινών φλοιών και γιγάρτων σε διαφορετικές αναλογίες σε διάλυμα προσομοίωσης οίνου (Model Wine) και σε ερυθρό οίνο. Τα δείγματα των φλοιών και γιγάρτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη προέρχονται από σταφύλια της ποικιλίας Λημνιώνα, ενώ με βάση την ένταση του χρώματος, τον δείκτη φαινολικών ουσιών (ΔΦΟ) και τον προσδιορισμό των ταννινών με την μέθοδο της MCP ο κατάλληλος χρόνος εκχύλισης ήταν οι 48 ώρες.

Στόχος του πειράματος ήταν να μελετήσει την συμβολή της προσθήκης διαφορετικών αναλογιών ταννινών φλοιών και γιγάρτων στην ένταση και σταθεροποίηση του χρώματος, την αντιοξειδωτική δράση και τέλος σε ορισμένα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και συγκεκριμένα στην ένταση, την απόχρωση, την στυπτικότητα και την πικρή γεύση.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η προσθήκη αναλογιών με μεγαλύτερο ποσοστό φλοιών οδηγεί σε σταδιακή αύξηση της έντασης του χρώματος και των ανθοκυανών. Αντίθετα, η προσθήκη αναλογιών με μεγαλύτερο ποσοστό γιγάρτων οδηγεί σε σταδιακή αύξηση των ταννινών, της στυπτικότητας και της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Επίσης, η προσθήκη όλων των αναλογιών φλοιών όσο και γιγάρτων οδήγησε σε μείωση της πικρής γεύσης στα δείγματα του οίνου.

Επιστημονική περιοχή: Οινολογία

Λέξεις κλειδιά: Ερυθρός οίνος, Λημνιώνα, Φλοιοί, Γίγαρτα, Φαινολικά συστατικά, Ανθοκυάνες, Ταννίνες, Αντιοξειδωτική δράση

Addition of tannins of grape seeds and skins to red wines: study of the change of antioxidant activity and their chemical composition

*MSc Current Food Technology I) Dairy Science & Technology II) Oenology
Department of Food Science & Human Nutrition
Laboratory of Oenology*

ABSTRACT

In the present study grape skin and seed tannins were added in different proportions to model wine and red wine. The samples of grape skins and seeds used in the present study come from grapes of the variety Limniona, while based on the color intensity, the phenolic index and the determination of tannins by the method of MCP the appropriate extraction time was 48 hours.

The aim of the experiment was to study the contribution of the addition of different proportions of grape skins and seeds tannins to the intensity and stabilization of the color, the antioxidant activity and finally in certain organoleptic characteristics and specifically in the intensity, the hue, the astringency and the bitter taste.

The results indicated that the addition of proportions with a higher percentage of grape skins leads to a gradual increase in the intensity of color and anthocyanins. In contrast, the addition of proportions with a higher percentage of grape seeds leads to a gradual increase in tannins, astringency and antioxidant activity. Also, the addition of all proportions of grape skins, as well as grape seeds led to a reduction of the bitter taste in the wine samples.

Scientific area: Oenology

Key words: Red wine, Limniona, Grape skins, Grape seeds, Phenolic compounds, Anthocyanins, Tannins, Antioxidant activity

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στο εργαστήριο Οινολογίας του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών κάτω από την επίβλεψη της Καθηγήτριας του Τμήματος Δρ. Καλλίθρακα Σταματίνας, την οποία και θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως για την ανάθεση της συγκεκριμένης εργασίας και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε για τη διεκπεραίωσή της καθώς και για τον χρόνο που διέθεσε όποτε χρειάστηκα τη βοήθεια της.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στην κα. Νίκη Προξενιά για την επιστημονική καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια του πειραματικού μέρους της μελέτης αλλά και σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου για τη συνεργασία και ιδιαιτέρως στην υποψήφια διδάκτωρ Στεφανία Χριστοφή.

Επιπροσθέτως να ευχαριστήσω όλους τους καθηγητές του μεταπτυχιακού προγράμματος για τις γνώσεις που μου παρείχαν σε όλη την διάρκεια των σπουδών μου.

Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω το οινοποιείο Κοντοζήση στην Καρδίτσα για τη διάθεση των δειγμάτων σταφυλιών και οίνου που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου για τη στήριξη και τη βοήθεια που μου παρείχαν όλα αυτά τα χρόνια.

Με την άδεια μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ΓΠΑ και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και πρωτοτυπία της.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΜΕΡΟΣ Ι: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	11
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΆΜΠΕΛΟΣ, ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΣΥΣΤΑΣΗ ΡΑΓΑΣ.....	11
1. ΤΟ ΦΥΤΟ ΤΗΣ ΑΜΠΕΛΟΥ	11
2. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΡΑΓΑΣ	11
3. ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΡΑΓΑΣ.....	14
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	15
1.1. ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΟΞΕΑ.....	17
1.2. ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ	18
1.3. ΑΝΘΟΚΥΑΝΕΣ.....	19
1.4. ΤΑΝΝΙΝΕΣ	21
2. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ.....	25
3. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΤΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ	25
3.1. ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΠΑΡΑΜΟΝΗΣ ΤΩΝ ΣΤΕΜΦΥΛΩΝ ΜΕ ΤΟ ΓΛΕΥΚΟΣ	26
3.2. ΡΥΘΜΟΣ ΔΙΑΒΡΟΧΗΣ ΤΩΝ ΣΤΕΜΦΥΛΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΓΛΕΥΚΟΣ	27
3.3. ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ.....	28
3.4. ΔΙΘΑΝΟΛΗ.....	29
3.5. ΘΕΙΩΔΗΣ ΑΝΥΔΡΙΤΗΣ	29
3.6. ΆΛΛΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	30
4. ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ	31
5. ΜΕΣΟΣ ΒΑΘΜΟΣ ΠΟΛΥΜΕΡΙΣΜΟΥ (MDP) ΤΑΝΝΙΝΩΝ	33
6. ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΠΡΟΑΝΘΟΚΥΑΝΙΔΙΝΩΝ.....	36
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Η ΠΟΙΚΙΛΙΑ ΛΗΜΝΙΩΝΑ	38
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ ΜΕΘΟΔΩΝ ΑΝΑΛΥΣΗΣ.....	39
1. ΈΝΤΑΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΣ	39
2. ΔΕΙΚΤΗΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ (ΔΦΟ)	40
3. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΑΝΝΙΝΩΝ – METHYL CELLULOSE PRECIPITABLE (MCP).....	41
4. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΑΝΝΙΝΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ BSA (ΔΕΣΜΕΥΣΗ ΑΠΟ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ – ΔΕΙΚΤΗΣ ΣΤΥΠΤΙΚΟΤΗΤΑΣ).....	41
5. ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ DPPH.....	42
6. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΘΟΚΥΑΝΩΝ (ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΑ)	43
7. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΘΟΚΥΑΝΩΝ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC)	43
ΜΕΡΟΣ ΙΙ: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ – ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	45
1. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΣ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ	45
2. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	45
3. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΩΝ ΦΛΟΙΩΝ ΚΑΙ ΠΙΓΑΡΤΩΝ.....	46
4. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗΣ ΟΙΝΟΥ (MODEL WINE) ΚΑΙ ΟΙΝΟΥ.....	47
5. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ	48

6.	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΤΑΣΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΣ.....	49
7.	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΚΤΗ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ (ΔΦΟ)	50
8.	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΑΝΝΙΝΩΝ – METHYL CELLULOSE PRECIPITABLE (MCP)	50
9.	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΑΝΝΙΝΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ BSA (ΔΕΣΜΕΥΣΗ ΑΠΟ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ – ΔΕΙΚΤΗΣ ΣΤΥΠΤΙΚΟΤΗΤΑΣ) 54	
10.	ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ DPPH.....	58
11.	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΘΟΚΥΑΝΩΝ (ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΑ).....	61
12.	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΘΟΚΥΑΝΩΝ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC)	62
13.	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΕΣΟΥ ΒΑΘΜΟΥ ΠΟΛΥΜΕΡΙΣΜΟΥ (MDP) ΤΑΝΝΙΝΩΝ ΜΕ HPLC	65
-	ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ (SOLID PHASE EXTRACTION, SPE)	65
-	ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΡΗΛΟΡΟΓΛΟΥΚΙΝΟΛ.....	66
-	HPLC.....	67
-	ΠΡΟΤΥΠΗ ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΦΟΡΑΣ.....	67
14.	ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ.....	68
15.	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	69
	ΜΕΡΟΣ ΙΙΙ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	70
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	70
1.	ΒΑΡΟΣ ΡΑΓΩΝ – ΝΩΠΟ ΚΑΙ ΞΗΡΟ ΒΑΡΟΣ ΦΛΟΙΩΝ ΚΑΙ ΓΙΓΑΡΤΩΝ	70
2.	ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΩΝ ΦΛΟΙΩΝ ΚΑΙ ΓΙΓΑΡΤΩΝ.....	70
3.	ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ	71
4.	ΈΝΤΑΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΣ	74
4.1	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ MODEL WINE.....	74
4.2	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΟΙΝΟΥ	75
5.	ΔΕΙΚΤΗΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ (ΔΦΟ)	76
5.1	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ MODEL WINE.....	76
5.2	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΟΙΝΟΥ	77
6.	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΑΝΝΙΝΩΝ – METHYL CELLULOSE PRECIPITABLE (MCP)	78
6.1	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ MODEL WINE.....	78
6.2	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΟΙΝΟΥ	79
7.	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΑΝΝΙΝΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ BSA (ΔΕΣΜΕΥΣΗ ΑΠΟ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ – ΔΕΙΚΤΗΣ ΣΤΥΠΤΙΚΟΤΗΤΑΣ) 80	
7.1	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ MODEL WINE.....	80
7.2	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΟΙΝΟΥ	81
8.	ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ DPPH.....	82
8.1	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ MODEL WINE.....	82
8.2	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΟΙΝΟΥ	83
9.	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΘΟΚΥΑΝΩΝ (ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΑ)	84
9.1	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ MODEL WINE.....	84
9.2	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΟΙΝΟΥ	85
10.	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΘΟΚΥΑΝΩΝ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ (HPLC)	85

10.1	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ MODEL WINE.....	86
10.2	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΟΙΝΟΥ	88
11.	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΕΣΟΥ ΒΑΘΜΟΥ ΠΟΛΥΜΕΡΙΣΜΟΥ (MDP) ΤΑΝΝΙΝΩΝ ΜΕ ΗPLC	90
11.1	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ MODEL WINE.....	90
11.2	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΟΙΝΟΥ	92
12.	ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ.....	95
12.1	Ένταση χρώματος	95
12.2	Αποχρώση	96
12.3	Πικρή γεύση	97
12.4	Στυπτικότητα	98
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	100
1.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	100
2.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	101
3.	ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ - ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ.....	103
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	104

ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Δομή της ράγας (Πηγή: Kennedy, 2002).....	14
Εικόνα 2.. Δομή φαινόλης (Πηγή: Bravo, 1998)	16
Εικόνα 3. Γενική μορφή ανθοκυανών και οι σημαντικότερες ανθοκυάνες που συναντώνται στα σταφύλια και τους οίνους (Πηγή: Ribéreau-Gayon, et al., 2006)	21
Εικόνα 4. Μόριο υδρολυόμενης ταννίνης (Πηγή: Krause, et al., 2005)	23
Εικόνα 5. Μόριο συμπυκνωμένων ταννινών (Πηγή: Tsuruta, et al., 2011).....	24
Εικόνα 6. Αντίδραση μίας προανθοκυανιδίνης με τη φλωρογλουκινόλη (πηγή: Lorrain, et al., 2013)	34
Εικόνα 7. Βότρυς ποικιλίας Λημνιάνα (φωτογραφία από δείγμα για την παραλαβή φλοιών και γιγάρτων).....	39
Εικόνα 8. Χρωματογράφημα του δείγματος οίνου 100-0, όπου παρουσιάζονται αναλυτικά οι κορυφές των επιμέρους ανθοκυανών καθώς επίσης ο οξικός εστέρας της μαλβιδίνης (Malv. Ac) και ο κουμαρικός εστέρας της μαλβιδίνης (Malv. Coum).....	86

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Ποσότητες προσθήκης σκόνης φλοιών και γιγάρτων σε δείγματα model wine.....	47
Πίνακας 2. Ποσότητες προσθήκης σκόνης φλοιών και γιγάρτων σε δείγματα οίνου.....	48
Πίνακας 3. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς MCP	52
Πίνακας 4. Αποτελέσματα πρότυπης καμπύλης αναφοράς MCP.....	53
Πίνακας 5. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς BSA.....	56
Πίνακας 6. Αποτελέσματα πρότυπης καμπύλης αναφοράς BSA.....	57
Πίνακας 7. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς DPPH	59
Πίνακας 8. Αποτελέσματα πρότυπης καμπύλης αναφοράς DPPH	60
Πίνακας 9. Βαθμονόμηση HPLC για τον προσδιορισμό των ανθοκυανών	62
Πίνακας 10. Πρότυπη καμπύλη μαλβιδίνης για τον προσδιορισμό των ανθοκυανών με HPLC	63
Πίνακας 11. Αποτελέσματα πρότυπης καμπύλης αναφοράς Μαλβιδίνης	64
Πίνακας 12. Βαθμονόμηση HPLC για τον προσδιορισμό του μέσου βαθμού πολυμερισμού (mDP).....	67
Πίνακας 13. Σχετική γραμμομοριακή απόκριση (relative molar response) ανά μονομοριακή φλαβαν-3-όλη αλλά και για τα προϊόντα διάσπασης της αντίδρασης με φλωρογλουκινόλη (-P).....	68
Πίνακας 14. Μέσος όρος βάρους ραγών – νωπού και ξηρού βάρους φλοιών και γιγάρτων	70
Πίνακας 15. Μέσος όρος βάρους φαινολικών συστατικών φλοιών και γιγάρτων.....	70
Πίνακας 16. Κωδικοποίηση δειγμάτων.....	71

ΠΙΝΑΚΑΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Γράφημα 1. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς MCP.....	54
Γράφημα 2. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς BSA	58
Γράφημα 3. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς DPPH.....	61
Γράφημα 4. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς Μαλβιδίνης.....	65
Γράφημα 5. Μεταβολή έντασης χρώματος με τον χρόνο εκχύλισης.....	72
Γράφημα 6. Μεταβολή δείκτη φαινολικών ουσιών με τον χρόνο εκχύλισης	73
Γράφημα 7. Μεταβολή των ταννινών που προσδιορίστηκαν με την μέθοδο της MCP με τον χρόνο εκχύλισης.....	73
Γράφημα 8. Ένταση χρώματος στα δείγματα του model wine. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukaey's test, $p<0.05$).....	74
Γράφημα 9. Ένταση χρώματος στα δείγματα του οίνου. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukaey's test, $p<0.05$).....	75
Γράφημα 10. Δείκτης φαινολικών ουσιών στα δείγματα του model wine. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukaey's test, $p<0.05$)	76
Γράφημα 11. Δείκτης φαινολικών ουσιών στα δείγματα του οίνου. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukaey's test, $p<0.05$).....	77
Γράφημα 12. MCP στα δείγματα του model wine. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukaey's test, $p<0.05$)	78
Γράφημα 13. MCP στα δείγματα του οίνου. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukaey's test, $p<0.05$)	79
Γράφημα 14. BSA στα δείγματα του model wine. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukaey's test, $p<0.05$)	80
Γράφημα 15. BSA στα δείγματα του οίνου. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukaey's test, $p<0.05$)	81
Γράφημα 16. DPPH στα δείγματα του model wine. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukaey's test, $p<0.05$)	82
Γράφημα 17. DPPH στα δείγματα του οίνου. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukaey's test, $p<0.05$)	83
Γράφημα 18. Συγκέντρωση ανθοκυανών στα δείγματα του model wine. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukaey's test, $p<0.05$)	84

Γράφημα 19. Συγκέντρωση ανθοκυανών στα δείγματα του οίνου. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukaey's test, $p<0.05$).....	85
Γράφημα 20. Συγκέντρωση μαλβιδίνης στα δείγματα του model wine. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukaey's test, $p<0.05$).....	86
Γράφημα 21. Συγκέντρωση των επιμέρους ανθοκυανών στα δείγματα του model wine. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukaey's test, $p<0.05$).....	87
Γράφημα 22. Συγκέντρωση μαλβιδίνης στα δείγματα του οίνου. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukaey's test, $p<0.05$).....	88
Γράφημα 23. Συγκέντρωση των επιμέρους ανθοκυανών στα δείγματα του οίνου. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukaey's test, $p<0.05$).....	89
Γράφημα 24. Μέσος βαθμός πολυμερισμού (mDP) στα δείγματα του model wine. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukaey's test, $p<0.05$).....	90
Γράφημα 25. Ποσοστό εστεροποίησης με γαλλικό οξύ (%G) στα δείγματα του model wine. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukaey's test, $p<0.05$).....	91
Γράφημα 26. Μέσος βαθμός πολυμερισμού (mDP) στα δείγματα του οίνου. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukaey's test, $p<0.05$).....	92
Γράφημα 27. Ποσοστό εστεροποίησης με γαλλικό οξύ (%G) στα δείγματα του model wine. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukaey's test, $p<0.05$).....	93
Γράφημα 28. Ένταση χρώματος στα δείγματα του οργανοληπτικού ελέγχου. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukaey's test, $p<0.05$).....	95
Γράφημα 29. Απόχρωση στα δείγματα του οργανοληπτικού ελέγχου. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukaey's test, $p<0.05$).....	96
Γράφημα 30. Πικρή γεύση στα δείγματα του οργανοληπτικού ελέγχου. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους	

(Tukey's test, $p < 0.05$)	97
Γράφημα 31. Συμπικτότητα στα δείγματα του οργανοληπτικού ελέγχου. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$)	98
Γράφημα 32. Παρουσίαση των οργανοληπτικών αποτελεσμάτων των δειγμάτων του οίνου	99

Μέρος I: Εισαγωγή

Κεφάλαιο 1: Άμπελος, μορφολογία και σύσταση ράγας

1. Το φυτό της αμπέλου

Η άμπελος είναι ένα φυτό που ανήκει στην οικογένεια *Vitaceae*, με σημαντικότερο είδος το *Vitis Vinifera* το οποίο και αποτελεί το 90% της παγκόσμιας παραγωγής σταφυλιών (Soleas και συν., 1997). Το *Vitis vinifera* θεωρείται ότι είναι ένα από τα πρώτα φυτά που ξεκίνησε να καλλιεργεί ο άνθρωπος και υπάρχουν ιστορικές αναφορές που φανερώνουν ότι η συστηματική καλλιέργειά του άρχισε πριν από περίπου 6.000 χρόνια (Soleas et al., 1997).

2. Μορφολογία της ράγας

Η ράγα (Εικόνα 1) αποτελεί τον καρπό της αμπέλου (Τσέτουρας, 2009), ενώ ως καρπός περιλαμβάνει από το εσωτερικό προς το εξωτερικό: το φλοιό (περικάρπιο), τη σάρκα (μεσοκάρπιο και ενδοκάρπιο) και τα γίγαρτα που περιβάλλονται από το ενδοκάρπιο (Κουράκου-Δραγώνα, 1998; Σουφλερός, 2000).

Ο φλοιός αντιπροσωπεύει ένα ποσοστό περίπου 10-20% από το συνολικό βάρος της ράγας. Πρόκειται για ένα δερματώδες σύστημα που αποτελείται από την εφυμενίδα, την εξωτερική επιδερμίδα του περικαρπίου και το κολλεγχυματικό υπόδημα (Considine and Knox, 1979, 1981). Επιπροσθέτως, αποτελείται από ιστούς που είναι πλούσιοι σε βιταμίνη C και που αποτελούνται από ουσίες που συνεισφέρουν σημαντικά στο χρώμα, το άρωμα και τη γεύση. (Mullins, et al., 1990).

Η εφυμενίδα καλύπτεται από ένα πολύ λεπτό στρώμα κηρώδων λεπίων που καλείται κέρινη ή κηρώδης ανθηρότητα. Ο σχηματισμός της κηρώδους ανθηρότητας ξεκινάει 3 εβδομάδες μετά την άνθιση, με την εμφάνιση μικρών, απλών, υδρόφοβων κηρωδών πλακών των οποίων το μέγεθος, ο αριθμός και η πολυπλοκότητά τους αυξάνει καθώς οι ραγές ωριμάζουν. Το πάχος

τους κυμαίνεται από 1,6 έως 3,8 μm και μειώνεται ελαφρώς κατά την πορεία ανάπτυξης των ραγών. Ο κηρός αυτός αποτελείται κυρίως από ολεανικό οξύ (79%) και από μαλακό κηρό ο οποίος αποτελείται από μεγάλης αλύσσου αλκοόλες, λιπαρά οξέα, ίχνη εστέρων, αλδεΐδες και παραφίνες. Η κηρώδης ανθηρότητα συμβάλλει στην ελκυστικότητα της ράγας, παρεμποδίζει την απώλεια νερού από τις ράγες, ενισχύει την άμυνα κατά των εγκαυμάτων που προκαλούνται από τις ηλιακές ακτίνες, συμβάλλει στην αντοχή τους από προσβολές από παθογόνα και έντομα, συντελεί στην ταχεία απομάκρυνση της βροχής και συγκρατεί τους ζυμομύκητες. Επίσης, περιέχει συστατικά με μεγάλη θρεπτική αξία για τους ζυμομύκητες.

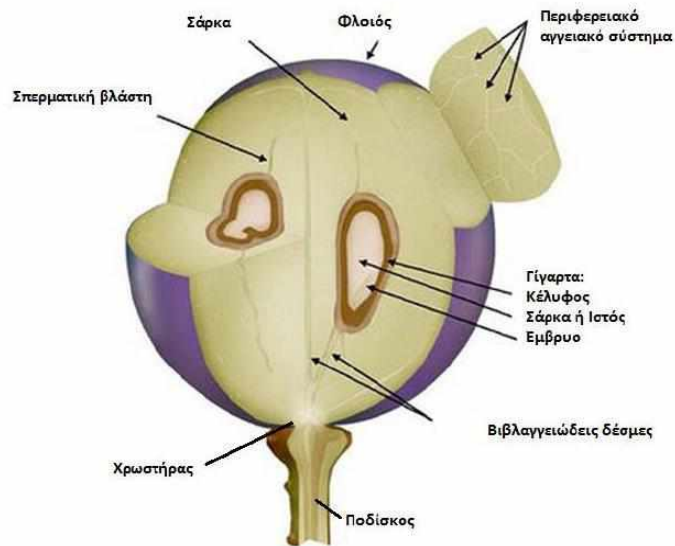
Η επιδερμίδα αποτελείται από μία ή δύο στοιβάδες εφαπτόμενων, επιμηκυμένων κυττάρων και είναι το στρώμα του φλοιού στο οποίο περιέχονται αρωματικές και πρόδρομες αρωματικές ενώσεις, χαρακτηριστικές της κάθε ποικιλίας.

Το υπόδερμα αποτελείται από 6 έως 10 στοιβάδες κυττάρων, από τις οποίες οι 2-3 πρώτες περιέχουν τις ανθοκυάνες ή τις φλαβόνες, χρωστικές στις οποίες οφείλεται το χρώμα των ερυθρών και των λευκών σταφυλιών αντιστοίχως. Το υπόδερμα περιλαμβάνει δύο ευδιάκριτες περιοχές: την εξωτερική, η οποία αποτελείται από 9 ορθογώνια κύτταρα, και η εσωτερική περιοχή, η οποία αποτελείται από πολυγωνικά κύτταρα.

Το μεγαλύτερο ποσοστό της ράγας αποτελεί από τη **σάρκα**, η οποία αποτελείται από 20 με 25 ή και περισσότερες στιβάδες πενταγωνικών ή εξαγωνικών κυττάρων με πολύ λεπτές μεμβράνες (Κουράκου-Δραγώνα, 1998). Όσο η σάρκα αναπτύσσεται, οι μεμβράνες αυτές αυξάνουν κατά 3 έως 8 φορές και γεμίζουν με κυτταρικό χυμό. Τα σταφύλια που προέρχονται από οινοποιήσιμες ποικιλίες αποτελούνται από λεπτά και εύθραυστα τοιχώματα κυττάρων, κυρίως στις πρώτες στοιβάδες έτσι ώστε να μπορεί να διαμορφωθεί κάτω από το φλοιό μια πλήρης ζώνη υγρού που δύναται να απελευθερωθεί με την παραμικρή ρήξη του φλοιού (Σουφλερός, 2000). Κεντρικά της σάρκας εντοπίζεται χώρος (ενδοκάρπιο), ο οποίος

διαχωρίζεται από τα μεσαία στρώματα (μεσοκάρπιο) και περιβάλλει τα γίγαρτα (Νικολάου, 2008).

Τα **γίγαρτα** αποτελούν ένα ποσοστό περίπου 10% από το συνολικό βάρος των ραγών. Πρόκειται για όργανα με τα οποία αναπαράγεται το φυτό της αμπέλου και εντοπίζονται στο ενδοκάρπιο, το οποίο δε διαχωρίζεται με σαφή τρόπο από τη σάρκα. Απαρτίζονται από το οξύ μέρος, το οποίο αποκαλείται ως ράμφος και από το ωοειδές τμήμα, το οποίο αποκαλείται ως σώμα. Ένα αυλάκι διαχωρίζει το σώμα σε δύο λοβούς. Αν κάνουμε μία τομή σε ένα γίγαρτο παρατηρούμε ότι απαρτίζεται από ένα ζωντανό τμήμα, το οποίο αποκαλείται ως σάρκα ή ιστός και προστατεύεται εξωτερικά από το κέλυφος. Εσωτερικά στη σάρκα εντοπίζεται το έμβρυο (Σουφλερός, 2009). Τόσο το μέγεθος όσο και το σχήμα των γιγάρτων καθορίζεται από το είδος της αμπέλου (Σταυρακάκης, 2013). Γενικά, είναι πλούσια σε φαινολικά συστατικά (ταννίνες και μονομερείς κατεχίνες) τα οποία συνεισφέρουν στις ταννίνες του κρασιού (5-8%). Θεωρητικά σε κάθε ράγα μπορεί να περιέχονται έως και 4 γίγαρτα, αφού η ωοθήκη του άνθους σχηματίζεται έπειτα από ένωση δύο καρπόφυλλων, το κάθε ένα από τα οποία περιέχει δύο σπερματικές βλάστες. Ωστόσο δεδομένου ότι δεν αναπτύσσονται ομοίως και οι 4 σπερματοβλάστες, σπανίως η ράγα εμφανίζεται να περιέχει 4 γίγαρτα, επομένως συνήθως αποτελείται από 1 έως 3 γίγαρτα (Κουράκου-Δραγώνα, 1998).



Εικόνα 1. Δομή της ράγας (Πηγή: Kennedy, 2002)

3. Χημική σύσταση ράγας

Ο **φλοιός** αν και αποτελεί ένα πολύ μικρό ποσοστό του βάρους της ράγας, είναι το μέρος εκείνο της σταφυλής που εντοπίζονται οι οργανικές ουσίες (χρωστικές ενώσεις, αρωματικές ενώσεις, συστατικά γεύσης και ταννίνες), που εντοπίζονται στις διάφορες ποικιλίες αμπέλου και είναι αυτές που διαμορφώνουν έπειτα τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των οίνων (Κουράκου-Δραγώνα, 1998; Grainger & Tattersall, 2005). Το νερό αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος του φλοιού (75 – 80% w/w). Επιπλέον, εντοπίζονται ταννίνες 1 έως 2% w/w, όξινες ενώσεις 1 έως 1,5% w/w, ανόργανες ενώσεις 1,5 έως 2% w/w, αζωτούχες ενώσεις 1,5 έως 2% w/w και λοιπές ενώσεις 10 έως 15% w/w. (Σουφλερός, 2000; Τσέτουρας, 2009). Το 33% του συνόλου των φαινολικών συστατικών προέρχονται από το φλοιό (στο κόκκινο σταφύλι) (Krithika, Naik & Pragalyaashree, 2015).

Τα σημαντικότερα συστατικά της **σάρκας** είναι τα εξής: νερό (60-80% w/w) και ακολουθούν τα σάκχαρα (κυρίως φρουκτόζη και γλυκόζη 10-30% w/w). Επίσης, περιέχονται και άλλες ουσίες (5-6% w/w). Ορισμένες τέτοιες ουσίες είναι τα οργανικά οξέα (κυρίως τρυγικό και μηλικό), οι αζωτούχες ουσίες (διαλυτές πρωτεΐνες, αμμωνία και αμινοξέα), τα ανόργανα

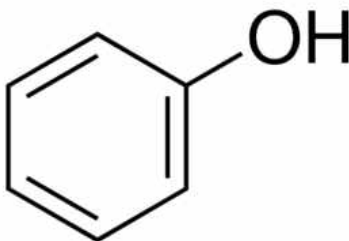
συστατικά (κατιόντα μετάλλων, κυρίως καλίου), οι πηκτινικές ύλες (δομικά στοιχεία των κυτταρικών τοιχωμάτων από πολυμερή των πολυγαλακτουρονικών οξέων), οι αρωματικές ουσίες, οι χρωστικές (σε βαφικές ποικιλίες) καθώς και τα μη φλαβονοειδή φαινολικά συστατικά (παράγωγα του βενζοϊκού και κινναμωμικού οξέος). Το 10% του συνόλου των φαινολικών συστατικών της ράγας αποτελείται από τα φαινολικά συστατικά της σάρκας (Watson, 2003; Σουφλερός, 2009).

Όσον αφορά τα **γίγαρτα** η χημική τους σύσταση αποτελείται από νερό σε ποσοστό 25 έως 45% w/w, υδατάνθρακες 34 έως 36% w/w, έλαια 13 έως 20% w/w, ταννίνες 4 έως 6% w/w, αζωτούχες ενώσεις 4 έως 6,5% w/w, ανόργανα στοιχεία 2 έως 4% w/w και λιπαρά οξέα 1% w/w (Σουφλερός, 2000; Νικολάου, 2008). Κατά τη διάρκεια της οινοποίησης αρκετές είναι οι φαινολικές ενώσεις των γιγάρτων (κυρίως ταννίνες) που εκχυλίζονται στον οίνο, ενώ τα έλαια των γιγάρτων μπορούμε να τα παραλάβουμε με διάφορα μέσα εκχύλισης έτσι ώστε να χρησιμοποιηθούν στην τεχνολογία ή βιομηχανία των τροφίμων (Νικολάου, 2008). Τα γίγαρτα παρουσιάζουν το μεγαλύτερο ποσοστό (62%) σε φαινολικές ενώσεις (σε ερυθρό σταφύλι) (Krithika, *et al.*, 2015), ενώ τα περισσότερα από αυτά είναι μονομερή φλαβαν-3-όλης (κατεχίνες) και προανθοκυανιδίνες ή συμπυκνωμένες ταννίνες (Sun, *et al.*, 1999).

Κεφάλαιο 2: Φαινολικά συστατικά

Φαινολικά ενώσεις ή αλλιώς φαινόλες ονομάζονται οι ενώσεις εκείνες που στο μόριό τους περιέχουν τη χαρακτηριστική ομάδα φαινόλης (Σουφλερός, 1997). Πρόκειται για ένα αρωματικό δακτύλιο, που αποτελείται από έναν ή περισσότερους υποκαταστάτες υδροξυλίου, και κυμαίνονται από απλά φαινολικά μόρια έως μεγάλου βαθμού πολυμερισμού ενώσεις (Bravo, 1998). Ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες: τις φλαβονοειδής και τις μη φλαβονοειδής φαινόλες. Στην κατηγορία των φλαβονοειδών φαινολών υπάγονται οι πολυμοριακές φαινόλες με βασικό

χημικό τύπο C₆-C₃-C₆ , ο οποίος αντιστοιχεί στη φλαβανόνη, και αποτελούνται από δύο βενζοϊκούς δακτυλίους συνδεδεμένους με ένα ετεροκυκλικό δακτύλιο πυριλίου που περιέχει οξυγόνο. Η κατηγορία των μη φλαβονοειδών φαινολών εμπεριέχει μονομοριακά φαινολικά παράγωγα τα οποία απαντούν στους φυτικούς ιστούς και σε διάφορα φυτικά προϊόντα (Ribéreau-Gayon, et al., 2000).



Εικόνα 2.. Δομή φαινόλης (Πηγή: Bravo, 1998)

Τα φαινολικά συστατικά έχουν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην παραγωγή οίνου, διότι συμβάλλουν τόσο στο χρώμα όσο και τις αποχρώσεις των οίνων, αλλά και στα γευστικά τους χαρακτηριστικά. Επιπροσθέτως, συμβάλλουν στο αρωματικό προφίλ των οίνων και είναι υπεύθυνα για τις αρνητικές ή θετικές επιδράσεις στην ποιότητα κατά τη διάρκεια της τόσο της συντήρησης όσο και της παλαίωσης. Αυτές οι επιδράσεις μπορεί να είναι το καφέτιασμα των λευκών οίνων και η εμφάνιση του καστανού θολώματος, που συμβαίνουν όταν δεν προστατεύονται τα φαινολικά συστατικά από τις οξειδώσεις ή ο εξευγενισμός κατά την ωρίμανση υπό κατάλληλες συνθήκες. Οι αλλοιώσεις στο χρώμα και τους οργανοληπτικούς χαρακτήρες των οίνων οφείλονται στις χημικές και ενζυμικές οξειδωτικές δράσεις στις φαινολικές ενώσεις (Κουράκου-Δραγώνα , 1998). Τα φαινολικά μόρια των οίνων προέρχονται από διαφορετικά σημεία του σταφυλιού και εκχυλίζονται σε όλη τη διάρκεια της οινοποίησης. Επιπροσθέτως, ποσότητα φαινολικών ενώσεων εκχυλίζεται στον οίνο και μέσω του ξύλου των βαρελιών, αλλά και κάποιες μικρές ποσότητες μπορούν να σχηματιστούν και από τον μεταβολισμό των ζυμών (Jackson, Lombard, 1993). Η δομή των φαινολικών ουσιών εμφανίζει

ωστόσο αλλαγές κατά την διάρκεια της παλαίωσης σε δεξαμενή, βαρέλι ή φιάλη ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν (Ribéreau-Gayon, et al., 2000).

Η τεχνική οινοποίησης που θα εφαρμοστεί παίζει σημαντικό ρόλο στην εκχύλιση των φαινολικών από τα διάφορα σημεία του σταφυλιού και στις μετέπειτα αντιδράσεις των ενώσεων αυτών, καθορίζοντας έτσι σε μεγάλο βαθμό την φαινολική σύσταση του οίνου. Επομένως, γνωρίζοντας την δομή των φαινολικών ενώσεων που υπάρχουν στο σταφύλι και την εξέλιξη τους κατά την διάρκεια της οινοποίησης και παλαίωσης μπορούμε να καθορίσουμε την τεχνική οινοποίησης που θα ακολουθήσουμε.

Οι φαινολικές ενώσεις των οίνων διαχωρίζονται σε φαινολικά οξέα (100-200 mg/L σε ερυθρούς οίνους και 10-20 mg/L σε λευκούς), φλαβανοειδείς φαινόλες (100 mg/L για ερυθρούς και 1-3 mg/L σε λευκούς), ανθοκυάνες (100-700 mg/L σε ερυθρούς ενώ δεν απαντώνται σε λευκούς) και τέλος σε ταννίνες (1-4 g/L σε ερυθρούς και 100 mg/L σε λευκούς) (Τσακίρης, 2014).

1.1. Φαινολικά οξέα

Τα φαινολικά οξέα που περιέχονται στη σταφυλή και τον οίνο αποτελούν παράγωγα του βενζοϊκού (C6 - C1) και του κινναμωμικού (C6 – C3) οξέος. Τα συναντάμε σε συγκεντρώσεις από 100 έως 200 mg/L σε ερυθρούς οίνους και 10 έως 20 mg/L σε λευκούς. Ταυτοποιήθηκαν 7 παράγωγα του βενζοϊκού οξέος, είτε σε μορφή γλυκοζιτών, είτε σε μορφή εστέρων, είτε σε ελεύθερη κατάσταση και 4 παράγωγα του κινναμωμικού οξέος, κυρίως με τη μορφή έξι εστέρων με τρυγικό οξύ, ενώ μόνο μικρές ποσότητες εντοπίζονται σε ελεύθερη μορφή (Ribéreau-Gayon, et al., 2006).

Δύο από τα επτά βενζοϊκά οξέα έχουν ταυτοποιηθεί και συγκεκριμένα το σαλικυλικό (ορθό – υδρόξυ – βενζοϊκό οξύ) και γεντισικό (2,5 – διυδρόξυ – βενζοϊκό οξύ), τα οποία εντοπίζονται

σε ίχνη. Τα οξέα αυτής της ομάδας έχουν διαφορές μεταξύ τους ως προς την υποκατάσταση του βενζολικού δακτυλίου. Στη σταφυλή τα βρίσκουμε με την μορφή γλυκοζιτών και απελευθερώνονται με υδρόλυση σε όξινο περιβάλλον, αλλά και με την μορφή των εστέρων όπου απελευθερώνονται με υδρόλυση σε αλκαλικό περιβάλλον. Οι πιο διαδομένες, ιδιαίτερα στους ερυθρούς οίνους, είναι οι ελεύθερες μορφές των συστατικών αυτών, εξαιτίας αντιδράσεων υδρόλυσης και θερμικής αποδιοργάνωσης των πιο σύνθετων μορίων, ιδιαίτερα των ανθοκυανών (Ribereau-Gayon, et al., 2006). Ορισμένα από τα κινναμωμικά οξέα συναντώνται και στη ράγα αλλά και στον οίνο. Κυρίως βρίσκονται εστεροποιημένα με το τρυγικό οξύ, συναντώνται όμως και σε μικρές ποσότητες σε ελεύθερη μορφή. Ωστόσο υπάρχει και η περίπτωση να βρίσκονται με την μορφή των απλών γλυκοζιτών. Οι εστέρες που σχηματίζουν με το τρυγικό οξύ, και κυρίως το καφεϊκό και το π-κουμαρικό, είναι ευοξειδωτά συστατικά του γλεύκους και μπορούν να προκαλέσουν καφέτιασμα στο γλεύκος λευκών σταφυλιών. Τα κινναμωμικά οξέα συμπλοκοποιούνται με τις ανθοκυάνες και έτσι οδηγούν στον σχηματισμό των ακυλιωμένων ανθοκυανών, μέσω της εστεροποίησης του καφεϊκού ή π-κουμαρικού οξέος με το γλυκοζίτη της ανθοκυάνης (Ribereau-Gayon, et al., 2006).

Τα φαινολικά οξέα παρότι είναι άχρωμα σε αλκοολικό διάλυμα, αν οξειδωθούν θα προσδώσουν κίτρινο χρώμα. Αν και δεν προσδίδουν χαρακτηριστικό άρωμα ή γεύση αποτελούν πρόδρομη μορφή για αρκετές πτητικές αρωματικές ουσίες κάτω από την επίδραση ορισμένων μικροοργανισμών (όπως για παράδειγμα ζυμομύκητες του γένους *Brettanomyces* και διάφορα βακτήρια) (Ribereau-Gayon, et al., 2006).

1.2. Φλαβονοειδή

Πρόκειται για λιγότερο ή περισσότερο έντονες κίτρινες χρωστικές. Η δομή των φλαβονοειδών αποτελείται από δύο βενζολικούς δακτυλίους, οι οποίοι ενώνονται με έναν

πυρανικό δακτύλιο. Αποτελούν παράγωγα είτε της 2-φαινυλο-χρωμόνης (φλαβόνες και φλαβονόλες), είτε της 2-φαινυλο-χρωμανόνης (φλαβανόνες και διυδροφλαβονόλες). (Ribéreau-Gayon, et al., 2006).

Στις ράγες οι φλαβονοειδείς ενώσεις απαντώνται με τη μορφή γλυκοζιτών, όμως στον οίνο βρίσκονται σε ελεύθερη μορφή, σε συγκεντρώσεις 100 mg/L σε ερυθρούς οίνους και 1-3 mg/L σε λευκούς καθώς στους τελευταίους η ζύμωση λαμβάνει χώρα απουσία στερεών σταφυλιού (Ribéreau-Gayon, et al., 2006).

Οι φλαβονόλες αποτελούν τις πιο διαδομένες φλαβονοειδείς ενώσεις. Πρόκειται για κίτρινες χρωστικές ουσίες στους φλοιούς τόσο των ερυθρών όσο και των λευκών σταφυλιών. Σε μικρότερο βαθμό ακολουθούν οι διυδροφλαβονόλες, οι οποίες έχουν πιο ανοιχτό κίτρινο χρώμα. Οι φλαβονόλες είναι μια υποκατηγορία των φαινολικών ενώσεων, που χαρακτηρίζονται από τον διπλό δεσμό στη θέση 2 – 3 του C δακτυλίου. Οι ενώσεις αυτές εντοπίζονται στους φλοιούς της ράγας και αναλόγως την χαρακτηριστική ομάδα του πλευρικού δακτυλίου διαχωρίζονται σε καμπερόλη (1 OH), κερκετίνη (2 OH) και μυρικετίνη (3 OH). Όλες αυτές οι μορφές των φλαβονολών εντοπίζονται στις ερυθρές ποικιλίες, ενώ μόνο η καμπερόλη και η κερκετίνη εντοπίζεται στις λευκές (Ribéreau-Gayon, et al., 2006). Κάποιες από τις ιδιότητες των φλαβονολών περιλαμβάνουν την αντιοξειδωτική τους δράση (Markham, et al. 1998) καθώς και συμπλοκοποίηση με τις ανθοκυάνες μέσω ενός φαινομένου που καλείται ως συγχρωματισμός (Cortell, 2006).

1.3. Ανθοκυάνες

Οι ανθοκυάνες είναι οι ερυθρές χρωστικές στα σταφύλια, που βρίσκονται κυρίως στους φλοιούς και σπανίως στις σάρκες. Εντοπίζονται ακόμα σε σημαντικές ποσότητες στο φύλλωμα, ειδικά στο τελείωμα της παραγωγικής περιόδου του φυτού (Ribéreau-Gayon, et al., 2006).

Η δομή των ανθοκυανών περιλαμβάνει δύο βενζολικούς δακτυλίους που είναι ενωμένοι με έναν θετικά φορτισμένο ακόρεστο πυρανικό δακτύλιο. Αποτελούν παράγωγα του 2-φαινυλοβενζοπυρυλίου (κατιόν φλαβυλίου). Στο σταφύλι αλλά και τον οίνο έχουν εντοπιστεί κυρίως 5 γλυκοζίτες ανθοκυανών, που στους βενζολικούς πυρήνες τους, φέρουν συνολικά 4 ή 5 υποκαταστάτες (OH και OCH₃) (Ribéreau-Gayon, et al., 2006).

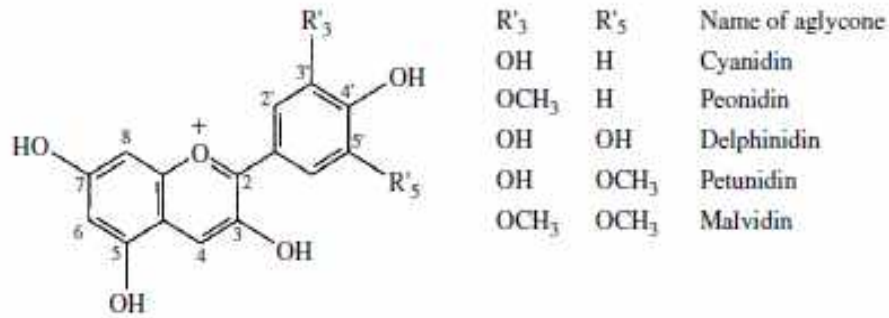
Στα ώριμα σταφύλια οι ανθικυάνες εντοπίζονται σε συγκέντρωση που μπορεί να υπερβαίνει ακόμα και τα 1000 mg/kg (Revilla, et al., 1998).

Η μοριακή δομή των ανθοκυανών (είδος υποκαταστατών και έκταση της υποκατάστασης) είναι αυτή που κυρίως καθορίζει το χρώμα τους (Lee and Hong, 1992), καθώς και ορισμένες συνθήκες του περιβάλλοντος μέσου (θερμοκρασία, pH, οξυγόνο, SO₂ και παρουσία μετάλλων) (Revilla, et al., 1998; Da-Costa, et al., 2000; Castillo-Sanchez, et al., 2008). Η υποκατάσταση στον πλευρικό (B) βενζολικό δακτύλιο μπορεί να οδηγήσει σε μετατόπιση του μήκους κύματος της μέγιστης απορρόφησης προς το ιώδες, αντίθετα η γλυκοζιλίωση και η ακυλίωση μετατοπίζουν το χρώμα προς την άλλη κατεύθυνση, δηλαδή προς το πορτοκαλί χρώμα (Ribéreau-Gayon, et al., 2006).

Όσον αφορά το φλαβύλιο, πρόκειται για ένα σταθερό κατιόν, το οποίο αναλόγως με το pH που έχει το διάλυμά μας μπορεί να εντοπίζεται σε 4 μορφές με διαφορετικό χρώμα: το κατιόν φλαβυλίου που έχει ερυθρό χρώμα, η βάση της κινόνης με μπλε χρώμα, η άνυδρη βάση που είναι άχρωμη και τέλος η χαλκόνη που κίτρινο χρώμα (Ribéreau-Gayon, et al., 2006).

Οι ποικιλίες *Vitis vinifera* αποτελούνται από τις ίδιες βασικές δομές ανθοκυανών, όμως παρατηρούνται ορισμένες διαφορές σχετικά με την σύνθεσή τους (Ribéreau-Gayon, et al., 2006). Αναλόγως τη μορφή που έχει ο πλάγιος δακτύλιος διαχωρίζονται σε: μαλβιδίνη, κυανιδίνη, δελφινίνη, πεονιδίνη και πετουνιδίνη (Σουφλερός, 2000). Ανάμεσα στις πέντε αυτές δομές των ανθοκυανών, η μαλβιδίνη είναι η κυρίαρχη που συναντάται και σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις

σε όλες τις ποικιλίες, ωστόσο η συγκέντρωση της κυμαίνεται αναλόγως την ποικιλία. Ο μονογλυκοζίτης της μαλβιδίνης καθορίζει το χρώμα στις ερυθρές ποικιλίες και στους οίνους που παράγονται από αυτές, ενώ η κάθε ποικιλία καθορίζει τη συγκέντρωση των ακυλιωμένων ανθοκυανών (Ribéreau-Gayon, et al., 2006).



Εικόνα 3. Γενική μορφή των ανθοκυανών και οι επιμέρους ανθοκυάνες που συναντώνται στο σταφύλι και τον οίνο (Πηγή: Ribéreau-Gayon, et al., 2006)

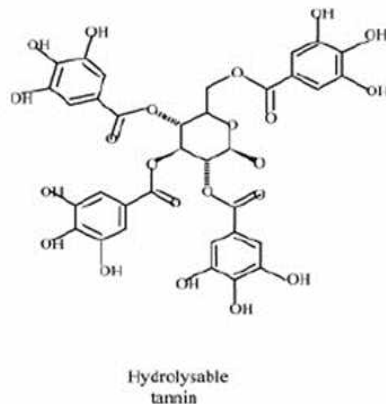
1.4. Ταννίνες

Οι ταννίνες αποτελούν φαινολικά συστατικά μεγάλου μοριακού βάρους που κυμαίνονται από 600 έως και πάνω από 3500 Da (Ribéreau-Gayon, et al., 2006) και απαντούν στο φύλλωμα, τον φλοιό, τους καρπούς, τον κορμό και τις ρίζες της αμπέλου (Hassanpour, Maheri-Sis, et al., 2011). Οι ταννίνες εντοπίζονται στα γίγαρτα σε ποσοστό έως και 65%, στους βόστρυχες έως 22%, στο φλοιό έως 12% και στη σάρκα σε ποσοστό 1%. Εξάιρεση αποτελούν ορισμένες ταννίνες μεγάλου μοριακού βάρους, οι οποίες είναι διαλυτές στο νερό (θερμοκρασίες μεταξύ 20 και 35° C). Τα oligομερή των ταννινών χαρακτηρίζονται από την ιδιότητα να μπορούν να δημιουργούν σύμπλοκα με πρωτεΐνες και άλλους πολυσακχαρίτες. Η στυπτικότητα που προκαλούν στο στόμα οι ταννίνες του οίνου οφείλεται σε αυτή την ιδιότητα (Gawel, 1997).

Οι ταννίνες ανάλογα με τη δομή τους διαίρονται σε δύο κύριες κατηγορίες μακρομορίων. Πρόκειται για τις υδρολυόμενες και τις συμπυκνωμένες ταννίνες. Οι υδρολυόμενες ταννίνες

αποτελούνται από ένα μόριο σακχάρου, κατά κύριο λόγο γλυκόζη, πολλά από τα -OH του οποίου είναι εστεροποιημένα με διάφορα φαινολικά οξέα. Τα πιο σημαντικά από αυτά είναι το γαλλικό και το ελλαγικό οξύ (Khanbabaee and Van Ree, 2001). Έτσι αρκετές φορές αναφέρονται ως γαλλοταννίνες ή ελλαγικές ταννίνες. Αυτά τα μόρια είναι υδατοδιαλυτά και καθιζάνουν γρήγορα σε μέσα όπως οίνος, τα οποία περιέχουν δηλαδή αλκοόλη (Moutounet , et al., 1989).

Όσον αφορά τις υδρολυόμενες ταννίνες δεν απαντώνται στο σταφύλι. Η ύπαρξή τους στον οίνο οφείλεται κυρίως λόγω της εκχύλισης τους από το ξύλο των βαρελιών ή της εξωγενής προσθήκης τους κατά την διάρκεια της οινοποίησης, ώστε να καταβυθιστούν ανεπιθύμητες πρωτεΐνες (Herderich and Smith, 2005). Επιπροσθέτως, αν λάβουμε υπόψη τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των πολυφαινολικών ενώσεων (Becker, et al. 2004), η προστασία των οίνων σε οξειδωτικές διεργασίες ενισχύεται από την εξωγενή προσθήκη οινολογικών ταννινών. Ιδιαίτερα σημαντική είναι και η ιδιότητα των υδρολυόμενων οινολογικών ταννινών (καθώς και των συμπυκνωμένων ταννινών της σταφυλής) να συμπλοκοποιούνται με άλλες πολυφαινολικές ενώσεις συμπεριλαμβανομένων των ανθοκυανών, συμβάλλοντας έτσι στη βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του οίνου (Monteleone, et al. 2004; Smith and Herderich, 2004), όπως αποτελεί για παράδειγμα η σταθεροποίηση του χρώματος έπειτα από δημιουργία συμπλόκων με ανθοκυάνες μέσω φαινομένων όπως είναι ο συγχρωματισμός και η συμπύκνωση (Labarbe, et al., 1999).



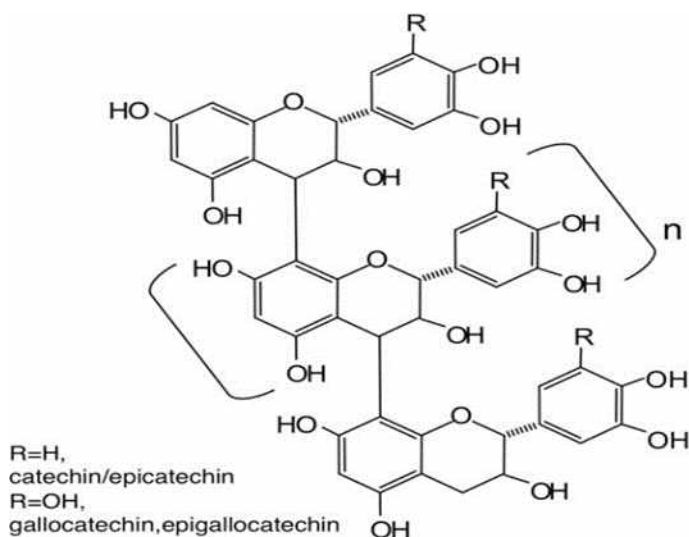
Εικόνα 4. Μόριο υδρολύομενης ταννίνης (Πηγή: Krause, et al., 2005)

Οι ταννίνες της σταφυλής, ή αλλιώς συμπυκνωμένες ταννίνες όπως ονομάζονται, είναι πιο διαδεδομένες στη φύση σε σχέση με τις υδρολύομενες (Κουράκου-Δραγώνα, 1998). Οι συμπυκνωμένες ταννίνες αποτελούν μεγαλύτερα μόρια που προκύπτουν από τον πολυμερισμό μορίων με δομική μονάδα την φλαβάν-3-όλη, όπως είναι η κατεχίνη και η επιγαλλοκατεχίνη (Herderich and Smith, 2005). Αυτοί οι υποκαταστάτες της βασικής δομής των ταννινών διαφέρουν ανάμεσα σε αυτές που εντοπίζονται στο φλοιό και αυτές που εντοπίζονται στα γιγάρτα και τους βόστρυχες (Prieur, et al., 1994; Souquet, et al., 1996). Οι ταννίνες των γιγάρτων είναι προκυανιδίνες με σχετικά μικρό βαθμό πολυμερισμού στο στάδιο του περκασμού που αυξάνεται κατά την διάρκεια ωρίμανσης και έχουν χαρακτηριστική πικρή γεύση (Ribéreau-Gayon, et al., 2000). Απαρτίζονται από υποκαταστάτες κατεχίνης, επικατεχίνης και γαλλικού εστέρα της επικατεχίνης και έχουν μέσο βαθμό πολυμερισμού 12 μονομερή (Prieur, et al. 1994). Οι ταννίνες που προέρχονται από φλοιούς έχουν πιο πολύπλοκη δομή σε σχέση με τις ταννίνες που προέρχονται από τα γιγάρτα. Σαν υποκαταστάτες εντοπίζονται οι ίδιοι με αυτούς των ταννινών των γιγάρτων και επιπλέον τα μόρια επιγαλλοκατεχίνης. Όσον αφορά το μέσο βαθμό πολυμερισμού είναι πιο μεγάλος σε σχέση με αυτόν των ταννινών των γιγάρτων και είναι 30 μονομερή (Souquet, et al., 1996; Cheynier, et al., 2005). Οι ταννίνες που προέρχονται από τους

βόστρυχους είναι πολυμερισμένες προκυανιδίνες με παραπλήσια συμπεριφορά με αυτή των ταννινών των γιγάρτων.

Στον οίνο οι προανθοκυανιδίνες προσδίδουν μεγαλύτερη στυπτικότητα και σώμα. Η πικρότητα και στυπτικότητα που προσδίδουν οι προανθοκυανιδίνες στον οίνο καθορίζονται από το μέγεθος του μορίου της προκυανιδίνης (mDP) (Peleg, et al., 1999; Vidal, et al., 2003). Από τις δύο ομάδες, τα μονομερή διακρίνονται για την πικρή τους γεύση, ενώ τα μεγάλα μοριακού βάρους συστατικά διακρίνονται για την στυπτικότητα.

Οι συμπυκνωμένες ταννίνες εκχυλίζονται στον οίνο σε όλη τη διάρκεια της συμπαραμονής του γλεύκους με τα στέμφυλα. Η περιεκτικότητα ενός παραγόμενου ερυθρού οίνου σε ταννίνες καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από την ποικιλία από την οποία προέρχεται αλλά και από την τεχνική οινοποίησης, και μπορεί να κυμαίνεται από 1 έως 4 g/L. Αντίθετα η περιεκτικότητα ενός λευκού οίνου επηρεάζεται από διαδικασία της απολάσπωσης του με τη συγκέντρωση σε μη απολασπωμένα γλεύκη να κυμαίνεται από 100 mg/L έως 300 mg/L (Ribéreau-Gayon, et al., 2000; Κοτσερίδης, 2014). Οι συμπυκνωμένες ταννίνες καθορίζουν το σώμα του οίνου και αντιπροσωπεύουν το 30-60% των ολικών φαινολικών παραγώγων (Κουράκου-Δραγώνα, 1998).



Εικόνα 5. Μόριο συμπυκνωμένων ταννινών (Πηγή: Tsuruta, et al., 2011)

2. Εκχύλιση φαινολικών συστατικών

Η εκχύλιση των φαινολικών συστατικών ευθύνεται για τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των ερυθρών οίνων (χρώμα, άρωμα, γεύση), τα οποία τους διαχωρίζουν από τους λευκούς οίνους. Οι ανθοκυάνες και οι ταννίνες είναι υπεύθυνες για το χρώμα και τη δομή των ερυθρών οίνων, καθώς επίσης και για αρωματικά συστατικά, αζωτούχες ενώσεις, πολυσακχαρίτες (κυρίως πηκτίνες) και ανόργανα συστατικά.

Οι φλοιοί, τα γίγαρτα και οι βόστρυχοι προσδίδουν στο γλεύκος διαφορετικά συστατικά, που σχετίζονται τόσο με τις χημικές όσο και με τη γευστικές ιδιότητες. Οι χορτώδεις οσμές οφείλονται κυρίως στους βόστρυχες, τα γίγαρτα προσδίδουν τραχύτητα. Η επαφή του γλεύκους με τους φλοιούς έχει ως αποτέλεσμα έναν οίνο εύπλαστο, αλλά ατελή. Όταν συνδυαστεί η παρουσία φλοιών και γιγάρτων οδηγούμαστε σε ένα πιο ισορροπημένο αποτέλεσμα. Τα φαινολικά συστατικά των φλοιών και των γιγάρτων διαφέρουν ανάλογα με την ποικιλία, το βαθμό ωριμότητας και τις συνθήκες ωρίμανσης. Επίσης, είναι πιθανό μαζί με τα φαινολικά συστατικά που θεωρούνται θετικά για την ποιότητα του οίνου να υπάρχουν και άλλα συστατικά με χορτώδη και πικρή γεύση, και άλλα με βοτανικές οσμές. Τα συστατικά που είναι θετικά για την ποιότητα των παραγόμενων οίνων εκχυλίζονται πρώτα, επομένως αυτό αποτελεί ένα πλεονέκτημα για την διαδικασία της οινοποίησης. Συνεπώς, η διαδικασία της εκχύλισης πρέπει να γίνεται κατά τέτοιο τρόπο ώστε να παραλαμβάνουμε μόνο τα συστατικά που συνεισφέρουν θετικά στην ποιότητα και όχι στο σύνολό τους (Κοτσερίδης, 2005).

3. Παράγοντες που επηρεάζουν την εκχύλιση των φαινολικών συστατικών

Η εκχύλιση των φαινολικών ουσιών από τους φλοιούς και τα γίγαρτα στο γλεύκος επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες. Τα φαινόμενα είναι πολύπλοκα και δεν προκαλούν πάντα αύξηση των συστατικών που εκχυλίζονται. Ορισμένοι παράγοντες έχουν την τάση να προκαλούν

αύξηση της συγκέντρωσης των φαινολικών ουσιών και ορισμένοι να την μειώνουν.

Η συγκέντρωση των ανθοκυανών και ταννινών που εντοπίζουμε στον οίνο εξαρτάται κυρίως από την συγκέντρωσή τους στη σταφυλή. Επομένως, για την παραγωγή ενός πλούσιου οίνου με έντονο χρώμα τα ώριμα σταφύλια αποτελούν απαραίτητη προϋπόθεση. Στον οίνο που παράγεται συναντάμε ένα μικρό ποσοστό (<50%) των φαινολικών ουσιών της σταφυλής (Κοτσερίδης, 2005).

Οι ανθοκυάνες αποτελούν ένα χημικό δείκτη για τον προσδιορισμό του σταφυλιού και του οίνου, καθώς δίνουν πληροφορίες για την περιεκτικότητά τους σε φλαβονοειδείς φαινόλες. Έτσι, τα σταφύλια μιας ποικιλίας που είναι πλούσια σε χρώμα, συνήθως δίνουν οίνους πλούσιους σε σώμα.

Στην διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης το χρώμα του γλεύκους που ζυμώνει, με την παρουσία των στερεών μερών της σταφυλής, αυξάνεται λόγω της εκχύλισης των ανθοκυανών από τους φλοιούς. Επομένως, το χρώμα αποτελεί ένα δείκτη για την πορεία της εκχύλισης και το αποτέλεσμα μιας σειράς από φαινόμενα που προκαλούν εμπλουτισμό του γλεύκους με συστατικά των φλοιών και γιγάρτων, όπως οι ανθοκυάνες και τα υπόλοιπα φαινολικά παράγωγα.

Εκτός από την εκχυλισματικότητα της κάθε ποικιλίας υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την εκχύλιση των συστατικών των φλοιών και γιγάρτων και σχετίζονται με τις συνθήκες που επικρατούν κατά την διάρκεια της εκχύλισης. Κάποιοι από αυτούς τους παράγοντες είναι η διάρκεια παραμονής των στεμφύλων με το γλεύκος, ο ρυθμός διαβροχής τους από το γλεύκος, η θερμοκρασία της οινοποίησης, το ποσοστό της αιθανόλης, η συγκέντρωση του θειώδη ανυδρίτη και άλλοι παράγοντες (Κουράκου-Δραγώνα, 1998).

3.1. Διάρκεια παραμονής των στεμφύλων με το γλεύκος

Η εκχύλιση των φαινολικών ουσιών στο γλεύκος που ζυμώνει επηρεάζεται από τον χρόνο

επαφής με τα στέμφυλα. Ωστόσο, δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του χρόνου επαφής γλεύκους-στεμφύλων και της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών. Όπως γνωρίζουμε η ένταση του χρώματος περνά ένα μέγιστο και έπειτα μειώνεται, σε αντίθεση με τα φαινολικά συστατικά που αυξάνονται συνεχώς με μεγαλύτερο ρυθμό στην αρχή της εκχύλισης και μικρότερο στη συνέχεια.

Η διαφορά στην εκχύλιση ανθοκυανών και ταννινών εντοπίζεται στο γεγονός ότι οι ανθοκυάνες, οι οποίες είναι ευδιάλυτες και σε υδατικά διαλύματα, βρίσκονται στις εξωτερικές στοιβάδες κυττάρων του φλοιού με αποτέλεσμα να εκχυλίζονται πιο εύκολα και γρήγορα αφού δεν απαιτούν την παρουσία αιθανόλης. Αντίθετα η εκχύλιση των ταννινών, που εντοπίζονται κυρίως στα γιγάρτα και λιγότερο στους φλοιούς και στους βοστρύχους, διευκολύνεται από την παρουσία αιθανόλης με αποτέλεσμα να εκχυλίζονται πιο αργά κατά την αλκοολική ζύμωση. Ανάμεσα στις ταννίνες των φλοιών και των γιγάρτων οι ταννίνες των φλοιών εκχυλίζονται σχετικά πιο γρήγορα, ενώ αυτές των γιγάρτων απαιτούν μεγαλύτερο χρόνο παραμονής με το γλεύκος, ανάλογα με το στάδιο ωριμότητας των γιγάρτων.

Η διάρκεια παραμονής των στεμφύλων με το γλεύκος καθορίζει επίσης και τη γευστική ισορροπία των οίνων, γιατί καθώς αυξάνεται, ενισχύεται το σώμα των οίνων, αλλά και η ένταση του αρώματος, καθώς αρκετές από τις πτητικές ενώσεις βρίσκονται στους φλοιούς (Ribéreau-Gayon, et al., 2006; Κοτσερίδης, 2005; Κουράκου-Δραγώνα, 1998).

3.2. Ρυθμός διαβροχής των στεμφύλων από το γλεύκος

Κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης το διοξείδιο του άνθρακα που παράγεται λόγω της διάσπασης των σακχάρων ωθεί τα στέμφυλα στην επιφάνεια, δημιουργώντας μια συμπαγή στερεά μάζα που είναι καλείται «καπέλο». Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ατελή εκχύλιση των φαινολικών ουσιών και την δημιουργία και άλλων προβλημάτων κατά την διαδικασία της

οινοποίησης. Επομένως, είναι απαραίτητη η διάσπαση αυτής της στερεάς φάσης και αυτό επιτυγχάνεται με την διαβροχή των στεμφύλων με το γλεύκος, διαδικασία που είναι γνωστή και ως «ανακύκλωση». Ο κατάλληλος αριθμός ανακυκλώσεων μας εξασφαλίζει την επιθυμητή εκχύλιση των φαινολικών συστατικών καθώς και την ομογενοποίηση του γλεύκους (Κουράκου-Δραγώνα, 1998). Όσο περισσότερες είναι οι ανακυκλώσεις, τόσο αυξάνεται και η εκχύλιση των φαινολικών ουσιών (Κοτσερίδης, 2005).

Μια εναλλακτική τεχνική διάσπασης της στερεάς φάσης των στεμφύλων στην επιφάνεια του γλεύκους που ζυμώνει, αντί για ανακύκλωση, είναι η εμβάπτιση των στεμφύλων στο γλεύκος. Η μέθοδος αυτή ευνοεί τόσο την εκχύλιση των ταννινών των γιγάρτων αλλά και εμπλουτίζει την δομή των ταννινών του οίνου. (Κοτσερίδης, 2005).

3.3.Θερμοκρασία οινοποίησης

Η θερμοκρασία της ζύμωσης αποτελεί έναν ιδιαίτερα σημαντικό παράγοντα και ειδικά για την διαδικασία της ερυθρής οινοποίησης. Η θερμοκρασία πρέπει να παραμένει αρκετά υψηλή καθώς έτσι προκαλείται νέκρωση των κυττάρων των φλοιών με αποτέλεσμα να έχουμε πιο έντονη εκχύλιση των φαινολικών συστατικών των ραγών. Ωστόσο, επειδή σε αυτό το στάδιο υπάρχει ταυτόχρονη ζύμωση και εκχύλιση θα πρέπει η θερμοκρασία να είναι τέτοια ώστε να μην επιβραδύνεται η δράση των ζυμομυκήτων ή να μειώνεται η αρωματική ένταση. Με βάση τις έρευνες που έχουν γίνει οι ιδανικές θερμοκρασίες ζύμωσης για την ερυθρή οινοποίηση είναι 25-35° C (Κοτσερίδης, 2005).

Η επίδραση της θερμοκρασίας, ως προς την εκχύλιση των φαινολικών ουσιών είναι μεγαλύτερη κατά τις πρώτες τρεις με τέσσερις ημέρες της ζύμωσης, από ότι στη συνέχεια (Gil-Munoz, et al., 1999).

3.4. Αιθανόλη

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως η συγκέντρωση της αιθανόλης έχει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην εκχύλιση των φαινολικών συστατικών. Η ένταση του χρώματος αυξάνει στα πρώτα στάδια της ζύμωσης, όπου η παραγωγή της αιθανόλης είναι εντατική, ενώ έπειτα μειώνεται όταν η αιθανόλη θα φτάσει σε ορισμένα επίπεδα. (Κουράκου-Δραγώνα, 1998). Σε αυτό το στάδιο η εκχύλιση των ανθοκυανών έχει σχεδόν ολοκληρωθεί, ωστόσο αρχίζουν να ενεργοποιούνται ορισμένοι μηχανισμοί οι οποίοι προκαλούν τη μείωση της συγκέντρωσής τους. Τέτοιοι μηχανισμοί μπορεί να είναι είτε η προσρόφηση των ανθοκυανών από τους φλοιούς και τα κύτταρα των ζυμών, είτε η παρεμπόδιση των έγχρωμων συγχρωματικών ενώσεων ταννινών-ανθοκυανών από τη σχηματιζόμενη αλκοόλη. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα στα πρώτα στάδια η ένταση του χρώματος να φτάνει σε μια μέγιστη τιμή, αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να αυξηθεί ξανά σε κάποιο από τα επόμενα στάδια. Στην αρχή δημιουργείται η ένωση των ανθοκυανών, ενώ στην συνέχεια ακολουθεί η διάσπαση των ενώσεων που οφείλεται στην αιθανόλη και έπειτα η ένταση αυξάνεται ξανά λόγω της δημιουργίας συμπλόκων ανθοκυανών-ταννινών (Ribéreau-Gayon, et al., 2006).

Όσον αφορά τις ολικές φαινόλες στην αρχή εκχυλίζονται όπως οι ανθοκυάνες, ωστόσο εξακολουθούν να εκχυλίζονται σε όλη τη διάρκεια παραμονής των στεμφύλων (Κουράκου-Δραγώνα, 1998).

3.5. Θειώδης ανυδρίτης

Η εκχύλιση των φαινολικών συστατικών της ράγας διευκολύνεται από την παρουσία του θειώδη ανυδρίτη, με αποτέλεσμα να παράγονται οίνοι με μεγαλύτερη περιεκτικότητα ολικών φαινολών και πιο έντονο χρώμα.

Κατά την ερυθρή οινοποίηση η θείωση ευνοεί στην εκχύλιση των οργανικών οξέων, των ανόργανων συστατικών και κυρίως των φαινολικών συστατικών των φλοιών. Η ιδιότητα αυτή

του θειώδη ανυδρίτη οφείλεται στην καταστροφή των κυττάρων των φλοιών, οι οποίοι εκχυλίζουν πιο εύκολα τα συστατικά τους.

Ένα φαινόμενο που έχει επίσης παρατηρηθεί είναι ότι ακόμα και χωρίς την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης, η απλή παραμονή θειωμένου γλεύκους σε θερμοκρασία περιβάλλοντος μπορεί να οδηγήσει στην πρόσληψη ανθοκυανών, χωρίς την αύξηση ολικών φαινολών, σε περιπτώσεις όπου έχουμε σταφίλια πλούσια σε χρώμα, όπως είναι για παράδειγμα οι ποικιλίες Αγιωργίτικο, Μανδηλαριά κ.α. . Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι ανθοκυάνες, σε αντίθεση με τις ταννίνες, είναι διαλυτές σε υδατικά διαλύματα, όπως για παράδειγμα είναι το γλεύκος (Κοτσερίδης, 2005; Κουράκου, 1998; Gomez-Plaza, et al., 2002).

3.6. Άλλοι παράγοντες

Εκτός από τις τεχνικές που εφαρμόζονται και τις συνθήκες που επικρατούν κατά την οινοποίηση υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την εκχύλιση των φαινολικών συστατικών από την ράγα. Η κάθε ράγα έχει τη δική της ικανότητα να κατακρατάει τις ανθοκυάνες, η οποία εξαρτάται από τη μεμβράνη των κυττάρων του φλοιού (Κουράκου-Δραγώνα, 1998).

Η ανάλυση των ανθοκυανών και ταννινών των σταφυλιών κατά την διάρκεια της ωρίμανσης χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της εξέλιξής τους καθώς και για την ταξινόμηση των αμπελώνων ανάλογα με το περιεχόμενό τους σε φαινολικές ουσίες. Υπό παρόμοιες συνθήκες οινοποίησης ράγες με υψηλότερο περιεχόμενο σε ανθοκυάνες θα αναμέναμε α δώσουν οίνους με πιο έντονο χρώμα, όμως αυτό δε συμβαίνει σε όλες τις περιπτώσεις. Επομένως άλλος ένας παράγοντας που επηρεάζει την ικανότητα εκχύλισης, ή αλλιώς εκχυλισματικότητα, εκτός από την ποικιλία είναι και το στάδιο ωριμότητας των σταφυλιών (Ribéreau-Gayon, et al., 2006, Gonzalez-Neves, et al., 2004).

Η κατάσταση της ωριμότητας καθορίζει επίσης την διάρρηξη των κυττάρων των φλοιών. Αν οι υπόλοιπες συνθήκες παραμείνουν ίδιες και τα σταφύλια είναι απολύτως ώριμα ή ελαφρά υπερώριμα, το περιεχόμενο σε ανθοκυάνες στον οίνο είναι υψηλότερο σε σχέση με το αντίστοιχο που θα προέκυπτε από μη ώριμα σταφύλια, αν και οι χρωστικές αυτές έχουν την τάση να μειώνονται. Τότε είναι που τόσο το χρώμα όσο και οι ολικές φαινόλες βρίσκονται τότε στη μέγιστη συγκέντρωσή τους.

Παρότι η υψηλή συγκέντρωση των ανθοκυανών είναι απαραίτητη για την παραγωγή βαθύχρωμων οίνων, δεν αποτελεί και τη μοναδική προϋπόθεση. Τα κύτταρα θα πρέπει να είναι αρκετά εύθρυπτα ώστε να διευκολυνθεί η εκχύλιση των ανθοκυανών, χωρίς να απαιτείται επιθετική τεχνολογία. Κατά την περίοδο της φαινολικής ωριμότητας τα σταφύλια έχουν υψηλό δυναμικό χρωστικών, όσο και επαρκή ικανότητα για την απελευθέρωση των συστατικών αυτών στον οίνο (Ribéreau-Gayon, et al., 2006, Ortega-Regules, et al., 2006, Fang, et al., 2008).

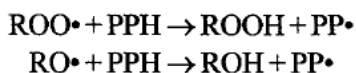
Ακόμα ένας παράγοντας αρκετά σημαντικός είναι η δομή των ανθοκυανών. Οι ελεύθερες ανθοκυάνες εκχυλίζονται πιο γρήγορα όταν δεν είναι αλκυλιωμένες, σε σχέση με τις συμπυκνωμένες που εκχυλίζονται πολύ αργά ή και καθόλου, για αυτό και ο υψηλός βαθμός συμπύκνωσής τους στα σταφύλια μπορεί να εκτιμηθεί ως αρνητικός παράγοντας κατά τις ερυθρές οινοποιήσεις (Κουράκου-Δραγώνα, 1998).

4. Αντιοξειδωτική δράση

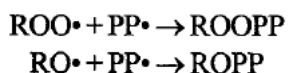
Η αντιοξειδωτική δράση των ερυθρών οίνων οφείλεται κυρίως στα φαινολικά συστατικά που εμπεριέχουν, και θεωρούνται πως είναι ισχυρά αντιοξειδωτικά. Έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί καταλήξαν στη θετική συσχέτιση της περιεκτικότητας τους σε ολικά φαινολικά και της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας (Leeuw, et al., 2014).

Η αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών συστατικών οφείλεται κατά βάση στις οξειδοαναγωγικές ιδιότητές τους και μπορεί να καθορίσει την δέσμευση και εξουδετέρωση των

ελεύθερων ριζών. Οι ελεύθερες ρίζες εξουδετερώνονται από τα φαινολικά αντιοξειδωτικά, τα οποία καταλύουν την οξείδωση των λιπών και άλλων μορίων δίνοντας γρήγορα υδρογόνο στην ελεύθερη ρίζα όπως φαίνεται στο παρακάτω εικονίδιο:



Επιπροσθέτως, η φαινοξυ- ρίζα είναι σχετικά ένα σταθερό ενδιάμεσο, που μπορεί να παγιδεύσει την ελεύθερη ρίζα και να την αποσβέσει. Η ρίζα φαινοξυλίου ενεργεί ενδιάμεσα ως τερματιστής της διάδοσης αντιδράσεων με άλλες ελεύθερες ρίζες όπως φαίνεται παρακάτω:



(Bravo, Sources, & Significance, 2009).

Ο φυσιολογικός ρόλος των αντιοξειδωτικών είναι να αποφεύγουν την βλάβη των κυτταρικών συστατικών. Τα αντιοξειδωτικά είναι συστατικά που μπορούν να καθυστερήσουν ή να αναστείλουν την οξείδωση των λιπιδίων ή άλλων μορίων με αναστολή της έναρξης ή εξάπλωσης αλυσιδωτών οξειδωτικών αντιδράσεων (Ricardo da Silva, et al., 1991).

Η αντιοξειδωτική δράση των φλαβονοειδών οφείλεται κυρίως στο είδος και τον αριθμό των υποκατάστατων τους παρά στο βασικό σκελετό τους. Η πιο σημαντική ίσως παράμετρος αντιοξειδωτικής δράσης είναι ο αριθμός των ελεύθερων υδροξυλίων. Ειδικά τα υδροξύλια του Β δακτυλίου είναι αυτά που συμμετέχουν κατά κύριο λόγο στη δράση των φλαβονοειδών (Pannala, et. al., 2001; Rice-Evans, et al., 1996) γιατί μπορούν να λειτουργήσουν ως δότες ριζών υδρογόνου σε ελεύθερες ρίζες. Αντίθετα, ο Α δακτύλιος δεν παίζει σημαντικό ρόλο στη συνολική αντιοξειδωτική δράση. Όσον αφορά το δακτύλιο C, η ύπαρξη διπλού δεσμού και υδροξυλίου στην 3-θέση αυξάνουν σημαντικά την αντιοξειδωτική δράση, ενώ μεθυλίωση ή γλυκοζυλίωση του ίδιου υδροξυλίου την αναστέλλουν. Αν ο C δακτύλιος είναι ανοικτός ή κλειστός δεν επηρεάζει τη συνολική δράση γιατί και οι χαλκόνες που έχουν ανοικτό C δακτύλιο

έχουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, (Rice-Evans et al., 1996). Η δομή και ο μέσος βαθμός πολυμερισμού (mDP) επηρεάζει την αντιοξειδωτική ικανότητα των φλαβαν-3-ολών (Ricardo-da-silva, et al., 1991). Επίσης, αντιοξειδωτική δράση μπορούν να παρουσιάσουν και οι ανθοκυάνες λόγω του άγλυκου μέρους του μορίου τους, χωρίς ωστόσο να θεωρούνται τα ισχυρότερα αντιοξειδωτικά (Rice-Evans, et al., 1996). Τέλος, ο αριθμός των υποκατάστατων στην θέση 3 του μορίου, ο βαθμός οξείδωσης του C δακτυλίου, ο βαθμός υδροξυλίωσης και η εστεροποίηση με φαινολικά οξέα, θεωρούνται σημαντικοί παράγοντες για την εκδήλωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των ανθοκυανών (Kahkoken & Heinonen, 2003). Ωστόσο, αναφέρεται ότι η γλυκοζυλίωση της θέσης 3 των ανθοκυανιδινών μειώνει την αντιοξειδωτική δράση του μορίου (Rice-Evans, et al., 1996).

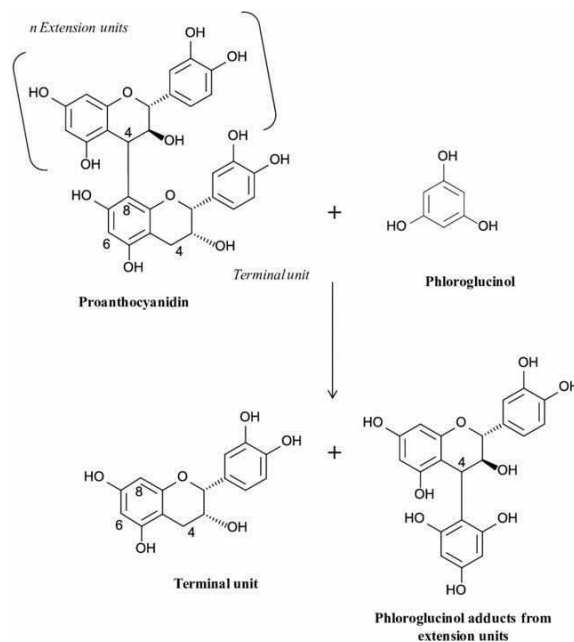
5. Μέσος βαθμός πολυμερισμού (mDP) ταννινών

Ο μέσος βαθμός πολυμερισμού εκφράζει το μέσο αριθμό των μονομερών που προστίθενται στο κάθε ενεργό κέντρο, από την εμφάνισή του μέχρι τον τερματισμό. Αν η εμφάνιση των ενεργών κέντρων (ή ο τερματισμός) έχει αργό ρυθμό σε σχέση με την πρόοδο του πολυμερισμού, τότε το πολυμερές θα έχει αρκετό χρόνο για να μεγαλώσει και να οδηγήσει σε μεγάλο βαθμό πολυμερισμού. Αντίθετα αν ο ρυθμός τερματισμού είναι σχετικά μεγάλος τότε το πολυμερές δεν αποκτά μεγάλο βαθμό πολυμερισμού. (Ταραντίλη, 2019)

Ο μέσος αριθμός των φλαβαν-3-ολών μονομερών στη δομή μιας προανθοκυανιδίνης, των οποίων ο δεσμός μεταξύ των μορίων είναι C4→C8 (ή λιγότερο συχνά C4→C6) αναφέρεται ως μέσος βαθμός πολυμερισμού. Με την ανάλυση των δειγμάτων με υγρή χρωματογραφία υψηλής ανάλυσης (HPLC) μπορεί να γίνει ο υπολογισμός του μέσου όρου της μοριακής μάζας των πολυμερισμένων φαινολικών ενώσεων του οίνου, ο οποίος εκφράζεται ως μέσος βαθμός πολυμερισμού (mDP). Οι τιμές του mDP και η δομή των προανθοκυανιδινών επηρεάζονται

σημαντικά από την ποικιλία και το βαθμό ωρίμανσης .Εξίσου καθοριστική στη σύνθεση και τη δομή των ταννινών είναι και η προέλευση τους. Οι ταννίνες που προέρχονται από τα γίγαρτα είναι μικρότερες, με χαμηλότερο mDP και υψηλότερο ποσοστό των υπομονάδων που φέρουν εστέρες του γαλλικού οξέος, και το οποίο εκφράζεται ως βαθμός εστεροποίησης (% G), ενώ οι ταννίνες των φλοιών είναι γενικά μεγαλύτερες με υψηλότερο mDP.

Για να προσδιορίσουμε το μέσο βαθμό πολυμερισμού των ταννινών απαιτείται η εκχύλιση τους με τη χρήση συγκεκριμένων διαλυτών και στη συνέχεια ο διαχωρισμός τους ανάλογα με το μοριακό τους μέγεθος. Καθώς η απομόνωση και ταυτοποίηση του κάθε μορίου αποτελεί μια δύσκολη διαδικασία ο χαρακτηρισμός τους γίνεται έμμεσα μετά από διάσπαση των μορίων. Η επεξεργασία των ταννινών με οξύ και την παρουσία ενός πυρηνόφιλου αντιδραστήριου, όπως είναι η φλωρογλουκινόλη, μας επιτρέπει τον προσδιορισμό του προφίλ των υπομονάδων, τερματικών και επεκτατικών, που συμμετέχουν στη δομή των πολυμερών προανθοκυανιδινών (Chira, et al., 2009; Kennedy & Jones, 2001; Monagas, et al., 2003; Prieur, et al., 1994) (Chira, et al., 2009; Kennedy & Jones, 2001; Prieur, et al., 1994).



Εικόνα 6. Αντίδραση μίας προανθοκυανιδίνης με τη φλωρογλουκινόλη (πηγή: Lorrain, et al., 2013)

Οι τερματικές και επεκτατικές υπομονάδες των προανθοκυανιδινών των φλοιών και των γιγάρτων και κατά συνέπεια η δομή τους, διαφέρουν μεταξύ τους και βρίσκονται σε διαφορετικά ποσοστά. Ορισμένες έρευνες προσδιορίζουν την κατεχίνη ως την κύρια τερματική υπομονάδα των προανθοκυανιδινών των φλοιών στις ποικιλίες Merlot, Syrah, Cabernet Sauvignon (Bordiga, et al. 2011; Cohen, et al. 2008; Hanlin & Downey, 2009; Monagas, et al., 2003) ενώ οι Mativvi et al. (2008) για τις ίδιες ποικιλίες αναφέρουν την επικατεχίνη ως κύρια τερματική μονάδα. Σε άλλες έρευνες η επιγαλλοκατεχίνη έχει ανιχνευτεί στους φλοιούς ως τερματική μονάδα σε ορισμένες ποικιλίες (Gagne, et al., 2006) ή απουσιάζει εντελώς σύμφωνα με τους Hanlin & Downey (2009). Οι ίδιοι έχουν προσδιορίσει την επικατεχίνη και την επιγαλλοκατεχίνη ως κύριες επεκτατικές μονάδες, ενώ οι Li et al. (2014) αναφέρουν την επιγαλλοκατεχίνη στις ποικιλίες που μελέτησαν.

Οι περισσότεροι ερευνητές έχουν προσδιορίσει ως κύρια τερματική μονάδα στα γίγαρτα την κατεχίνη και ως κύρια επεκτατική μονάδα την επικατεχίνη (Bordiga, et al., 2011; Cohen, et al., 2008; Prieur, et al., 1994). Ωστόσο, υπάρχουν έρευνες που αναφέρουν την επικατεχίνη ως κύρια τερματική και επεκτατική υπομονάδα κατά το στάδιο της ωρίμανσης (Downey, et al., 2003). Οι Obreque-Slier et al. (2010) προσδιόρισαν στο στάδιο της ωρίμανσης στις ποικιλίες Cabernet Sauvignon και Carménère ως κύρια επεκτατική μονάδα των γιγάρτων την επικατεχίνη, ενώ ως κύρια τερματική μονάδα την επικατεχίνη για την ποικιλία Carménère και την κατεχίνη για την ποικιλία Cabernet Sauvignon. Οι διαφορές στη σύσταση της δομής των προανθοκυανιδινών μπορεί να οφείλονται στον διαφορετικό γενότυπο των ποικιλιών, στον τρόπο προσδιορισμού της δομής αλλά ακόμα και στις περιβαλλοντικές και κλιματολογικές διαφορές κάθε περιοχής όταν εξετάζεται η ίδια ποικιλία (Hanlin & Downey, 2009; Li, et al., 2014; Mativvi, et al. 2008).

6. Οργανοληπτικές ιδιότητες προανθοκυανιδινών

Οι προανθοκυανιδίνες είναι τα συστατικά που είναι υπεύθυνα για τη στυπτικότητα και την πικρή γεύση των οίνων. Η αίσθηση της στυπτικότητας αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά των ερυθρών οίνων. Χημικά μπορεί να συσχετιστεί με την ικανότητα των προανθοκυανιδινών να συμπλοκοποιούνται με τις πρωτεΐνες του ανθρώπινου σιέλου (Kallithraka, et al. 1996). Αντίθετα, η πικρή γεύση μπορεί να οφείλεται σε ένα ευρύ φάσμα χημικών ενώσεων, όπως τα αμινοξέα, τα πεπτίδια, τα άλατα των βαρέων μετάλλων, την αιθανόλη, κατά κύριο λόγο όμως οφείλεται στις φαινολικές ενώσεις. Και ειδικά οφείλεται στις μονομερείς και ολιγομερείς προκυανιδίνες, με τις μονομερείς να είναι πιο πικρές από τις πολυμερείς, και με τη μέγιστη ένταση της πικράδας να αντιστοιχεί σε τετραμερείς προανθοκυανιδίνες (Chira, et al., 2009; Sun, et al., 2011).

Η στυπτικότητα σύμφωνα με ορισμένες έρευνες που έχουν γίνει επηρεάζεται από τη συγκέντρωση, το μοριακό μέγεθος, το βαθμό εστεροποίησης των προανθοκυανιδινών με γαλλικό οξύ και τη δομή των προανθοκυανιδινών (Brossaud, et al., 2001; Chira, et al., 2015; Cosme, et al., 2009; Curko, et al, 2014; Quijada-Morin, et al. 2012; Vidal, et al., 2003). Επίσης, ο πολυμερισμός των προανθοκυανιδινών συνδράμει στην δημιουργία μορίων με μεγαλύτερη ικανότητα δέσμευσης από τις πρωτεΐνες με αποτέλεσμα την αύξηση του στυπτικού τους χαρακτήρα (Chira, et al., 2009; Vidal, et al., 2003). Η ένταση της στυπτικότητας αυξάνεται με το μοριακό μέγεθος τουλάχιστον έως ένα βαθμό ($DP = 6$) και στη συνέχεια μειώνεται (Brossaud et al., 2001; Chira, et al., 2009; Sun, et al., 2013). Η μείωση αυτή μπορεί να οφείλεται είτε στη μείωση της διαλυτότητας των μορίων, είτε στη αδυναμία δέσμευσης τους από τις πρωτεΐνες λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης, μετά την υπερβολική αύξηση του όγκου τους (Ribereau-Gayon, et al., 2006; Sun et al., 2013). Πρόσφατα, οι Sun et al (2013) μελέτησαν ότι η στυπτικότητα των προανθοκυανιδινών αυξήθηκε με την αύξηση του mDP (έως 70) και το

ποσοστό εστεροποίησης (%G) με γαλλικό οξύ (έως 22%). Επιπροσθέτως, η εστεροποίηση των προανθοκυανιδινών έχει αποδειχθεί στο παρελθόν ότι αυξάνει τις αλληλεπιδράσεις τους με διάφορες πρωτεΐνες, γεγονός που αποδεικνύει ότι θα μπορούσε να είναι αυτή υπεύθυνη για την αυξημένη αίσθηση της στυπτικότητας (Ricardo-da Silva, et al., 1991).

Τα ποσοστά συμμετοχής των τερματικών και επεκτατικών υπομονάδων των προανθοκυανιδινών στη δομή τους έχουν συσχετιστεί έντονα με τη στυπτικότητα. Η σύνδεση μεταξύ των πρωτεϊνών και των δραστικών θέσεων των προανθοκυανιδινών επηρεάζεται σημαντικά από την δομή τους (Rinaldi, et al., 2014). Η επιγαλλοκατεχίνη ως τερματική ή επεκτατική υπομονάδα έχει συσχετιστεί αρνητικά με τη στυπτικότητα (Quijada-Morín et al. 2012; Rinaldi et al., 2014, Vidal et al., 2003). Αντιθέτως η επικατεχίνη και ο γαλλικός εστέρας της επικατεχίνης έχουν σημαντική συμβολή στην στυπτικότητα των φλοιών, των γιγάρτων και των οίνων, καθώς η παρουσία τους αυξάνει τη στυπτικότητα (Quijada-Morín et al. 2012).

Από την άλλη, οι οργανοληπτικές ιδιότητες των ταννινών φαίνεται να είναι ανεξάρτητες σε σχέση με την προέλευσή τους από τα διαφορετικά μέρη της ράγας. Οι προανθοκυανιδίνες των γιγάρτων και των φλοιών φαίνεται να είναι εξίσου στυπτικές όταν δοκιμάστηκαν στην ίδια συγκέντρωση σε οίνο ή ρυθμιστικό μέσο, παρά τις μεγάλες διαφορές στη δομή τους, συμπεραίνοντας ότι οι μικρού μοριακού βάρους ταννίνες των γιγάρτων ήταν το ίδιο στυπτικές με τις πολυμερείς ταννίνες των φλοιών. Αυτό μπορεί να οφείλεται στον αυξημένο βαθμό εστεροποίησης με γαλλικό οξύ των ταννινών των γιγάρτων ο οποίος αυξάνει την στυπτικότητα, όπως εξάλλου και ο μεγαλύτερος βαθμός πολυμερισμού των φλοιών. Ωστόσο, στην ίδια έρευνα όταν δοκιμάστηκαν σε πιο όξινο διάλυμα οι προανθοκυανιδίνες των γιγάρτων παρουσίασαν πιο πικρή γεύση σε σχέση με των φλοιών. Παράλληλα, τα εκχυλίσματα οίνων τα οποία χαρακτηρίστηκαν από μέσες τιμές mDP ήταν λιγότερο στυπτικά σε σχέση με τα εκχυλίσματα γιγάρτων και φλοιών (Brossaud et al., 2001).

Η στυπτικότητα και η πικρή γεύση των προανθοκυανιδινών σχετίζεται εκτός από τη χημική δομή και τη συγκέντρωσή τους και με άλλες παραμέτρους, όπως για παράδειγμα το pH του οίνου και η περιεκτικότητα σε αιθανόλη. Η αύξηση του pH και της περιεκτικότητας σε αιθανόλη προκαλούν μείωση της αίσθησης της στυπτικότητας. Τέλος, η ύπαρξη των ανθοκυανών δείχνει ότι αυξάνει τη στυφή γεύση, αφήνοντας ανεπηρέαστη την πικρή γεύση η οποία συσχετίστηκε περισσότερο με την οξύτητα του οίνου (Brossaud et al., 2001).

Κεφάλαιο 3: Η ποικιλία Λημνιώνα

Τόσο τα δείγματα φλοιών και γιγάρτων όσο και ο οίνος βάσης που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη προέρχονται από την ποικιλία Λημνιώνα και παραχωρήθηκαν για τις ανάγκες του πειράματος από το οινοποιείο Κοντοζήση στην περιοχή της Καρδίτσας. Οι προσπάθειες αναβίωσης της ποικιλίας ξεκίνησαν το 2000. Η ποικιλία Λημνιώνα απαντάται κυρίως στη Θεσσαλία με κύρια κέντρα καλλιέργειας της την Καρδίτσα και τον Τύρναβο. Έχει μεγάλη σταφυλή και έντονα πυκνόραγη. Επίσης, η ράγα είναι σφαιρική και μεγάλου μεγέθους. Διαμορφώνεται σε κυπελλοειδές και γραμμοειδές κορδόνι. Το πρέμνο είναι ζωνρό και παραγωγικό. Προτιμά το ζεστό κλίμα, ενώ ο τρύγος είναι στα μέσα με τέλη Σεπτεμβρίου. Οι οίνοι από Λημνιώνα έχουν βαθύ σκούρο κόκκινο χρώμα, αρώματα από μαύρα φρούτα, μπαχαρικά και ορυκτά. Επιπρόσθετα, έχουν έντονες ταννίνες, σχετικά υψηλή αλκοόλη και οξύτητα. Συμμετέχει στους οίνους ΠΓΕ Πιερία , Τύρναβος , Καρδίτσα. (Σταύρακας, 2011). Ένα ιδιαίτερα σημαντικό χαρακτηριστικό της ποικιλίας είναι το αρκετά υψηλό αντιοξειδωτικό δυναμικό (Gougoulis, et al., 2018).



Εικόνα 7. Βότρυς ποικιλίας Λημνιώνα (φωτογραφία από δείγμα για την παραλαβή φλοιών και γιγάρτων)

Κεφάλαιο 4: Θεωρητικό μέρος μεθόδων ανάλυσης

1. Ένταση χρώματος

Το χρώμα του οίνου οφείλεται στην εκλεκτική απορρόφηση συγκεκριμένων ακτινοβολιών του ηλιακού φάσματος και τα φαινολικά συστατικά. Το φάσμα απορρόφησης σε ερυθρούς οίνους εμφανίζει μέγιστο στα 520 nm (ερυθρό). Σε νεαρούς ερυθρούς οίνους το μέγιστο αυτό μπορεί να οφείλεται στο καθαρό ερυθρό χρώμα των ελεύθερων ανθοκυανών που έχουν την μορφή φλαβυλίου. Με το πέρασμα του χρόνου και την παλαίωση των οίνων η απορρόφηση στα 520 nm μειώνεται όμως αυξάνεται αυτή στα 420 nm (κίτρινο). Αυτό οφείλεται στις διάφορες μορφές ταννινών που επικρατούν στους παλαιωμένους οίνους και απορροφούν στην περιοχή του κίτρινου. Αυτές οι δύο τιμές είναι κατάλληλες για οίνους με κάποια ηλικία, ωστόσο δεν καλύπτουν πλήρως τα έντονα χρώματα των νέων οίνων. Για την αξιολόγηση αυτών των χρωμάτων, λαμβάνουμε υπόψη την απορρόφηση στην περιοχή του κυανού (620 nm), που αποδίδεται στις μορφές της βάσης της κινόνης των ελευθέρων και των ενωμένων ανθοκυανών.

Με βάση τις επίσημες μεθόδους του OIV, η φωτεινότητα και η χρωματικότητα του οίνου ονομάζονται χρωματικά χαρακτηριστικά. Η φωτεινότητα του οίνου αντιστοιχεί στη

διαπερατότητα και είναι αντιστρόφως ανάλογη προς την ένταση χρώματος. Αντίθετα η χρωματικότητα ενός οίνου ανταποκρίνεται στο επικρατούν μήκος κύματος και την καθαρότητα. Όσον αφορά την μέθοδο αναφοράς, πρόκειται για μια φασματοφωτομετρική μέθοδο που μας επιτρέπει να υπολογίσουμε τις τρισερεθιστικές τιμές και τους τριχρωματικούς συντελεστές που απαιτούνται για να καθορίσουμε το χρώμα σύμφωνα με τους κανόνες της διεθνούς επιτροπής φωτισμού (CIE).

Η επίσημη μέθοδος δεν βρίσκει απολύτως καμία εφαρμογή στην τεχνική οινοποίησης γι' αυτό και συμβατικά και κυρίως για λόγους διευκόλυνσης, τα χρωματικά χαρακτηριστικά των ερυθρών και των ερυθρωπών (ροζέ) οίνων τα προσδιορίζουμε με μια μέθοδο που έχει καθιερωθεί ως συνήθης μέθοδος κι εκφράζεται από την ένταση του χρώματος όπως φαίνεται παρακάτω:

Ένταση χρώματος (E)

Είναι το άθροισμα των απορροφήσεων στα 420 nm, 520 nm και 620 nm.

$$E = A_{420} + A_{520} + A_{620}$$

(Κοτσερίδης, 2014).

2. Δείκτης Φαινολικών Ουσιών (ΔΦΟ)

Για να προσδιορίσουμε το ΔΦΟ βασιζόμαστε στην ισχυρή απορρόφηση που παρουσιάζουν οι βενζολικοί δακτύλιοι των φαινολικών συστατικών με την επίδραση του υπεριώδους φωτός, το μέγιστο της οποίας εντοπίζεται στα 280 nm. Με τη μέθοδο αυτή μετράμε την περιεκτικότητα των φλαβανοειδών φαινολών (ανθοκυάνες, ταννίνες), των μη φλαβανοειδών (φαινολικά οξέα) και κάποιων μη φαινολικών ενώσεων που απορροφούν στα 280 nm. Ο δείκτης φαινολικών ουσιών αποτελεί μια εύκολη και σύντομη μέθοδο που δίνει επαναλήψιμα αποτελέσματα. Ο δείκτης αυτός υπερισχύει του δείκτη Folin-Ciocalteu λόγω της ευκολίας εφαρμογής, επομένως

είναι αυτό που χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο στις αναλυτικές τεχνικές. Το μοναδικό μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι το γεγονός ότι ορισμένες ουσίες όπως για παράδειγμα οι χαλκόνες ή τα κινναμωμικά οξέα δεν παρουσιάζουν μέγιστο απορρόφησης στα 280 nm. Αυτό το σφάλμα θεωρείται μικρό, καθώς η περιεκτικότητα των παραπάνω ουσιών στα σταφύλια και τους οίνους είναι αρκετά μικρή (Κοτσερίδης, 2014).

3. Προσδιορισμός ταννινών – Methyl Cellulose Precipitable (MCP)

Η μέθοδος αυτή υπολογίζει το σύνολο των ταννινών στον οίνο. Η μέθοδος σύμφωνα με τον Sarneckis, et al. (2006) στηρίζεται στην αντίδραση ενός πολυμερούς, όπως είναι η μεθυλ-κυτταρίνη που αποτελεί έναν πολυσακχαρίτη, με τις ταννίνες του οίνου, έχοντας ως αποτέλεσμα να σχηματίζονται αδιάλυτα πολυμερή σύμπλοκα τα οποία έπειτα καθιζάνουν. Η ανάλυση στηρίζεται στην διαφορετικές τιμές απορρόφησης στα 280 nm (A280) των διαλυμάτων με και χωρίς καθίζηση των συμπλοκοποιημένων ταννινών, που προσδιορίζουμε με την βοήθεια του φασματοφωτόμετρου. Η μεθυλ-κυτταρίνη δεν απορροφά στα 280nm με αποτέλεσμα να μην παρεμβάλλεται στη μέτρηση μας. Για να πραγματοποιηθεί η μέθοδος, είναι απαραίτητη η ύπαρξη ενός μάρτυρα (blanc), δηλαδή ενός διαλύματος οίνου στο οποίο δεν έχει γίνει προσθήκη αντιδραστήριου μεθυλ-κυτταρίνης και φυσικά δείγματος οίνου στον οποίο έχει γίνει προσθήκη μέθυλ-κυτταρίνης. Η απορρόφηση του δείγματος αναφοράς (μάρτυρας) στα 280nm παρουσιάζει την τιμή για όλα τα φαινολικά συστατικά (σύνολο φαινολικών) που εντοπίζονται στον οίνο (A280,b1), ενώ η απορρόφηση στα 280nm του επεξεργασμένου δείγματος με μέθυλ-κυτταρίνη, εκφράζει τα φαινολικά συστατικά που παραμένουν εν διαλύσει μετά την κατακρήμνιση των συμπλόκων ταννινών με μέθυλ-κυτταρίνη (A280,s).

4. Προσδιορισμός ταννινών με την μέθοδο BSA (δέσμευση από πρωτεΐνες – δείκτης στυπτικότητας)

Η μέθοδος αυτή υπολογίζει ταννίνες από δείγμα οίνου ή ράγας. Η μέθοδος αυτή σύμφωνα με τον Harbertson, et al. (2002) βασίζεται στην αλληλεπίδραση των ταννινών με άλλα μόρια, όπως είναι η αλβουμίνη (πρωτεΐνη) και τη δημιουργία αδιάλυτων συμπλόκων, τα οποία καθιζάνουν. Έπειτα ακολουθεί επαναδιαλυτοποίηση σε αλκαλικό διάλυμα και προσδιορίζουμε τη συγκέντρωση των ταννινών μετά την αντίδραση με χλωριούχο σίδηρο. Ο χλωριούχος σίδηρος έχει την ιδιότητα να αντιδρά με τα μόρια των πολυφαινολών και να σχηματίζει σύμπλοκα $Fe-(OR)_6$ (το OR αντιστοιχεί σε ιονισμένα φαινολικά μόρια) τα οποία παρουσιάζουν ιώδες χρώμα σε αλκαλικό διάλυμα και προσδιορίζονται ποσοτικά μετρώντας την απορρόφηση στα 510nm. Η συγκέντρωση των ταννινών στα σύμπλοκα ταννίνης-πρωτεΐνης είναι ανάλογη με την συγκέντρωση της πρωτεΐνης που εντοπίζεται στο δείγμα. Για την ποσοτική παραλαβή του συνόλου των ταννινών που βρίσκονται στο δείγμα μας κρίνεται αναγκαίο το πρωτεϊνικό διάλυμα να εμπεριέχει διπλάσια ποσότητα αλβουμίνης σε σχέση με την συγκέντρωση των ταννινών του δείγματος. Περίσσεια πρωτεΐνης δεν επηρεάζουν τα αποτελέσματα μας.

5. Αντιοξειδωτική ικανότητα με τη μέθοδο DPPH

Με την μέθοδο αυτή πραγματοποιείται η μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Η μέθοδος αυτή, που αποτελεί μια παραλλαγή από αυτήν που περιγράφουν οι Brand-Williams και οι συνεργάτες τους (1995), στηρίζεται στην απορρόφηση της ρίζας 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH). Προσθέτοντας μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση στο διάλυμα τότε η ρίζα DPPH ανάγεται με πρόσληψη ενός ατόμου υδρογόνου (ή ενός e^-) και μετατρέπεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη, η οποία έχει κίτρινο χρώμα, με αποτέλεσμα να ελαττώνεται η οπτική απορρόφηση. Ο υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Arnous, et al. (2001) για τη μέθοδο με μέτρηση της απορρόφησης στα 515nm και χρησιμοποιώντας ως πρότυπη ουσία αναφοράς το Trolox.

6. Προσδιορισμός ανθοκυανών (φωτομετρικά)

Σύμφωνα με τους Ribéreau-Gayon, et. al. (2006) δεν υπάρχει ακριβής μέθοδος προσδιορισμού των ανθοκυανών, οπότε η τιμή αυτή μπορεί μόνο να εκτιμηθεί. Ωστόσο μπορεί να προσδιοριστεί μια συνολική τιμή με τη χρήση χημικών και χρωματογραφικών μεθόδων. Οι χημικές μέθοδοι βασίζονται στις ειδικές ιδιότητες των ανθοκυανών, όπως είναι η μεταβολή του χρώματος ανάλογα με το pH, είτε ο αποχρωματισμός με διοξείδιο του θείου (Ribéreau-Gayon και Stonestreet, 1965). Η πρώτη μέθοδος που χρησιμοποιεί τη διαφορά pH είναι πιο ευαίσθητη στην παρουσία ελεύθερου SO₂ στον οίνο, ενώ η μέθοδος που θα ακολουθήσουμε με αποχρωματισμό με διοξείδιο του θείου είναι πιο αξιόπιστη.

7. Προσδιορισμός ανθοκυανών με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

(HPLC)

Στις αρχές του εικοστού αιώνα ο Mikhail Tswett ήταν αυτός που χρησιμοποίησε για πρώτη φορά τον όρο χρωματογραφία περιγράφοντας έτσι τον διαχωρισμό των φυτικών χρωστικών που επιτεύχθηκε με διαβίβαση διαλύματός τους μέσω γυάλινου σωλήνα, ο οποίος ήταν γεμάτος με λεπτό ανθρακικό ασβέστιο. Οι διαχωριζόμενες ουσίες εμφανίζστηκαν ως χρωματιστές ζώνες στη στήλη και αυτός ήταν ο λόγος που ο Tswett επέλεξε το χαρακτηριστικό αυτό όνομα για την τεχνική. Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) αποτελεί την πιο διαδεδομένη μέθοδο για τον διαχωρισμό των ανθοκυανινών, λόγω των συνεχόμενων βελτιώσεων στην οργανολογία, στα υλικά συσκευασίας και της στήλης (Andersen, 2006). Ο διαχωρισμός αυτός στηρίζεται στην διαφορετική αλληλεπίδραση των ουσιών σε δύο μη αναμειγνυόμενες φάσεις, μια στατική και μια κινητή. Στο πρώτο στάδιο, εισάγουμε το δείγμα στη χρωματογραφική στήλη όπου βρίσκεται η στατική φάση. Τα συστατικά του δείγματος συμπαρασύρονται από την κινητή φάση, η οποία προωθείται στη στήλη με τη βοήθεια μιας αντλίας υψηλής πίεσης και κάτω από

σωστά επιλεγμένες πειραματικές συνθήκες μετακινούνται διαμέσου της φάσης με διαφορετικές ταχύτητες και διαχωρίζονται. Τα συστατικά, τα οποία εκκλύονται από το άκρο της χρωματογραφικής στήλης, εισέρχονται στον κατάλληλο ανιχνευτή και τα σήματα καταγράφονται ως συνάρτηση του χρόνου, δίνοντας ένα διάγραμμα με μια σειρά κορυφών, που καλείται χρωματογράφημα. Οι θέσεις των κορυφών ως προς τον άξονα του χρόνου καθορίζουν την ταυτοποίηση των συστατικών του δείγματος και το εμβαδόν κάθε κορυφής αποτελεί το ποσοτικό τους μέτρο (Skoog, et al., 2005).

Μέρος II: Πειραματική Διαδικασία – Υλικά και Μέθοδοι

1. Σχεδιασμός και στόχος του πειράματος

Ο σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας είναι η μελέτη της μεταβολής της χημικής σύστασης και αντιοξειδωτικής δράσης έπειτα από προσθήκη ταννινών φλοιών και γιγάρτων σε διαφορετικές αναλογίες σε διάλυμα προσομοίωσης οίνου (Model Wine) και σε ερυθρό οίνο. Η μελέτη της μεταβολής του χρώματος και της χημικής τους σύστασης πραγματοποιήθηκε με φωτομετρικές αναλύσεις και με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Η μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης πραγματοποιήθηκε με φωτομετρική ανάλυση, ενώ ο προσδιορισμός του βαθμού πολυμερισμού (mDP) έγινε με εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid phase extraction, SPE), αντίδραση phloroglucinol και έπειτα HPLC. Επιπροσθέτως, μέσω του οργανοληπτικού ελέγχου παρατηρήθηκε η συμβολή της προσθήκης ταννινών σε ορισμένα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και συγκεκριμένα στην ένταση, την απόχρωση, την στυπτικότητα και την πικρή γεύση.

Δεδομένου ότι δεν έχει πραγματοποιηθεί παρόμοια μελέτη στην Ελλάδα στόχος του πειράματος είναι να μελετήσει την συμβολή της προσθήκης διαφορετικών αναλογιών ταννινών φλοιών και γιγάρτων στην ένταση και σταθεροποίηση του χρώματος, την αντιοξειδωτική δράση και τέλος στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά που αναφέρθηκαν προηγουμένως.

2. Προετοιμασία δειγμάτων

Για τις αναλύσεις μετρήθηκαν 100 ράγες και ζυγίστηκαν σε ζυγό ακριβείας. Η μέτρηση έγινε σε τρία δείγματα 100 ραγών. Στη συνέχεια έγινε αποφλοιώση των ραγών, συλλογή, διαχωρισμός και ζύγιση του νωπού βάρους των φλοιών και των γιγάρτων αντίστοιχα και αφού ξεπλύθηκαν με απιονισμένο νερό αποθηκεύτηκαν ξεχωριστά σε κατάψυξη. Οι φλοιοί και τα γίγαρτα (αφού είχε προηγηθεί σύνθλιψη) λυοφιλιώθηκαν, ζυγίστηκε το βάρος τους μετά την λυοφιλίωση και τέλος κορνιοτοποιήθηκαν σε blender μέχρι να γίνουν σκόνη. Η ίδια διαδικασία

έγινε στο σύνολο των δειγμάτων φλοιών και γιγάρτων χωρίς ωστόσο να ζυγίζονται.

3. Εκχύλιση φαινολικών συστατικών των φλοιών και γιγάρτων

Η εκχύλιση των φαινολικών συστατικών των φλοιών και γιγάρτων πραγματοποιήθηκε με σκοπό τον υπολογισμό των ποσοτήτων προσθήκης σκόνης φλοιών και γιγάρτων για κάθε αναλογία στο διάλυμα προσομοίωσης οίνου (model wine).

Αφού ζυγίστηκαν 3g σκόνης φλοιών και γιγάρτων αντίστοιχα από κάθε δείγμα 100 ραγών σε falcon των 50ml ακολούθησαν διαδοχικά δύο εκχυλίσεις. Στην πρώτη εκχύλιση προστέθηκαν 25ml διαλύματος ακετόνης:H₂O 80:20 και τα δείγματα παρέμειναν σε συνεχή ανάδευση στο shaker (240 rpm / 20°C) για 3 ώρες. Ακολούθησε φυγοκέντρηση του εκχυλίσματος στις 8000 rpm για 15 λεπτά στους 20°C και έπειτα το υπερκείμενο (A) συλλέχθηκε και αποθηκεύτηκε σε κατάψυξη.

Στο στερεό υπόλειμμα προστέθηκαν 25ml διαλύματος MeOH:H₂O 60:40 και ακολούθησε η δεύτερη εκχύλιση υπό συνεχή ανάδευση στο shaker (240 rpm / 20°C) για 2,5 ώρες. Στο εκχύλισμα που προέκυψε ακολούθησε φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες με την πρώτη εκχύλιση και το υπερκείμενο (B) συλλέχθηκε και αποθηκεύτηκε σε κατάψυξη.

Τα εκχυλίσματα (A+B) αναμιγνύθηκαν και συμπυκνώθηκαν σε Rotary Evaporator υπό κενό στους 35°C μέχρι να απομακρυνθούν οι διαλύτες. Το διάλυμα που προέκυψε μεταγγίστηκε σε vial (του οποίου είχε μετρηθεί το βάρος με το καπάκι), παρέμειναν στην κατάψυξη για μια μέρα και λυοφιλώθηκαν μέχρι ξηρού για να προκύψει το crude extract. Έπειτα, ζυγίστηκε το βάρος του vial με το καπάκι για να προσδιορίσουμε το ξηρό βάρος των εκχυλισμάτων. Από το μέσο όρο του ζυγίσματος των τριών δειγμάτων προέκυψε ότι το βάρος των φαινολικών σε 3g σκόνης φλοιών είναι 1.581,7g και σε 3g γιγάρτων 375,7g αντίστοιχα.

4. Προετοιμασία δειγμάτων διαλύματος προσομοίωσης οίνου (Model Wine)

και οίνου

Οι αναλογίες προσθήκης φλοιών και γιγάρτων στα δείγματα που επιλέχθηκαν να μελετηθούν είναι οι παρακάτω:

- 1) 100% φλοιοί – 0% γίγαρτα
- 2) 80% φλοιοί – 20% γίγαρτα
- 3) 60% φλοιοί – 40% γίγαρτα
- 4) 40% φλοιοί – 60% γίγαρτα
- 5) 20% φλοιοί – 80% γίγαρτα
- 6) 0% φλοιοί – 100% γίγαρτα

Για την συγκέντρωση προσθήκης των αναλογιών της σκόνης των φλοιών και γιγάρτων επιλέχθηκε η τελική συγκέντρωση φαινολικών συστατικών να είναι 1,5g/l, τόσο στα δείγματα του model wine όσο και σε αυτά του οίνου. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του βάρους των φαινολικών συστατικών των φλοιών και γιγάρτων, τα οποία θα αναλυθούν στο αντίστοιχο κεφάλαιο, από την εκχύλιση των φαινολικών ουσιών σε 1g σκόνης φλοιών περιέχονται κατά μέσο όρο 0,527g φαινολικών συστατικών και σε 1g σκόνης γιγάρτων 0,125g αντίστοιχα.

Η εκχύλιση των φλοιών και γιγάρτων πραγματοποιήθηκε σε 100ml model wine και 1L οίνου βάσης και για κάθε δείγμα ακολούθησε και επαναληπτικό δείγμα.

Με βάση τα παραπάνω οι ποσότητες προσθήκης σκόνης φλοιών και γιγάρτων για κάθε αναλογία στο model wine, ώστε η τελική συγκέντρωση φαινολικών να είναι 0,15g/100ml, είναι οι παρακάτω:

Πίνακας 1. Ποσότητες προσθήκης σκόνης φλοιών και γιγάρτων σε δείγματα model wine

Δείγματα Model Wine		
100% φλοιοί-0% γίγαρτα	0,2846g σκόνη φλοιών	0g σκόνη γιγάρτων
80% φλοιοί-20% γίγαρτα	0,2276g σκόνη φλοιών	0,240g σκόνη γιγάρτων

60% φλοιοί-40% γίγαρτα	0,1707g σκόνη φλοιών	0,480g σκόνη γιγάρτων
40% φλοιοί-60% γίγαρτα	0,1138g σκόνη φλοιών	0,720g σκόνη γιγάρτων
20% φλοιοί-80% γίγαρτα	0,056g σκόνη φλοιών	0,960g σκόνη γιγάρτων
0% φλοιοί-100% γίγαρτα	0g σκόνη φλοιών	1,200g σκόνη γιγάρτων

Αναλόγως οι ποσότητες προσθήκης σκόνης φλοιών και γιγάρτων για κάθε αναλογία στον οίνο βάσης, ώστε η τελική συγκέντρωση φαινολικών να είναι 1g/L, είναι οι παρακάτω:

Πίνακας 2. Ποσότητες προσθήκης σκόνης φλοιών και γιγάρτων σε δείγματα οίνου

Δείγματα Οίνου		
100% φλοιοί-0% γίγαρτα	2,846g σκόνη φλοιών	0g σκόνη γιγάρτων
80% φλοιοί-20% γίγαρτα	2,277g σκόνη φλοιών	2,4g σκόνη γιγάρτων
60% φλοιοί-40% γίγαρτα	1,707g σκόνη φλοιών	4,8g σκόνη γιγάρτων
40% φλοιοί-60% γίγαρτα	1,138g σκόνη φλοιών	7,2g σκόνη γιγάρτων
20% φλοιοί-80% γίγαρτα	0,596g σκόνη φλοιών	9,6g σκόνη γιγάρτων
0% φλοιοί-100% γίγαρτα	0g σκόνη φλοιών	12g σκόνη γιγάρτων

Για την παρασκευή 1200ml model wine για τα συνολικά 12 δείγματα (6 δείγματα και 6 επαναλήψεις) χρησιμοποιήθηκαν με βάση το πρωτόκολλο:

- 1.050ml απιονισμένο H₂O
- 150ml etOH 95%
- 6g τρυγικό οξύ

Σε ογκομετρική του 1L προσθέτουμε 700ml απιονισμένο H₂O, 125ml αιθανόλη 95% και 5g/l τρυγικό οξύ και η διόρθωση του pH γίνεται με NaOH 1N ώστε να έχουμε pH 3,3 και στην συνέχεια συμπληρώνουμε με απιονισμένο νερό μέχρι τον τελικό όγκο. Αναλόγως σε ογκομετρική των 200ml παρασκευάστηκαν και τα υπολειπόμενα 200ml model wine και αναμιγνύθηκαν με το 1L ώστε να έχουμε τον τελικό όγκο των 1200ml.

5. Κινητική εκχύλισης

Η εκχύλιση των φλοιών και γιγάρτων πραγματοποιήθηκε πρώτα στα δείγματα του model wine. Για την παρατήρηση της κινητικής εκχύλισης εφαρμόστηκαν οι φωτομετρικές αναλύσεις της έντασης χρώματος, του Δείκτη Φαινολικών Ουσιών (ΔΦΟ) και ο προσδιορισμός ταννινών

με την μέθοδο της Methyl Cellulose Precipitable (MCP). Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στις 24, 48 και 72 ώρες αντίστοιχα, αποθηκεύοντας σε κάθε στάδιο 5ml δείγματος σε ψυγείο για τις υπόλοιπες αναλύσεις με βάση τον τελικό χρόνο εκχύλισης που θα επιλέξουμε. Με βάση τα αποτελέσματα της κινητικής της εκχύλισης, που θα αναλυθούν στο αντίστοιχο κεφάλαιο, ο ιδανικός χρόνος εκχύλισης είναι στις 48 ώρες. Ο ίδιος χρόνος εκχύλισης εφαρμόστηκε και έπειτα στα δείγματα οίνου, όπου στις 48 ώρες τα στερεά υπολείμματα σκόνης φλοιών και γιγάρτων απομακρύνθηκαν με φιλτράρισμα και στην συνέχεια ακολούθησαν οι αναλύσεις και ο οργανοληπτικός έλεγχος.

6. Προσδιορισμός έντασης χρώματος

Υλικά και εξοπλισμός

- Φασματοφωτόμετρο με δυνατότητα μέτρησης απορρόφησης από 300 ως 700 nm.
- Κυψελίδες υάλου με οπτική διαδρομή 1 cm και 1 mm.

Διαδικασία προσδιορισμού

Προετοιμασία δείγματος: Αν ο οίνος είναι θολός θα πρέπει να διαυγάσει με φυγοκέντρηση, ενώ από τους νεαρούς οίνους θα πρέπει να αφαιρεθεί το διοξείδιο του άνθρακα με ανάδευση υπό κενό.

Μέτρηση: Η απορρόφηση υπολογίζεται με την μέτρηση της οπτικής πυκνότητας με την βοήθεια φασματοφωτομέτρου στα τρία μήκη κύματος (A420, A520, A620). Το αποδεκτό εύρος τιμών οπτικής πυκνότητας είναι 0.3-0.7. Οι μετρήσεις γίνονται σε κυψελίδες των 10 mm. Σαν υγρό αναφοράς για τον μηδενισμό του φωτομέτρου χρησιμοποιείται απιονισμένο νερό. Αν, όπως στην περίπτωση των ερυθρών οίνων, η απορρόφηση υπερβαίνει τα προαναφερόμενα όρια χρησιμοποιούνται κυψελίδες 1 mm και το αποτέλεσμα πολλαπλασιάζεται επί δέκα.

Έκφραση αποτελεσμάτων

Η ένταση του οίνου υπολογίζεται από τον τύπο $E = A_{420} + A_{520} + A_{620}$ κι εκφράζεται

σαν καθαρός αριθμός με τρία δεκαδικά ψηφία.

7. Προσδιορισμός Δείκτη Φαινολικών Ουσιών (ΔΦΟ)

Υλικά και εξοπλισμός

- Φασματοφωτόμετρο
- Φυγόκεντρος ή ηθμός 1,2 μm
- Κυψελίδες χαλαζία μήκους οπτικής διαδρομής 1cm
- Ογκομετρική φιάλη των 100 mL
- Σιφόνιο 1 mL

Διαδικασία προσδιορισμού

Το δείγμα του γλεύκους ή του οίνου φυγοκεντρείται στις 4000 rpm για 5 min. Στην συνέχεια λαμβάνεται 1 mL από αυτό και μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL όπου αραιώνεται με απιονισμένο νερό μέχρι την χαραγή των 100 mL (αραίωση 1:100). Μετριέται η απορρόφηση σε μήκος κύματος 280 nm.

Ο ΔΦΟ προκύπτει από την ακόλουθη σχέση:

$$\Delta\Phi\text{O} = \text{OD} \times \text{Αραίωση δείγματος (εδώ 100)}$$

Όπου OD: η ένδειξη του οργάνου

8. Προσδιορισμός ταννινών – Methyl Cellulose Precipitable (MCP)

Προετοιμασία αντιδραστηρίων

- Κορεσμένο διάλυμα θεικού αμμωνίου (ammonium sulfate): Σε φιάλη αντιδραστηρίων με βιδωτό πάμα (duran) των 500ml μεταφέρουμε 300ml H₂O. Υπό συνεχή ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα, προσθέτουμε κρυστάλλους θεικού αμμωνίου μέχρι το σημείο κορεσμού. Συνεχίζουμε να προσθέτουμε μέχρι να σχηματιστεί στον πάτο μια στιβάδα στερεού θεικού αμμωνίου ύψους 1,5cm. Αν οι κρύσταλλοι λιγοστεύουν προσθέτουμε και άλλους. Διατηρείται για περίπου 6 μήνες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

- Διάλυμα 0,04% μεθυλ-κυτταρίνης (methyl cellulose): Για την παρασκευή 200ml διαλύματος θερμαίνουμε περίπου 60ml απιονισμένο H₂O στους 80°C και παγώνουμε περίπου 140ml απιονισμένο H₂O στους 0-5°C. Σε ανάλογο ποτήρι ζέσεως μεταφέρουμε τα 60ml ζεστό H₂O και προσθέτουμε, υπό συνεχή έντονη ανάδευση, 0,08g μεθυλ-κυτταρίνης μέχρι να διαλυθεί τελείως. Αν το πολυμερές κολλήσει στα τοιχώματα με ένα μικρό πουάρ διαλύουμε τα συσσωματώματα με ζεστό νερό. Κατόπιν προσθέτουμε σιγά σιγά το κρύο νερό και μεταφέρουμε το ποτήρι σε παγόλουτρο για 20-40 λεπτά αναδεύοντάς το. Στο τέλος του χρόνου, το βγάζουμε από το παγόλουτρο και το αφήνουμε για ανάδευση μέχρι το διάλυμα να γίνει τελείως διαυγές (ίσως όλο το βράδυ). Συμπληρώνουμε τον όγκο σε ογκομετρική φιάλη 200ml με απιονισμένο νερό. Το διάλυμα είναι σταθερό για δύο εβδομάδες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Αν θολώσει το απορρίπτουμε.
- Πρότυπο διάλυμα κατεχίνης 1g/l: Για 100ml διαλύματος, σε ανάλογο ποτήρι ζέσεως, μεταφέρονται 10ml αιθανόλης, μικρή ποσότητα H₂O και 100mg κατεχίνης. Αναδεύονται μέχρι να διαλυθούν και συμπληρώνεται ο όγκος με H₂O σε ογκομετρική φιάλη των 100ml.

Προετοιμασία δείγματος

Η αραίωση του δείγματος γίνεται με απιονισμένο H₂O. Ο συντελεστής αραίωσης προσδιορίζεται πειραματικά ανάλογα με το δείγμα, δηλαδή δημιουργούνται διαφορετικές αραιώσεις και ακολουθούν μετρήσεις. Στα δείγματα του model wine η ανάλυση έγινε χωρίς να προηγηθεί αραίωση, ενώ στα δείγματα του οίνου έγινε αραίωση με συντελεστή αραίωσης (ΣΑ) = 3.

Διαδικασία μέτρησης

Για την μέθοδο χρησιμοποιούνται erpendorf των 2ml. Για κάθε δείγμα ετοιμάζουμε δύο

ependorf:

- Μάρτυρας:

Σε 50μl δείγματος (αν χρειάζεται προηγείται αραιώση) προστίθενται 400μl κορεσμένου θειικού αμμωνίου και 1550μl απιονισμένου νερού και αναδεύονται σε vortex. Το διάλυμα παραμένει σε ηρεμία, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, για 10 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 10.000 rpm. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε κυψελίδα χαλαζία και μετρίεται η απορρόφηση στα 280nm (A_{280-b1}).

- Δείγμα:

Σε 50μl δείγματος (αν χρειάζεται προηγείται αραιώση) προστίθενται 600μl διάλυμα μεθυλκυτταρίνης. Το μίγμα αναδεύεται ήπια με αναστροφή μερικές φορές και αφήνεται σε ηρεμία για 2-3 λεπτά. Κατόπιν προστίθενται 400μl κορεσμένου θειικού αμμωνίου και 950μl απιονισμένου νερού και αναδεύονται σε vortex. Το διάλυμα παραμένει σε ηρεμία, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, για 10 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 10.000 rpm. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε κυψελίδα χαλαζία και μετρίεται η απορρόφηση στα 280nm (A_{280-s}).

Για το μηδενισμό του φωτομέτρου χρησιμοποιείται απιονισμένο H₂O.

Πρότυπη καμπύλη αναφοράς

Για την καμπύλη αναφοράς παρασκευάζονται οι παρακάτω συγκεντρώσεις κατεχίνης, από 10 έως 100mg/l, σε τελικό όγκο 2ml και ακολουθεί η μέθοδος προσδιορισμού σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 3. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς MCP

[Κατεχίνη] (mg/l)	Πρότυπο διάλυμα κατεχίνης 1g/l (μl)	H ₂ O (μl)
10	20	1980
25	50	1950
50	100	1900
75	150	1850

100	200	1800
-----	-----	------

Παίρνουμε κατευθείαν τις απορροφήσεις των συγκεντρώσεων στα 280nm. Αντιστοιχίζοντας τις συγκεντρώσεις της κατεχίνης με τις απορροφήσεις τους σε ένα σύστημα αξόνων λαμβάνεται η καμπύλη αναφοράς και η ευθεία που την περιγράφει της μορφής $y=ax+\beta$.

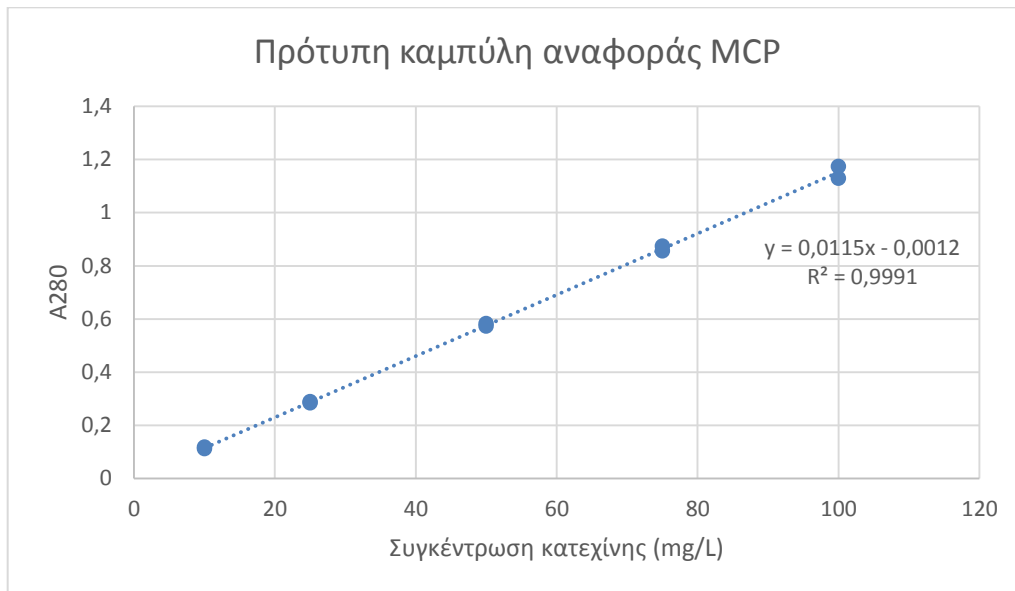
Αποτελέσματα πρότυπης καμπύλης αναφοράς

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης αναφοράς έγινε μέτρηση της απορρόφησης διαφορετικών συγκεντρώσεων κατεχίνης στα 280nm. Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε σε 2 επαναλήψεις και προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα:

Πίνακας 4. Αποτελέσματα πρότυπης καμπύλης αναφοράς MCP

Συγκέντρωση κατεχίνης (mg/L)	Απορρόφηση στα 280nm (A280nm)	Επανάληψη Απορρόφησης στα 280nm (A280nm)
10	0,111	0,117
25	0,284	0,288
50	0,572	0,582
75	0,855	0,874
100	1,129	1,173

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη αναφοράς από τις τιμές της απορρόφησης στα 280nm συναρτήσει της συγκέντρωσης κατεχίνης (mg/L):



Γράφημα 1. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς MCP

Η πρότυπη καμπύλη έχει γραμμικό συντελεστή 0,9991 και ακολουθεί την εξίσωση $y = 0,00115x - 0,0012$ (όπου y η απορρόφηση στα 280 nm – άξονας Y , και x η συγκέντρωση σε mg/L κατεχίνης – άξονας X).

Υπολογισμοί

Αρχικά από την διαφορά

$$A_{280-tan} = (A_{280-bl}) - (A_{280-s})$$

υπολογίζουμε την απορρόφηση που οφείλεται στις ταννίνες.

Από την καμπύλη αναφοράς υπολογίζουμε την συγκέντρωση των ταννινών, σε ισοδύναμα κατεχίνης, στο διάλυμα μέτρησης (C_{ds})

Η τελική συγκέντρωση των ταννινών στο δείγμα, σε (mg/l), είναι:

$$C_{\text{δείματος}} = C_{ds} * 40 * (\text{αραίωση})$$

όπου 40: ο συντελεστής αραίωσης το δείγματος στο διάλυμα μέτρησης

9. Προσδιορισμός ταννινών με την μέθοδο BSA (δέσμευση από πρωτεΐνες – δείκτης στυπτικότητας)

Προετοιμασία αντιδραστηρίων

- Model wine: Σε ογκομετρική του 1L προσθέτουμε 700ml απιονισμένο H₂O, 125ml αιθανόλη 95% και 5g/l τρυγικό οξύ και η διόρθωση του pH γίνεται με NaOH 1N ώστε να έχουμε pH 3,3 και στην συνέχεια συμπληρώνουμε με απιονισμένο νερό μέχρι τον τελικό όγκο.
- Διάλυμα A (200mM acetic acid, 170mM NaCl και NaOH (pH 4,9)): Για 200ml διαλύματος, σε ανάλογο ποτήρι ζέσεως, τοποθετούμε 150ml H₂O και προσθέτουμε 2,4g οξικού οξέος και 1,98g NaCl. Αναδεύονται μέχρι να διαλυθούν και γίνεται διόρθωση του pH στην τιμή 4,9 με 1N NaOH. Ο όγκος συμπληρώνεται σε ογκομετρική φιάλη 200ml με H₂O.
- Πρωτεϊνικό διάλυμα BSA 1g/l: Για 100ml διαλύματος, σε ανάλογο ποτήρι ζέσεως, τοποθετείται μικρή ποσότητα διάλυμα A και 100mg BSA-fraction V. Ακολουθεί ανάδευση για να διαλυθεί κι ο όγκος συμπληρώνεται σε ογκομετρική φιάλη 100ml με διάλυμα A.
- Διάλυμα TEA-SDS [5% v/v triethanolamine (TEA) – 10% w/v sodium dodecyl sulfate (SDS)]. Για 100ml διαλύματος, σε ανάλογο ποτήρι ζέσεως, τοποθετούμε 80ml H₂O και προσθέτουμε 5ml TEA και 10g SDS με πολύ ήπια ανάδευση. Το διάλυμα παραμένει μια μέρα και ο όγκος συμπληρώνεται την επόμενη σε ογκομετρική φιάλη 100ml με H₂O.
- Διάλυμα FeCl₃ (10mM FeCl₃ σε 0,01N HCl): Για 100ml διαλύματος, σε ανάλογο ποτήρι ζέσεως, τοποθετούμε μικρή ποσότητα H₂O, 0,083ml πυκνού HCl 37% και 270mg ένυδρου FeCl₃. Αναδεύονται μέχρι να διαλυθούν και ο όγκος συμπληρώνεται σε ογκομετρική φιάλη 100ml με H₂O.
- Πρότυπο διάλυμα κατεχίνης 1g/l: Για 100ml διαλύματος, σε ανάλογο ποτήρι ζέσεως, τοποθετούμε μικρή ποσότητα H₂O, 10ml αιθανόλη και 100mg κατεχίνης. Αναδεύονται

μέχρι να διαλυθούν και ο όγκος συμπληρώνεται με H₂O σε ογκομετρική φιάλη 100ml.

Προετοιμασία δείγματος

Η αραίωση του δείγματος με model wine γίνεται αναλόγως με την συγκέντρωση των ταννινών του. Ο συντελεστής αραίωσης προσδιορίζεται πειραματικά ανάλογα με το δείγμα, δηλαδή δημιουργούνται διαφορετικές αραιώσεις και ακολουθούν μετρήσεις. Οι απορροφήσεις πρέπει να είναι < 1. Στα δείγματα του model wine η ανάλυση έγινε χωρίς να προηγηθεί αραίωση, ενώ στα δείγματα οίνου έγινε αραίωση με συντελεστή αραίωσης (ΣΑ) = 5.

Διαδικασία μέτρησης

Για την μέθοδο χρησιμοποιούνται erpendorf των 2ml. Στα erpendorf τοποθετούνται 500μl δείγματος και 1ml πρωτεϊνικού διαλύματος BSA. Αναδεύεται ήπια για 15 λεπτά και ακολουθεί φυγοκέντρηση του δείγματος στις 12.500 rpm για 5 λεπτά.

Το υπερκείμενο απομακρύνεται και στο ίζημα προσθέτουμε 250μl μη πρωτεϊνικού διαλύματος (διάλυμα Α) χωρίς να διαταράξουμε το ίζημα. Ακολουθεί φυγοκέντρηση του δείγματος στις 12.500 rpm για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρύνεται.

Στο ίζημα προσθέτουμε 875μl διαλύματος TEA-SDS και αφήνουμε σε ηρεμία για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στην συνέχεια αναδεύουμε σε vortex για να διαλύσουμε το ίζημα και μετά την ανάδευση μετράμε την απορρόφηση στα 510nm (A1) με κυβελίδα στένωσης.

Επιστρέφουμε το μίγμα στο erpendorf και στην συνέχεια προσθέτουμε 125μl διαλύματος FeCl₃ και μετά από 15 λεπτά μετράμε ξανά την απορρόφηση στα 510nm (A2).

Για το μηδενισμό του φωτομέτρου χρησιμοποιείται διάλυμα TEA-SDS.

Πρότυπη καμπύλη αναφοράς

Για την καμπύλη αναφοράς παρασκευάζονται οι παρακάτω συγκεντρώσεις κατεχίνης, από 10 έως 150mg/l, και ακολουθεί η μέθοδος προσδιορισμού σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 5. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς BSA

[Κατεχίνη] (mg/l)	Πρότυπο διάλυμα κατεχίνης 1g/l (μl)	Διάλυμα TEA-SDS (μl)	Διάλυμα FeCl ₃ (μl)
10	10	865	125
25	25	850	125
50	50	825	125
100	100	775	125
150	150	725	125

Τα μίγματα που δημιουργούνται αναδεύονται σε vortex και παραμένουν κλειστά, σε θερμοκρασία δωματίου, για 10 λεπτά. Μετράμε τις απορροφήσεις στα 510nm. Αντιστοιχίζοντας τις συγκεντρώσεις της κατεχίνης με τις απορροφήσεις τους σε ένα σύστημα αξόνων λαμβάνεται η καμπύλη αναφοράς και η ευθεία που την περιγράφει της μορφής $y=ax+\beta$.

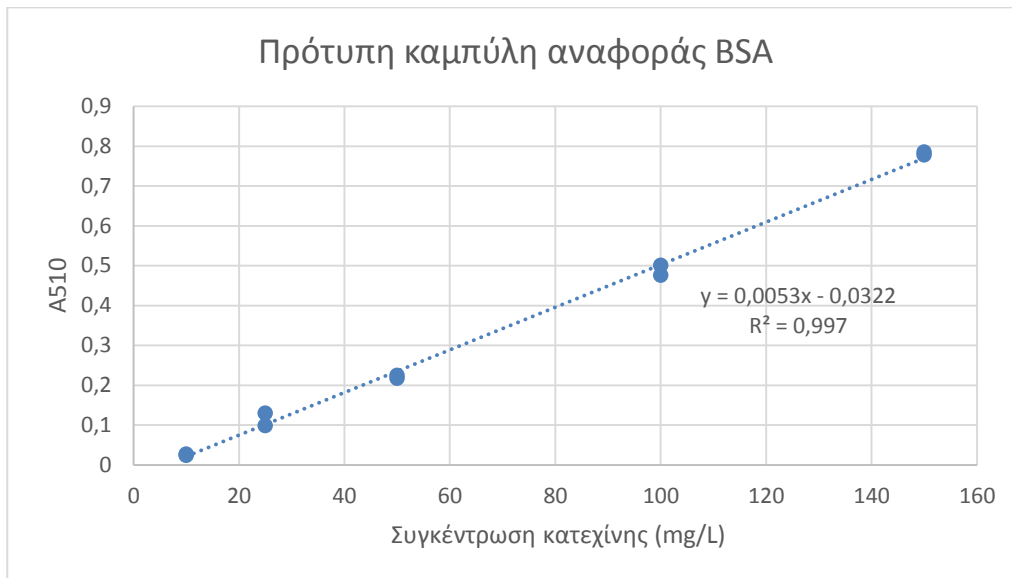
Αποτελέσματα πρότυπης καμπύλης αναφοράς

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης αναφοράς έγινε μέτρηση της απορρόφησης διαφορετικών συγκεντρώσεων κατεχίνης στα 510nm. Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε σε 2 επαναλήψεις και προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα:

Πίνακας 6. Αποτελέσματα πρότυπης καμπύλης αναφοράς BSA

Συγκέντρωση κατεχίνης (mg/L)	Απορρόφηση στα 510nm (A510nm)	Επανάληψη Απορρόφησης στα 510nm (A510nm)
10	0,024	0,027
25	0,13	0,098
50	0,217	0,224
100	0,476	0,501
150	0,778	0,785

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη αναφοράς από τις τιμές της απορρόφησης στα 510nm συναρτήσει της συγκέντρωσης κατεχίνης (mg/L):



Γράφημα 2. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς BSA

Η πρότυπη καμπύλη αναφοράς έχει γραμμικό συντελεστή 0,997 και ακολουθεί την εξίσωση $y = 0,0053x - 0,0322$ (όπου y η απορρόφηση στα 510 nm – άξονας Y , και x η συγκέντρωση σε mg/L κατεχίνης – άξονας X).

Υπολογισμοί

Αρχικά υπολογίζουμε την διαφορά

$$A_{510} = (A2) - (A1)$$

Από την καμπύλη αναφοράς υπολογίζουμε την συγκέντρωση των ταννινών, σε ισοδύναμα κατεχίνης, έστω $C1$.

Η τελική συγκέντρωση των ταννινών στο δείγμα, σε (mg/l), είναι:

$$C_{\text{δείγματος}} = C1 * (\Sigma A)$$

όπου ΣA : ο συντελεστής αραίωσης το δείγματος

10. Αντιοξειδοτική ικανότητα με τη μέθοδο DPPH

Προετοιμασία αντιδραστηρίων

- Διάλυμα DPPH: Σε ζυγό ακριβείας ζυγίζουμε 10mg DPPH και διαλύονται σε 20ml μεθανόλης. Αυτό είναι το stock διάλυμα. Με αραίωση 2:50 παρασκευάζουμε το διάλυμα

μέτρησης. Και τα δύο διαλύματα αποθηκεύονται στην κατάψυξη.

- Πρότυπο διάλυμα Trolox 2mM: 12,5mg Trolox διαλύονται σε 25ml αιθανόλης 96%.

Προετοιμασία δείγματος

Η αραιώση του δείγματος γίνεται με απιονισμένο H₂O, ανάλογα με την συγκέντρωση των φαινολικών. Ο συντελεστής αραιώσης προσδιορίζεται πειραματικά ανάλογα με το δείγμα, δηλαδή δημιουργούνται διαφορετικές αραιώσεις και ακολουθούν μετρήσεις. Στα δείγματα του model wine η ανάλυση έγινε χωρίς να προηγηθεί αραιώση, εκτός από τα δείγματα των αναλογιών 20% φλοιοί – 80% γίγαρτα και 0% φλοιοί - 100% γίγαρτα, όπου έγινε αραιώση με συντελεστή αραιώσης (ΣΑ) = 3. Στα δείγματα του οίνου έγινε αραιώση με συντελεστή αραιώσης (ΣΑ) = 20.

Διαδικασία μέτρησης

Για την μέθοδο χρησιμοποιούνται πλαστικές κυβέττες φωτομέτρου και προσθέτουμε 50μl δείγματος και 1950μl διαλύματος DPPH. Η κυβέττα κλείνεται με πλαστικό πώμα και αφού ανακινήσουμε 4 με 5 φορές μετράμε την απορρόφηση στα 515nm με μάρτυρα dH₂O (t=0). Μετά από 30 λεπτά μετράμε ξανά την απορρόφηση στο ίδιο μήκος κύματος (t=30). Από τις δύο απορροφήσεις υπολογίζουμε την % διαφορά στην απορρόφηση:

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

Πρότυπη καμπύλη αναφοράς

Για την καμπύλη αναφοράς παρασκευάζουμε πρότυπο διάλυμα Trolox με συγκέντρωση 2mM σε αιθανόλη. Σε erpendorf δημιουργούνται οι παρακάτω πρότυπες συγκεντρώσεις σε τελικό όγκο:

Πίνακας 7. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς DPPH

Τελική συγκέντρωση Trolox (mM)	Πρότυπο διάλυμα Trolox (μl)	Αιθανόλη (μl)
0	0 (μάρτυρας)	1000

0,08	40	960
0,16	800	920
0,20	100	900
0,40	200	800
0,60	300	700
0,80	400	600

Ακολουθεί η ανάλυση των δειγμάτων σύμφωνα με τη μέθοδο. Αντιστοιχίζοντας τις πρότυπες συγκεντρώσεις με τις αντίστοιχες % ΔA_{515} κατασκευάζουμε την πρότυπη καμπύλη και από την ευθεία που την περιγράφει υπολογίζουμε την αντιοξειδωτική ικανότητα του δείγματος σε ισοδύναμα Trolox ή TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). Αν έχει προηγηθεί αραίωση του δείγματος το συνυπολογίζουμε στο τελικό αποτέλεσμα.

Αποτελέσματα πρότυπης καμπύλης αναφοράς

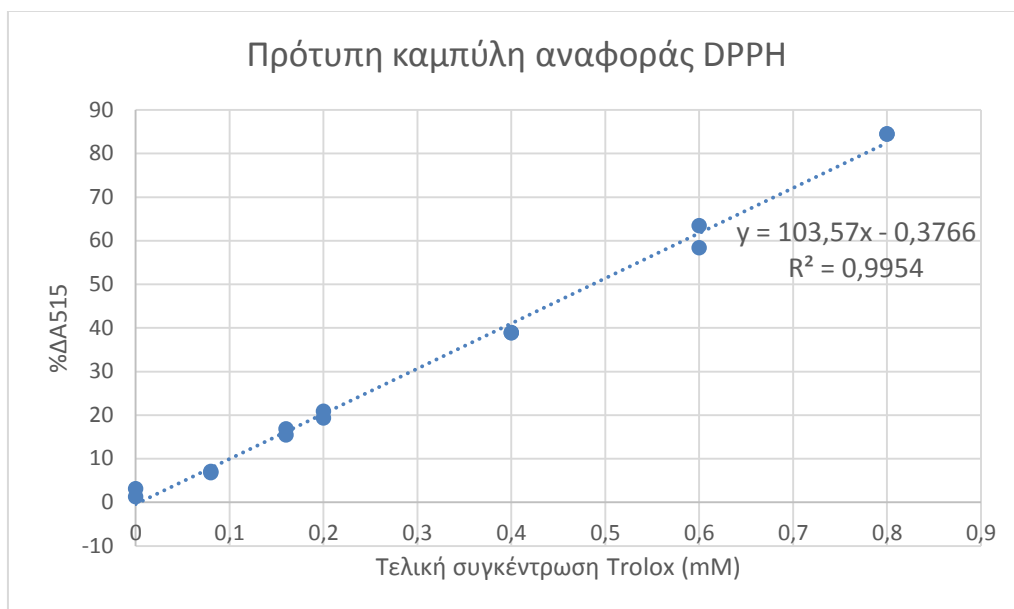
Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης έγινε μέτρηση της απορρόφησης διαφορετικών συγκεντρώσεων Trolox στα 515nm. Εφαρμόζοντας τα αποτελέσματα των μετρήσεων στην εξίσωση της μεθόδου ($\% \Delta A_{515} = [(A_{515}(t=0) - A_{515}(t=30)) / A_{515}(t=0)] \times 100$) υπολογίζουμε την % διαφορά στην απορρόφηση στα 515nm. Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε σε δύο επαναλήψεις και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 8. Αποτελέσματα πρότυπης καμπύλης αναφοράς DPPH

Τελική συγκέντρωση Trolox (mM)	% ΔA_{515}	Επανάληψη % ΔA_{515}
0	1,207	3,086
0,08	6,748	7,039
0,16	15,432	16,806
0,2	19,279	20,806
0,4	38,876	38,802
0,6	58,351	63,392
0,8	84,424	84,459

Με βάση τις παραπάνω τιμές κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη αναφοράς από το

διάγραμμα %ΔΑ συναρτήσει της συγκέντρωσης Trolox (mM):



Γράφημα 3. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς DPPH

Η πρότυπη καμπύλη αναφοράς έχει γραμμικό συντελεστή 0,9954 και ακολουθεί την εξίσωση $y = 103,57x - 0,3766$ (όπου y η %ΔΑ – άξονας Y, και x η συγκέντρωση σε mM Trolox – άξονας X).

11. Προσδιορισμός ανθοκυανών (φωτομετρικά)

Προετοιμασία αντιδραστηρίων

- Υδατικό διάλυμα HCl 2% v/v (5,4ml πυκνό HCl 37% αραιώνεται σε απιονισμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 100ml)
- Αλκοολικό διάλυμα HCl 0,1% v/v (0,27ml πυκνό HCl 37% αραιώνεται σε αιθανόλη 96% μέχρι τελικό όγκο 100ml)
- Διάλυμα NaHSO₃ 15% (37,5ml πυκνό NaHSO₃ 40% αραιώνεται σε απιονισμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 100ml)

Διαδικασία μέτρησης

Σε μικρή κωνική φιάλη προσθέτουμε 0,5ml δείγμα, 0,5ml αλκοολικό διάλυμα HCl 0,1% και

10ml υδατικό διάλυμα HCl 2%. Σε δύο δοκιμαστικούς σωλήνες τοποθετούμε 2,5ml από το παραπάνω διάλυμα στον καθένα. Στον πρώτο σωλήνα προσθέτουμε 1ml απιονισμένο H₂O, ενώ στον δεύτερο 1ml διάλυμα NaHSO₃. Κλείνουμε με parafilm και αφήνουμε σε ηρεμία για 20 λεπτά. Στο τέλος του χρόνου λαμβάνονται οι απορροφήσεις των δύο δειγμάτων στα 520nm, χρησιμοποιώντας ως μάρτυρα για τον μηδενισμό του οργάνου απιονισμένο H₂O.

Υπολογισμοί

Η συγκέντρωση των ανθοκυανών δίνεται από τη σχέση:

$$\text{Ανθοκυάνες (mg/l)} = (\text{OD}_{\text{H}_2\text{O}} - \text{OD}_{\text{NaHSO}_3}) * 875$$

όπου OD_{H₂O}: η απορρόφηση του δείγματος στο οποίο προστέθηκε H₂O

OD_{NaHSO₃}: η απορρόφηση του αποχρωματισμένου δείγματος

12. Προσδιορισμός ανθοκυανών με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

(HPLC)

Προετοιμασία δείγματος

Φιλτράρουμε τα δείγματα με φίλτρο σύριγγας με πορότητα 0.2μm και έπειτα τα τοποθετούμε σε φιαλίδια του αυτόματου δειγματολήπτη για HPLC.

Διαδικασία μέτρησης

- Στήλη: SVEA C18 (5μm, 4.6x250mm) (Nanologica)
- Διαλύτες: (A) 10% formic acid in H₂O και (B) MeOH
- Gradient:

Πίνακας 9. Βαθμονόμηση HPLC για τον προσδιορισμό των ανθοκυανών

Χρόνος (min)	Διαλύτης A	Διαλύτης B
Αρχικές συνθήκες	90	10
22	50	50
32	5	95
34	5	95

35	90	10
38	90	10

- Ροή: 1ml/min
- Ανίχνευση: 520nm
- Όγκος έγχυσης: 100μl στα δείγματα model wine και 50μl στα δείγματα οίνου

Πρότυπη καμπύλη αναφοράς

Για την καμπύλη αναφοράς παρασκευάζουμε πρότυπο διάλυμα μαλβιδίνης 0.1mg/ml. Με ενέσεις διαφορετικού όγκου αναλόγως με την ποσότητα της μαλβιδίνης που θέλουμε αντιστοιχίζοντας την μάζα της μαλβιδίνης με το εμβαδό των κορυφών που προκύπτουν από την HPLC κατασκευάζουμε την πρότυπη καμπύλη. Από την ευθεία που την περιγράφει υπολογίζεται η ποσότητα των ανθοκυανών σε ισοδύναμα μαλβιδίνης στα δείγματα όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 10. Πρότυπη καμπύλη μαλβιδίνης για τον προσδιορισμό των ανθοκυανών με HPLC

Πρότυπη καμπύλη μαλβιδίνης		
		Διαιρούμε το εμβαδό δια 1.000.000 (από μV*sec σε V*sec)
Μαλβιδίνη (μg)	Area (μV*sec)	Area (V*sec)
0,1	311757	0,312
0,2	640844	0,641
0,3	924649	0,925
0,4	1246932	1,247
0,5	1529953	1,530
0,6	1874350	1,874
0,8	2490618	2,491
1	3102811	3,103
2	6487320	6,487
3	9637376	9,637

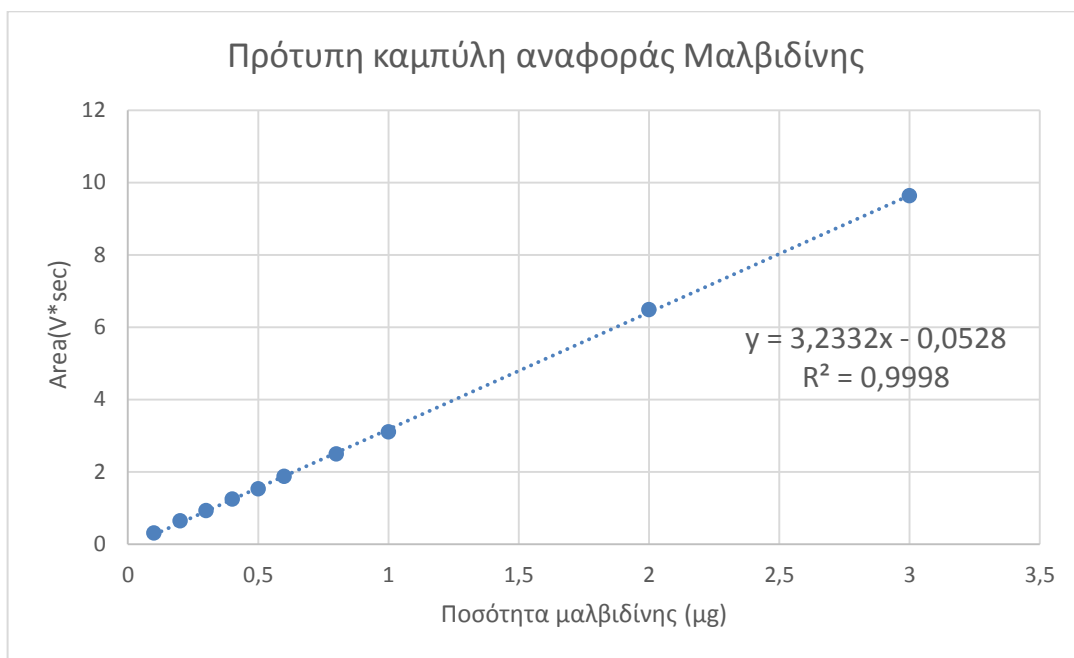
Αποτελέσματα πρότυπης καμπύλης αναφοράς

Για τον υπολογισμό των αποτελεσμάτων απαιτείται η κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς της μαλβιδίνης, όπως αναφέρθηκε και στο προηγούμενο μέρος. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν παρουσιάζονται παρακάτω:

Πίνακας 11. Αποτελέσματα πρότυπης καμπύλης αναφοράς Μαλβιδίνης

Μαλβιδίνη (μg)	Area(V*sec)
0,1	0,312
0,2	0,641
0,3	0,925
0,4	1,247
0,5	1,53
0,6	1,874
0,8	2,491
1	3,103
2	6,487
3	9,637

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη αναφοράς από τις τιμές του εμβαδού των κορυφών που προέκυψαν από την HPLC συναρτήσει της ποσότητας της μαλβιδίνης (μg):



Γράφημα 4. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς Μαλβιδίνης

Η πρότυπη καμπύλη αναφοράς έχει γραμμικό συντελεστή 0,9998 και ακολουθεί την εξίσωση $y = 3,2332x - 0,0528$ (όπου y το $\text{Area}(\text{V} \cdot \text{sec})$ – άξονας Y , και x η ποσότητα της μαλβιδίνης σε μg – άξονας X).

Υπολογισμοί

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των ανθοκυανινών στα δείγματα λαμβάνουμε τα εμβαδά των κορυφών από την HPLC και μετατρέπονται από από $\mu\text{V} \cdot \text{sec}$ σε $\text{V} \cdot \text{sec}$ διαιρώντας με 1.000.000. Έπειτα εφαρμόζεται η πρότυπη ευθεία και υπολογίζουμε την κάθε κορυφή σε ισοδύναμα μαλβιδίνης (ME)(σε μg). Από τον όγκο της ένεσης υπολογίζουμε την κάθε κορυφή σε ισοδύναμα μαλβιδίνης (ME) σε mg/L . Το τελικό αποτέλεσμα δίνεται από την σχέση: $\text{ME σε mg/L} = [\text{ME}(\mu\text{g}) / \text{όγκος ένεσης (ml)}]$.

13.Προσδιορισμός μέσου βαθμού πολυμερισμού (mDP) ταννινών με HPLC

- Εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid phase extraction, SPE)

Σε συσκευή SPE τοποθετούμε στήλη Oasis HLB cartridges (3ml, 50mg, 30 μm , Oasis Waters). Συνδέουμε την συσκευή με αντλία κενού και ρυθμίζουμε την ταχύτητα ροής ώστε να

περνά 1 σταγόνα / 2 sec (20 KPa). Για την ενεργοποίηση και τον καθαρισμό της στήλης προσθέτουμε 2ml MeOH και έπειτα 2ml H₂O. Κατόπιν, χωρίς την παροχή κενού περνάμε από το στήλη 1ml από το δείγμα μας. Η προσρόφηση γίνεται με βαρύτητα και αν είναι απαραίτητο εφαρμόζουμε μικρή «πίεση» με την βοήθεια εμβόλου σύριγγας και μόνο στο αρχικό στάδιο της προσρόφησης. Μόλις ολοκληρωθεί η προσρόφηση εφαρμόζουμε κενό με την αντλία για 5 λεπτά για να στεγνώσει η στήλη. Ακολουθεί έκπλυση της στήλης με 40ml διαλύματος 95% ακετονιτρίλιο / 5% 0,01 M HCl (v/v) για την απομάκρυνση των φαινολικών οξέων, των μη πολυμερών φλαβονολών, των φλαβονολών, των ανθοκυανινών και άλλων μονομερών χρωστικών. Για την παραλαβή των πολυμερών προσθέτουμε στη στήλη 300ml καθαρού φορμικού οξέος και στην συνέχεια 3ml 95% v/v μεθανόλης (HPLC grade). Το δείγμα συμπυκνώνεται με ροή αζώτου σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 28-30°C. Η συμπύκνωση γίνεται σε λιγότερο από 45 λεπτά ώστε να πετύχουμε την γρήγορη απομάκρυνση του φορμικού οξέος, καθώς σε κάποιες περιπτώσεις έχουν παρατηρηθεί φαινόμενα υδρόλυσης των πολυμερών. Το ξηρό δείγμα αποθηκεύεται στην κατάψυξη.

- Αντίδραση phloroglucinol

Προετοιμασία αντιδραστηρίων:

- 1) Διάλυμα phloroglucinol: Σε μικρή ποσότητα MeOH διαλύουμε 1g phloroglucinol, 0,2g ασκορβικό οξύ και 0,164ml 37% HCl. Ο όγκος συμπληρώνεται στα 10ml με MeOH και το διάλυμα διατηρείται στην κατάψυξη για 15 ημέρες καλυμμένο με ακουμινόχαρτο.
- 2) Διάλυμα CH₃COONa 40mM: Σε απιονισμένο H₂O διαλύουμε 0,272g ένυδρο οξικό νάτριο (με 3H₂O) και συμπληρώνεται ο όγκος στα 50ml με H₂O.

Διαδικασία: Γίνεται επαναδιαλυτοποίηση του ξηρού δείγματος που έχει αποθηκευτεί στην κατάψυξη στο τέλος της SPE με 100ml καθαρής μεθανόλης. Στην συνέχεια προσθέτουμε 100ml

διαλύματος phloroglucinol. Αναδεύουμε και το μίγμα παραμένει για 20 λεπτά στους 50°C. Στο τέλος του χρόνου η αντίδραση σταματάει προσθέτοντας 1ml διαλύματος οξικού νατρίου. Φιλτράρουμε το δείγμα με φίλτρο σύριγγας 0,2μm και το τοποθετούμε σε μπουκαλάκι του αυτόματου δειγματολήπτη για HPLC.

- HPLC

- Στήλη: SVEA C18 (5μm, 250x4,6mm) (Nanologica)
- Διαλύτες: (A) 1% AcCOOH και (B) MeOH
- Gradient:

Πίνακας 12. Βαθμονόμηση HPLC για τον προσδιορισμό του μέσου βαθμού πολυμερισμού (mDP)

Χρόνος (min)	Διαλύτης A (HPLC-A) (1% οξικό οξύ σε dH ₂ O)	Διαλύτης B (HPLC-D) MeOH
0	95	5
25	95	5
45	80	20
70	60	40
71	0	100
80	0	100
82	95	5
85	95	5

- Ροή: 1ml/min
- Ανίχνευση: UV – 280nm
- Όγκος έγχυσης: 100μl στα δείγματα model wine και 80μl στα δείγματα οίνου

- Πρότυπη καμπύλη αναφοράς

Για κάθε φαινολική ένωση από τις ακόλουθες: κατεχίνη (C), επικατεχίνη (EC), επιγαλλοκατεχίνη (EGC) και γαλλικός εστέρας της επικατεχίνης (ECG) δημιουργούμε πρότυπα διαλύματα που εγχύονται στην HPLC για να προσδιορίσουμε τον χρόνο έκλυσης των «τερματικών» μονάδων, δηλαδή, των μονομερών φλαβαν-3-ολών. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό εφαρμόζουμε πρότυπη καμπύλη επικατεχίνης που προκύπτει από τα εμβαδά των

κορυφών διαδοχικών συγκεντρώσεων πρότυπων διαλυμάτων επικατεχίνης (0-250mg/l). Για τις υπόλοιπες μονομοριακές φλαβαν-3-όλες αλλά και για τα προϊόντα διάσπασης της αντίδρασης με φλορογλουκινόλη (-P) χρησιμοποιούμε τη σχετική γραμμομοριακή απόκριση (relative molar response) σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα που βρίσκουμε στην δημοσίευση των Kennedy and Jones (2001):

Πίνακας 13. Σχετική γραμμομοριακή απόκριση (relative molar response) ανά μονομοριακή φλαβαν-3-όλη αλλά και για τα προϊόντα διάσπασης της αντίδρασης με φλορογλουκινόλη (-P)

Compound	Relative molar response (Relative to catechin)
epigallocatechin-p (EGC-P)	0,34
epicatechin-p (EC-P)	1,06
catechin-p (C-P)	1,06
epicatechin gallate-p (ECG-P)	3,70
Epicatechin (EC)	1,00
catechin (C)	1,00
epicatechin gallate (ECG)	3,16

Η σειρά εμφάνισης των ενώσεων στο χρωματογράφημα είναι EGC-P, EC-P, C-P, C, ECG-P, EC και ECG.

Υπολογισμοί

Αφού διαιρέσουμε τα relative molar response με το εμβαδό της αντίστοιχης κορυφής για τον υπολογισμό του μέσου βαθμού πολυμερισμού (mDP) διαιρούμε το άθροισμα όλων των υπομονάδων (μονομερή-τερματικά και προϊόντα διάσπασης με φλορογλουκινόλη, σε moles) με το άθροισμα όλων των μονομερών-τερματικών (σε moles).

14.Οργανοληπτικός έλεγχος

Ο οργανοληπτικός έλεγχος πραγματοποιήθηκε στα δείγματα του οίνου στο εργαστήριο οινολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών από εκπαιδευμένους δοκιμαστές. Στο πάνελ συμμετείχαν 9 δοκιμαστές και ο κάθε δοκιμαστής έπρεπε να αξιολογήσει τα δείγματα ως προς

την ένταση και απόχρωση του χρώματος, την πικρή γεύση και την στυπτικότητα. Το κάθε δείγμα αντιστοιχούσε σε ένα τριψήφιο αριθμό. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν με δοσομετρητή των 30ml σε γυάλινα ποτήρια σε σχήμα τουλίπας, κατάλληλα για οργανοληπτικό έλεγχο. Η αξιολόγηση των δειγμάτων έγινε με χρήση κλίμακας από το 1 έως το 10.

15.Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων

Η κάθε μέθοδος πραγματοποιήθηκε σε δύο επαναλήψεις. Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα JMP Statistical Discovery (JMP Inc.). Η σημαντικότητα των αποτελεσμάτων ελέγχθηκε με την ανάλυση διασποράς με έναν παράγοντα (One Way ANOVA), ενώ οι συγκρίσεις πραγματοποιήθηκαν μέσω του Tukey HSD test (Honesty Significant Difference). Για την κατασκευή και επεξεργασία των γραφημάτων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Microsoft Office Excel.

Μέρος III: Αποτελέσματα και συζήτηση

Κεφάλαιο 1: Αποτελέσματα

1. Βάρος ραγών – νωπό και ξηρό βάρος φλοιών και γιγάρτων

Η μέτρηση του βάρους των 100 ραγών καθώς και του νωπού και ξηρού βάρους των φλοιών και γιγάρτων πραγματοποιήθηκε σε τρία δείγματα 100 ραγών και ο μέσος όρος των μετρήσεων παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 14. Μέσος όρος βάρους ραγών – νωπού και ξηρού βάρους φλοιών και γιγάρτων

	Μέσος Όρος (M.O.) (g)
Βάρος 100 ραγών	401,7 ± 20,82
Νωπό βάρος φλοιών	77,7 ± 2,08
Νωπό βάρος γιγάρτων	14,7 ± 2,52
Ξηρό βάρος φλοιών	14,2 ± 0,51
Ξηρό βάρος γιγάρτων	6,9 ± 0,74

Ο μέσος όρος που προέκυψε από τις μετρήσεις για το βάρος των 100 ραγών είναι 401,7g. Για το νωπό βάρος των φλοιών είναι 77,7g, ενώ των γιγάρτων 14,7g. Μετά την λυοφιλίωση ο μέσος όρος του ξηρού βάρους των φλοιών είναι 14,2g και των γιγάρτων 6,9g.

2. Εκχύλιση φαινολικών συστατικών των φλοιών και γιγάρτων

Η εκχύλιση των φαινολικών συστατικών των φλοιών και γιγάρτων πραγματοποιήθηκε σε τρία δείγματα 3g σκόνης φλοιών και γιγάρτων αντίστοιχα και ο μέσος όρος των μετρήσεων παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 15. Μέσος όρος βάρους φαινολικών συστατικών φλοιών και γιγάρτων

	Μέσος όρος (M.O.) (mg)
Βάρος φλοιών	1581,4 ± 45,3
Βάρος γιγάρτων	375,7 ± 21,41

Ο μέσος όρος που προέκυψε από τις μετρήσεις για το βάρος των φλοιών είναι 1581,4mg φαινολικών συστατικών σε 3g σκόνης φλοιών και 375,7mg φαινολικών συστατικών σε 3g σκόνης γιγάρτων αντίστοιχα. Επομένως, σε 1g σκόνης φλοιών περιέχονται 0,527g φαινολικών συστατικών και σε 1g σκόνης γιγάρτων 0,125g αντίστοιχα. Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα υπολογίστηκε, όπως περιγράφεται στο προηγούμενο μέρος της εργασίας, η ποσότητα προσθήκης σκόνης φλοιών και γιγάρτων για κάθε αναλογία στο διάλυμα προσομοίωσης οίνου (model wine).

3. Κινητική εκχύλισης

Όπως αναφέρθηκε και στο προηγούμενο μέρος της εργασίας για την παρατήρηση της κινητικής εκχύλισης της προσθήκης φλοιών και γιγάρτων σε διαφορετικές αναλογίες στα δείγματα του model wine εφαρμόστηκαν οι φωτομετρικές αναλύσεις της έντασης χρώματος, του Δείκτη Φαινολικών Ουσιών (ΔΦΟ) και ο προσδιορισμός ταννινών με την μέθοδο της Methyl Cellulose Precipitable (MCP). Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στις 24, 48 και 72 ώρες εκχύλισης αντίστοιχα.

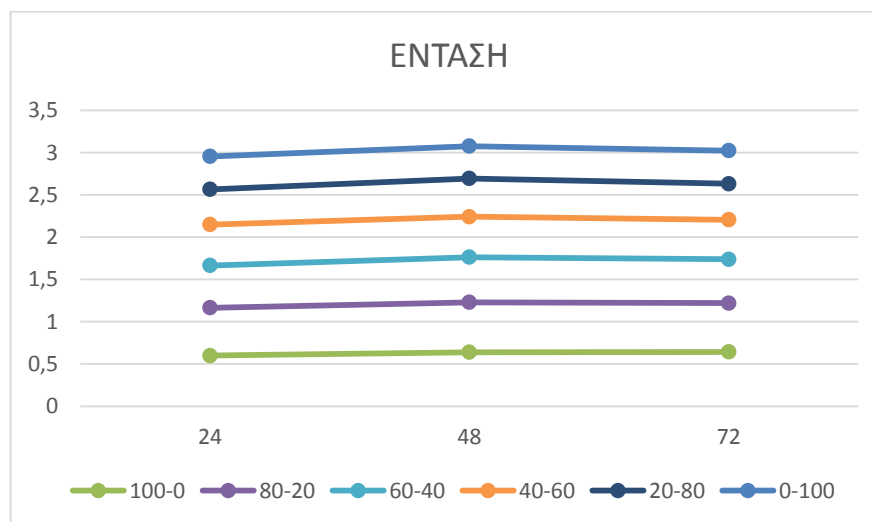
Για την διευκόλυνση της κατανόησης των γραφημάτων η παρακάτω κωδικοποίηση των δειγμάτων ισχύει για όλα τα αποτελέσματα που θα ακολουθήσουν:

Πίνακας 16. Κωδικοποίηση δειγμάτων

Κωδικός δείγματος	Δείγμα
--------------------------	---------------

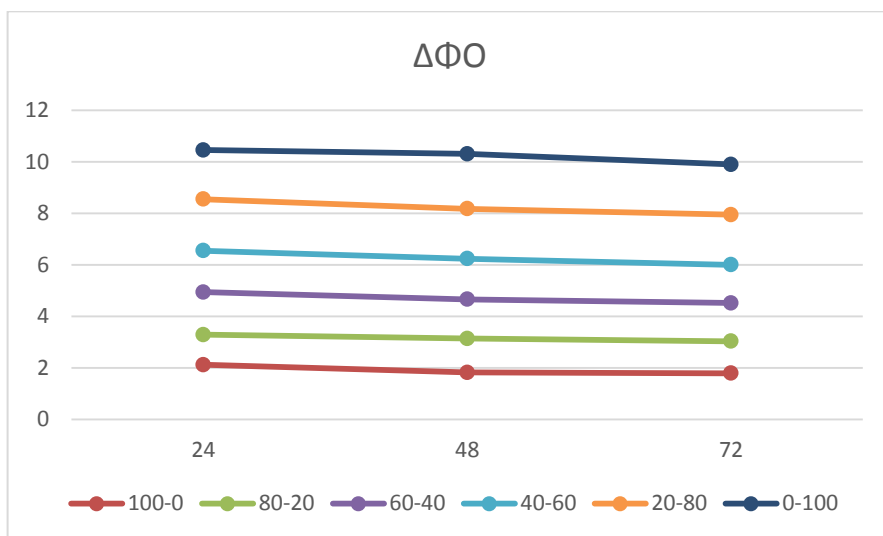
0	Οίνος βάσης (μάρτυρας)
100-0	100% φλοιοί – 0% γίγαρτα
80-20	80% φλοιοί – 20% γίγαρτα
60-40	60% φλοιοί – 40% γίγαρτα
40-60	40% φλοιοί – 60% γίγαρτα
20-80	20% φλοιοί – 80% γίγαρτα
0-100	0% φλοιοί – 100% γίγαρτα

* Τα τονισμένα δείγματα (π.χ. **100-0**) αναφέρονται στις βιολογικές επαναλήψεις.



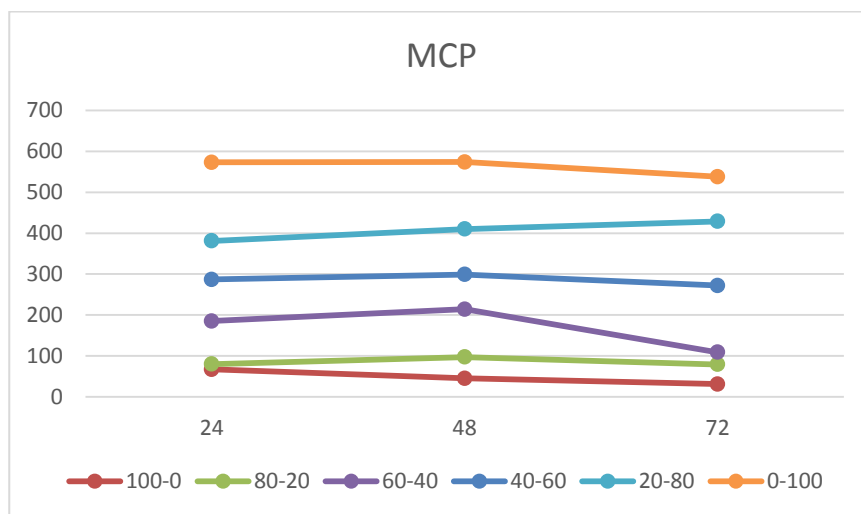
Γράφημα 5. Μεταβολή έντασης χρώματος με τον χρόνο εκχύλισης

Από το παραπάνω γράφημα παρατηρούμε για την ένταση του χρώματος αύξηση σε όλες τις αναλογίες από τις 24 έως τις 48 ώρες. Από τις 48 ώρες και μετά παρατηρούμε μια γενικότερη σταθεροποίηση της έντασης με τάση μείωσης κυρίως στα δείγματα 20-80 και 0-100 που είναι και τα δείγματα με τις μικρότερες συγκεντρώσεις φλοιών και κατ' επέκταση ανθοκυανών. Επομένως μετά τις 48 ώρες δεν παρατηρείται κάποια συνεισφορά στην εκχύλιση ουσιών που σχετίζονται με την ένταση του χρώματος.



Γράφημα 6. Μεταβολή δείκτη φαινολικών ουσιών με τον χρόνο εκχύλισης

Στο γράφημα του δείκτη φαινολικών ουσιών παρατηρούμε από τις 24 ώρες μείωση των ουσιών που εκχυλίζονται σε όλες τις αναλογίες, η οποία μείωση συνεχίζεται και μετά τις 48 ώρες.



Γράφημα 7. Μεταβολή των ταννινών που προσδιορίστηκαν με την μέθοδο της MCP με τον χρόνο εκχύλισης

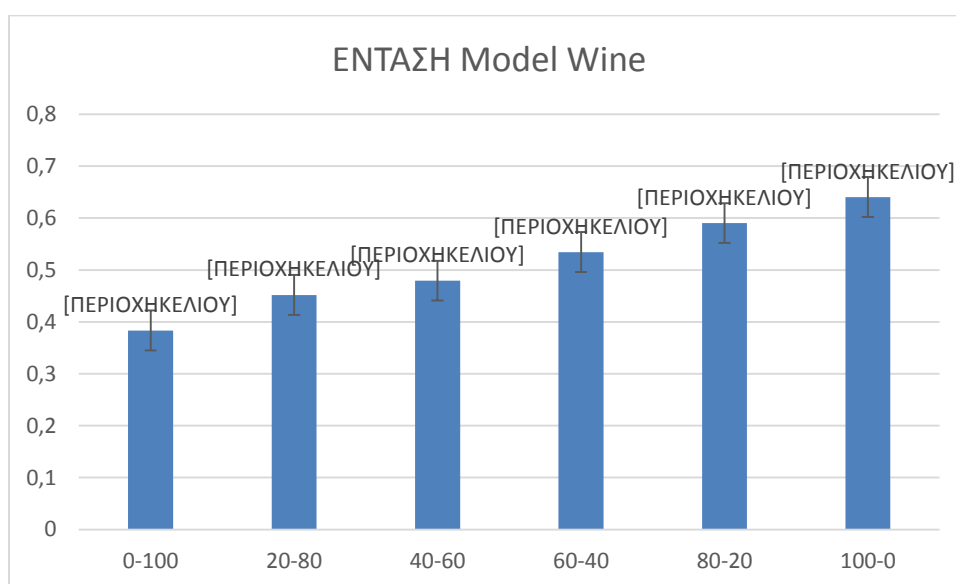
Τέλος, στο γράφημα του προσδιορισμού των ταννινών με την μέθοδο της MCP παρατηρούμε έως τις 48 ώρες σε όλες τις αναλογίες, πλην του δείγματος 100-0, αύξηση της εκχύλισης ταννινών. Στο δείγμα 100-0 η μείωση που παρατηρούμε είναι αναμενόμενη καθώς απουσιάζουν τα γίγαρτα, τα οποία ευθύνονται περισσότερο για την εκχύλιση των ταννινών.

Μετά τις 48 ώρες παρατηρείται μείωση της εκχύλισης των ταννινών, εκτός από το δείγμα 20-80 που η αύξηση συνεχίζεται και μετά έως τις 72 ώρες.

Με βάση την ανάλυση των παραπάνω αποτελεσμάτων συμπεραίνουμε ότι ο ιδανικός χρόνος εκχύλισης είναι στις 48 ώρες. Ο ίδιος χρόνος εκχύλισης εφαρμόστηκε και στα δείγματα οίνου.

4. Ένταση χρώματος

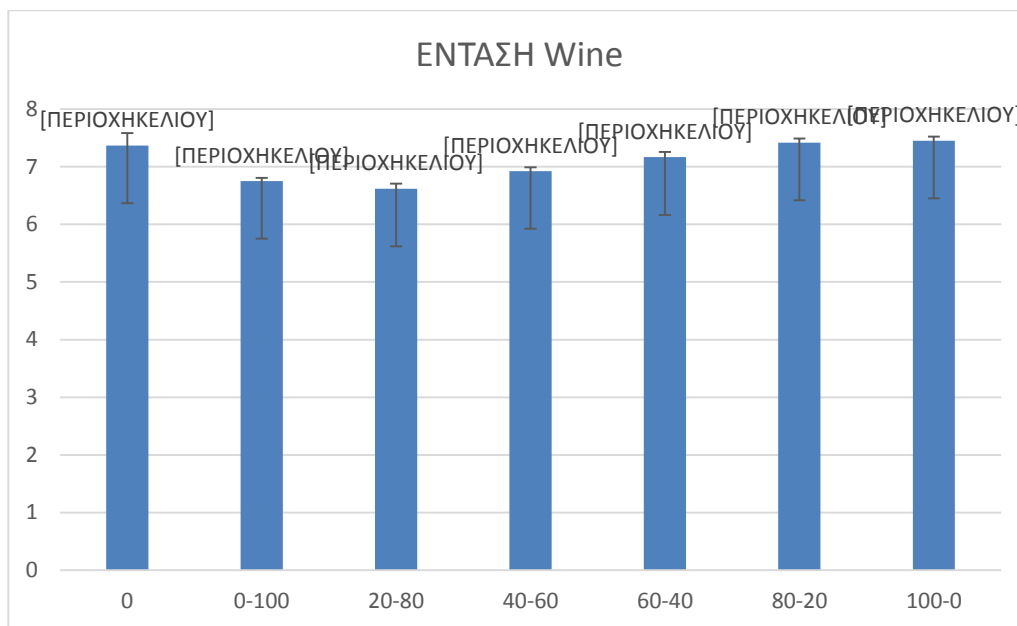
4.1 Αποτελέσματα model wine



Γράφημα 8. Ένταση χρώματος στα δείγματα του model wine. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$)

Από το παραπάνω γράφημα παρατηρούμε για την ένταση του χρώματος στα δείγματα του model wine αύξηση των τιμών ξεκινώντας από την αναλογία 100% γιγάρτων (δείγμα 0-100) και καταλήγοντας στην αναλογία 100% φλοιών (δείγμα 100-0), που έχει και την μεγαλύτερη ένταση χρώματος. Δεδομένου ότι οι ανθοκυάνες εντοπίζονται κατά βάση στους φλοιούς, η σταδιακή αύξηση της έντασης του χρώματος, όσο αυξάνεται η αναλογία των φλοιών, είναι αναμενόμενη. Σημαντικά στατιστικές διαφορές δεν παρατηρούνται στις αναλογίες που διαφέρουν κατά 20% και ανάμεσα στα δείγματα 20-80, 40-60 και 60-40.

4.2 Αποτελέσματα οίνου

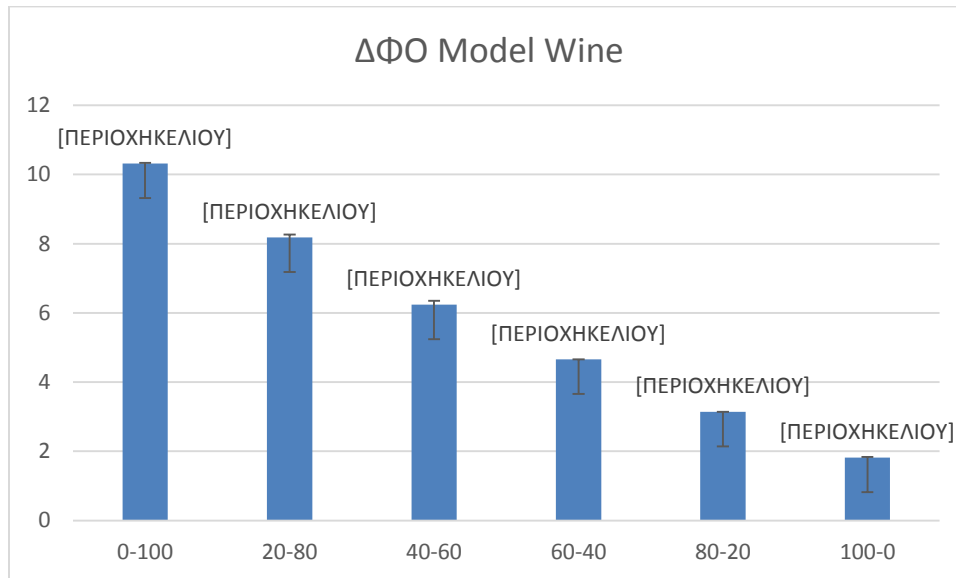


Γράφημα 9. Ένταση χρώματος στα δείγματα του οίνου. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$)

Όπως και στα δείγματα του model wine έτσι και στα δείγματα του οίνου παρατηρούμε μια σταδιακή αύξηση της έντασης του χρώματος όσο αυξάνονται οι αναλογίες των φλοιών. Εξαίρεση αποτελεί το δείγμα 20-80 που δεν ακολουθεί την σταδιακή αύξηση καθώς η τιμή του είναι μειωμένη σε σχέση με την αναλογία 100% γιγάρτων. Τα δείγματα 0-100, 20-80 και 40-60 διαφέρουν στατιστικά με τον μάρτυρα (δείγμα 0), σε σχέση με τα δείγματα 60-40, 80-20 και 100-0 που δεν έχουν σημαντικές στατιστικές διαφορές με το μάρτυρα.

5. Δείκτης Φαινολικών Ουσιών (ΔΦΟ)

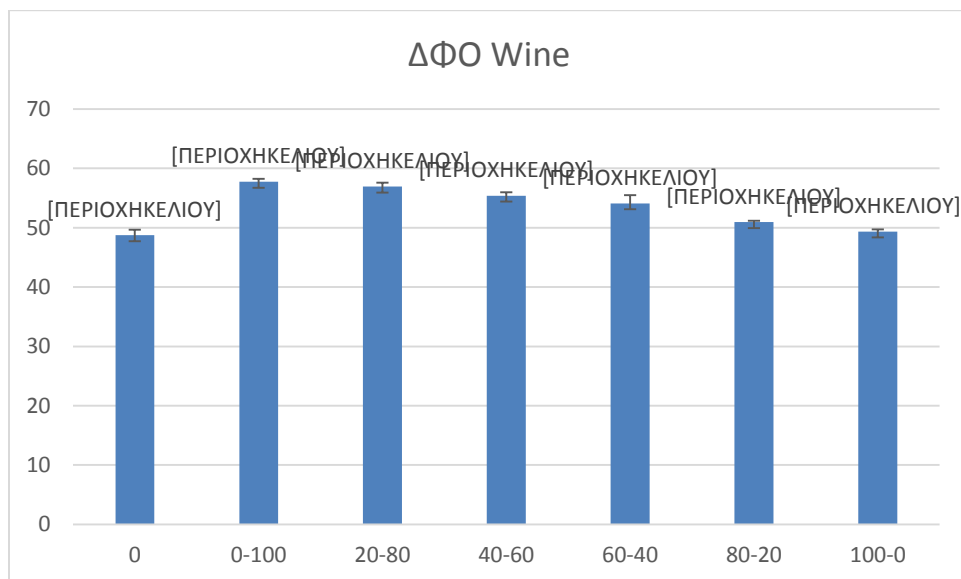
5.1 Αποτελέσματα model wine



Γράφημα 10. Δείκτης φαινολικών ουσιών στα δείγματα του model wine. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$)

Με βάση το παραπάνω γράφημα παρατηρούμε σταδιακή μείωση των τιμών του δείκτη φαινολικών συστατικών στα δείγματα του model wine ξεκινώντας με την μεγαλύτερη τιμή του ΔΦΟ στην αναλογία 100% γιγάρτων. Όπως αναφέρθηκε και στο πρώτο μέρος της εργασίας τα γίγαρτα φαίνεται να έχουν το μεγαλύτερο ποσοστό (62%) σε φαινολικά συστατικά (σε κόκκινο σταφύλι) (Krihika, *et al.*, 2015) επομένως η σταδιακή μείωση του ΔΦΟ, όσο μειώνεται η αναλογία των γιγάρτων, είναι αναμενόμενη. Όλα τα δείγματα του model wine διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους.

5.2 Αποτελέσματα οίνου

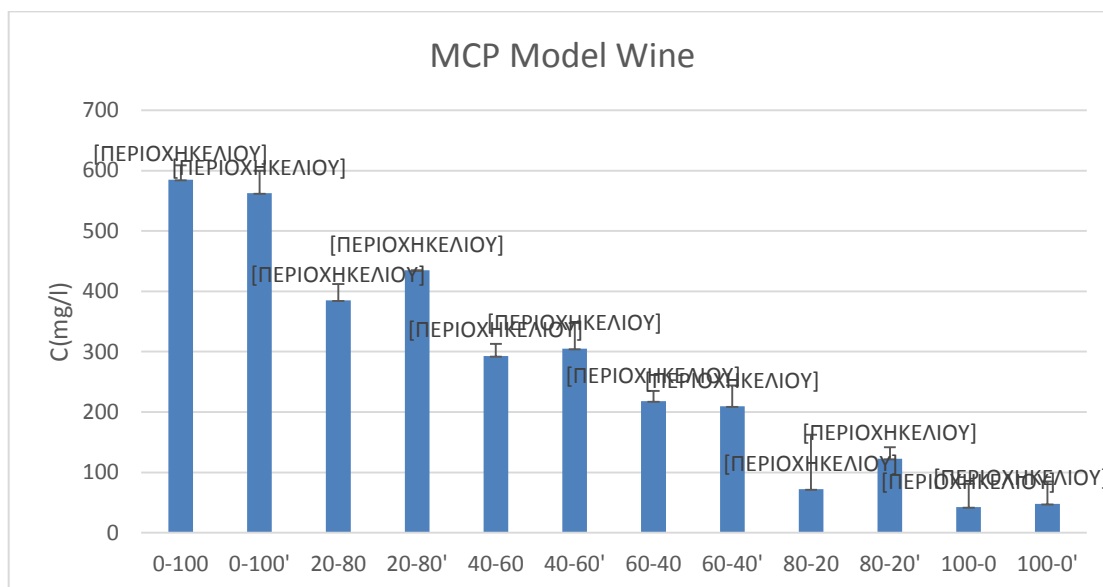


Γράφημα 11. Δείκτης φαινολικών ουσιών στα δείγματα του οίνου. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$)

Παρομοίως με τα δείγματα του model wine έτσι και στα δείγματα του οίνου παρατηρούμε μια σταδιακή μείωση του ΔΦΟ όσο μειώνονται οι αναλογίες των γιγάρτων. Τα δείγματα 0-100, 20-80, 40-60 και 60-40 διαφέρουν στατιστικά σε σχέση με τον μάρτυρα (δείγμα 0), ενώ τα δείγματα 80-20 και 100-0 δεν έχουν σημαντικά στατιστικές διαφορές με το μάρτυρα.

6. Προσδιορισμός ταννινών – Methyl Cellulose Precipitable (MCP)

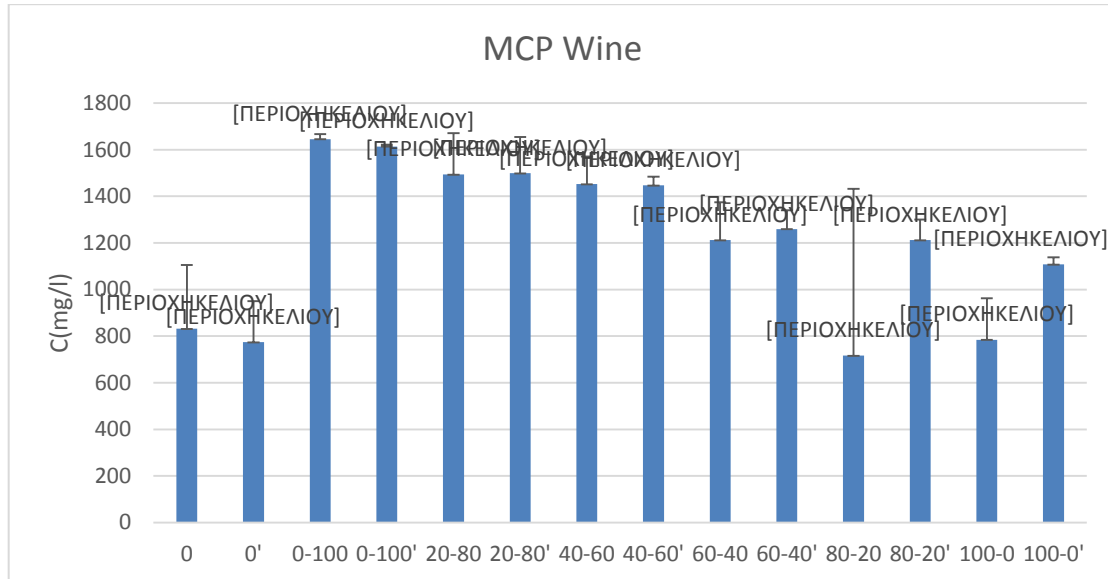
6.1 Αποτελέσματα model wine



Γράφημα 12. MCP στα δείγματα του model wine. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$)

Από το παραπάνω γράφημα παρατηρούμε σταδιακή μείωση των ταννινών που προσδιορίστηκαν με την μέθοδο MCP στα δείγματα του model wine ξεκινώντας με την μεγαλύτερη τιμή στην αναλογία 100% γιγάρτων. Δεδομένου ότι τα γιγάρτα είναι πιο πλούσια σε ταννίνες η σταδιακή μείωση των ταννινών, όσο μειώνεται η αναλογία των γιγάρτων, είναι αναμενόμενη. Τα περισσότερα δείγματα του model wine διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους. Ωστόσο παρατηρούμε ότι τα δείγματα που διαφέρουν σε αναλογία 20% δεν έχουν σημαντικές στατιστικές διαφορές, εκτός από τη επανάληψη του δείγματος 20-80 (20-80') σε σχέση με το δείγμα 0-100 και την επανάληψη του.

6.2 Αποτελέσματα οίνου

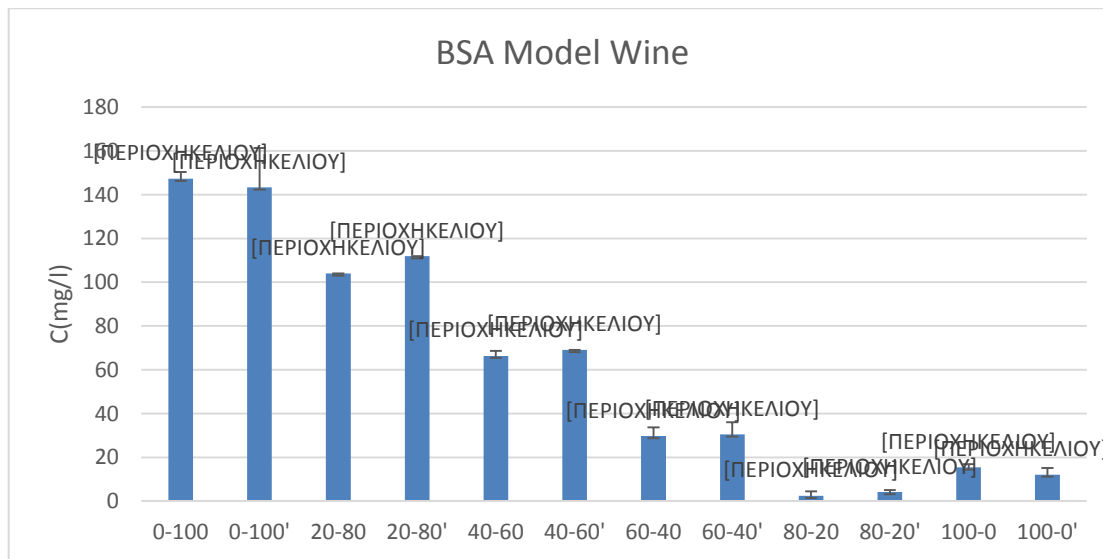


Γράφημα 13. MCP στα δείγματα του οίνου. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$)

Όπως και στα δείγματα του model wine έτσι και στα δείγματα του οίνου παρατηρούμε σταδιακή μείωση των ταννινών που προσδιορίστηκαν με την μέθοδο MCP ξεκινώντας με την μεγαλύτερη τιμή στην αναλογία 100% γιγάρτων. Παρατηρούμε επίσης ότι τα δείγματα δεν έχουν σημαντικές στατιστικές διαφορές, τόσο μεταξύ τους όσο και με το μάρτυρα.

7. Προσδιορισμός ταννινών με την μέθοδο BSA (δέσμευση από πρωτεΐνες – δείκτης στυπτικότητας)

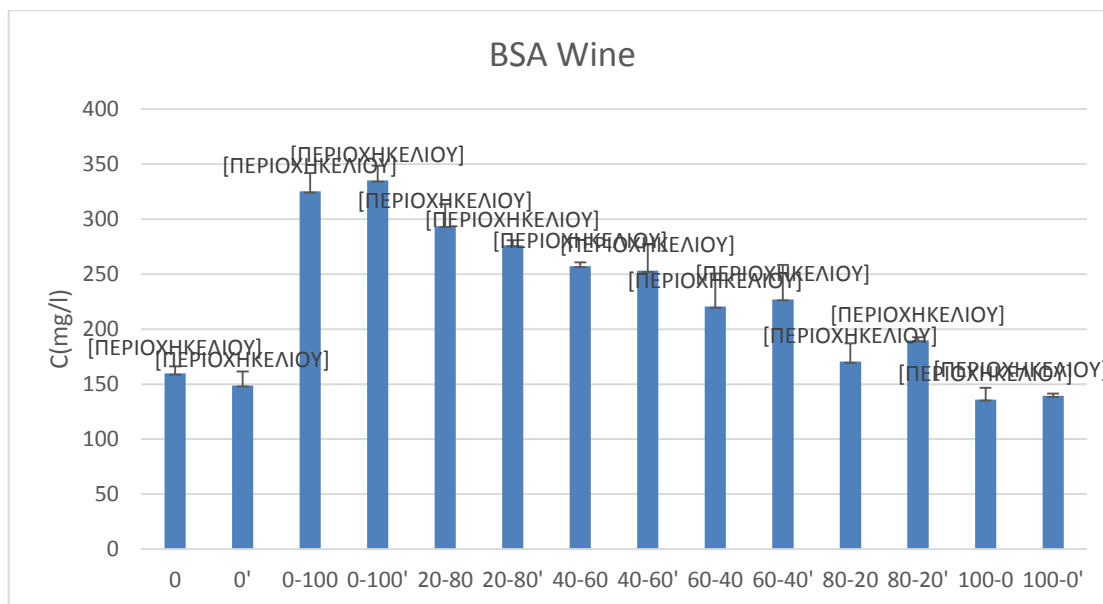
7.1 Αποτελέσματα model wine



Γράφημα 14. BSA στα δείγματα του model wine. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$)

Όπως και στην MCP έτσι και σε αυτή τη μέθοδο παρατηρούμε στο παραπάνω γράφημα ότι σημειώνεται σταδιακή μείωση των ταννινών που προσδιορίστηκαν με την μέθοδο BSA στα δείγματα του model wine ξεκινώντας με την μεγαλύτερη τιμή στην αναλογία 100% γιγάρτων. Εξάιρεση αποτελεί το δείγμα 80-20 και η επανάληψη του (80-20') που δεν ακολουθούν την σταδιακή μείωση, αλλά παρουσιάζουν μικρότερες τιμές σε σχέση με το δείγμα 100-0 και την επανάληψη του. Δεδομένου ότι τα γιγάρτα είναι πιο πλούσια σε ταννίνες η σταδιακή μείωση των ταννινών, όσο μειώνεται η αναλογία των γιγάρτων, είναι αναμενόμενη. Τα περισσότερα δείγματα του model wine διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους.

7.2 Αποτελέσματα οίνου

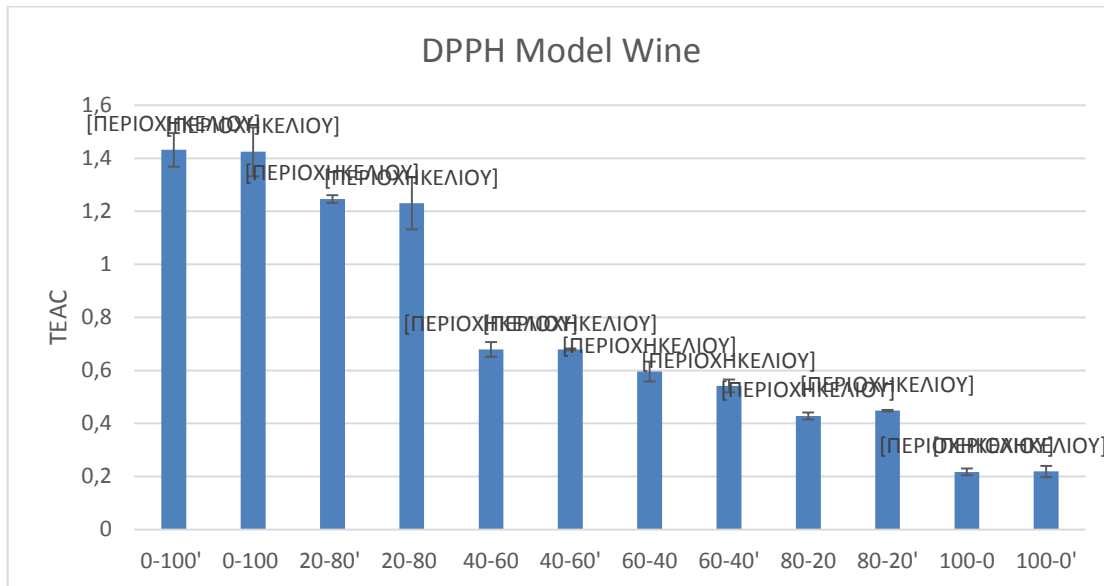


Γράφημα 15. BSA στα δείγματα του οίνου. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$)

Και στα δείγματα του οίνου παρατηρούμε σταδιακή μείωση των ταννινών που προσδιορίστηκαν με την μέθοδο BSA ξεκινώντας με την μεγαλύτερη τιμή στην αναλογία 100% γιγάρτων. Τα δείγματα 80-20, 100-0 και οι επαναλήψεις τους δεν έχουν σημαντικές στατιστικές διαφορές, τόσο μεταξύ τους όσο και με το μάρτυρα (δείγμα 0). Τα υπόλοιπα δείγματα παρουσιάζουν σημαντικές στατιστικές διαφορές με τον μάρτυρα, ωστόσο όσα διαφέρουν σε αναλογία 20% δεν παρουσιάζουν στατιστικές διαφορές.

8. Αντιοξειδωτική ικανότητα με τη μέθοδο DPPH

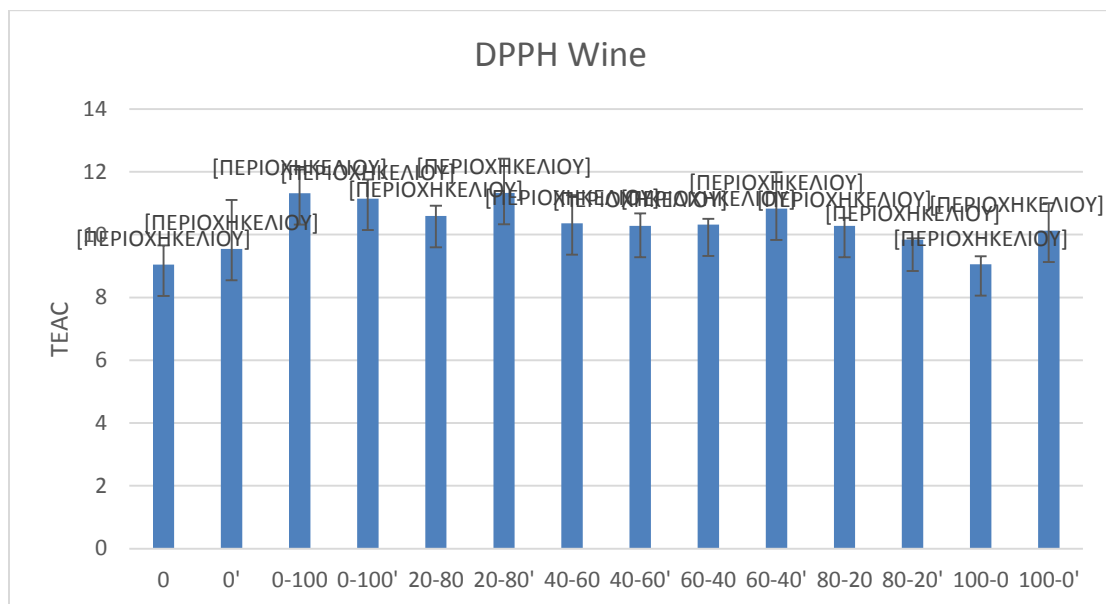
8.1 Αποτελέσματα model wine



Γράφημα 16. DPPH στα δείγματα του model wine. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$)

Στο παραπάνω γράφημα παρατηρούμε ότι η μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα εντοπίζεται στο δείγμα που περιέχει αναλογία 100% γιγάρτων και έπειτα ακολουθεί σταδιακή μείωση έως την αναλογία 100% φλοιών. Επιπλέον, παρατηρούμε ότι ανάμεσα στα περισσότερα δείγματα παρατηρούνται σημαντικές στατιστικές διαφορές.

8.2 Αποτελέσματα οίνου

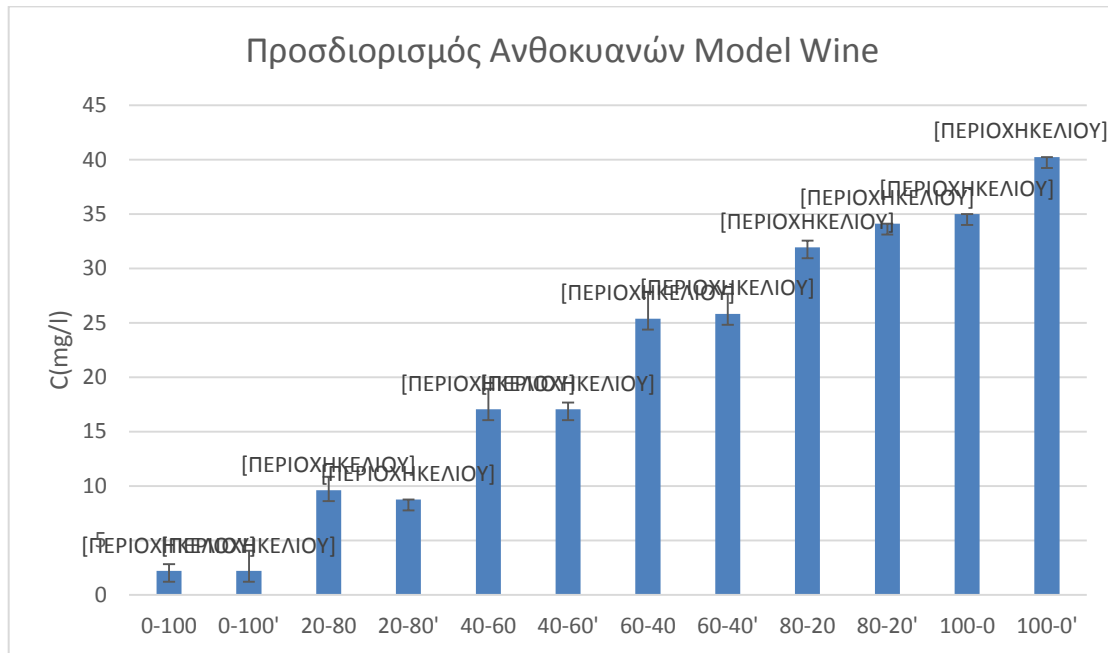


Γράφημα 17. DPPH στα δείγματα του οίνου. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$)

Στα δείγματα του οίνου παρατηρούμε διακύμανση στις τιμές της αντιοξειδωτικής ικανότητας, σε σχέση με την σταδιακή μείωση που παρατηρήθηκε στα δείγματα του model wine. Ωστόσο οι μεγαλύτερες τιμές αντιοξειδωτικής ικανότητας καταγράφονται και στην περίπτωση του οίνου στο δείγμα με αναλογία 100% γιγάρτων, χωρίς όμως να υπάρχουν σημαντικές στατιστικές διαφορές με τα υπόλοιπα δείγματα και τον μάρτυρα (δείγμα 0).

9. Προσδιορισμός ανθοκυανών (φωτομετρικά)

9.1 Αποτελέσματα model wine



Γράφημα 18. Συγκέντρωση ανθοκυανών στα δείγματα του model wine. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$)

Από τη φωτομετρική ανάλυση των ανθοκυανών παρατηρούμε με βάση το παραπάνω γράφημα ότι στα δείγματα του model wine υπάρχει σταδιακή αύξηση των τιμών των ανθοκυανών με την μεγαλύτερη συγκέντρωση να παρατηρείται στην αναλογία 100% φλοιών (δείγμα 100-0). Δεδομένου ότι οι ανθοκυανές εντοπίζονται κατά βάση στους φλοιούς, η σταδιακή αύξηση που παρατηρείται όσο αυξάνεται η αναλογία των φλοιών στα δείγματα του model wine είναι αναμενόμενη. Τα δείγματα έχουν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ τους, με εξαίρεση την επανάληψη του δείγματος 0-100, η οποία δεν διαφέρει στατιστικά με το δείγμα 20-80 και την επανάληψη του.

9.2 Αποτελέσματα οίνου



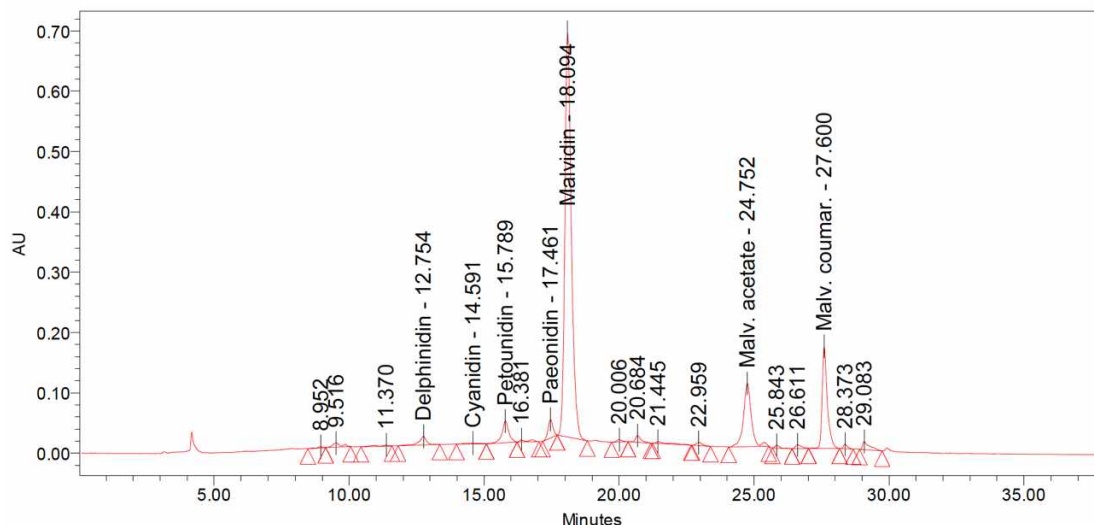
Γράφημα 19. Συγκέντρωση ανθοκυανών στα δείγματα του οίνου. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$)

Στη φωτομετρική ανάλυση των ανθοκυανών στα δείγματα του οίνου παρατηρούμε και σε αυτή την περίπτωση σταδιακή αύξηση των ανθοκυανών, με την μέγιστη τιμή να παρατηρείται στο δείγμα με την αναλογία 100% φλοιών, χωρίς ωστόσο να είναι τόσο έντονη όσο στα δείγματα του model wine. Τα περισσότερα δείγματα διαφέρουν σημαντικά σε σχέση με το μάρτυρα (δείγμα 0), εκτός από τα δείγματα 0-100, 20-80 και τις επαναλήψεις τους που δεν έχουν σημαντικές στατιστικές διαφορές με το μάρτυρα.

10. Προσδιορισμός ανθοκυανών με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC)

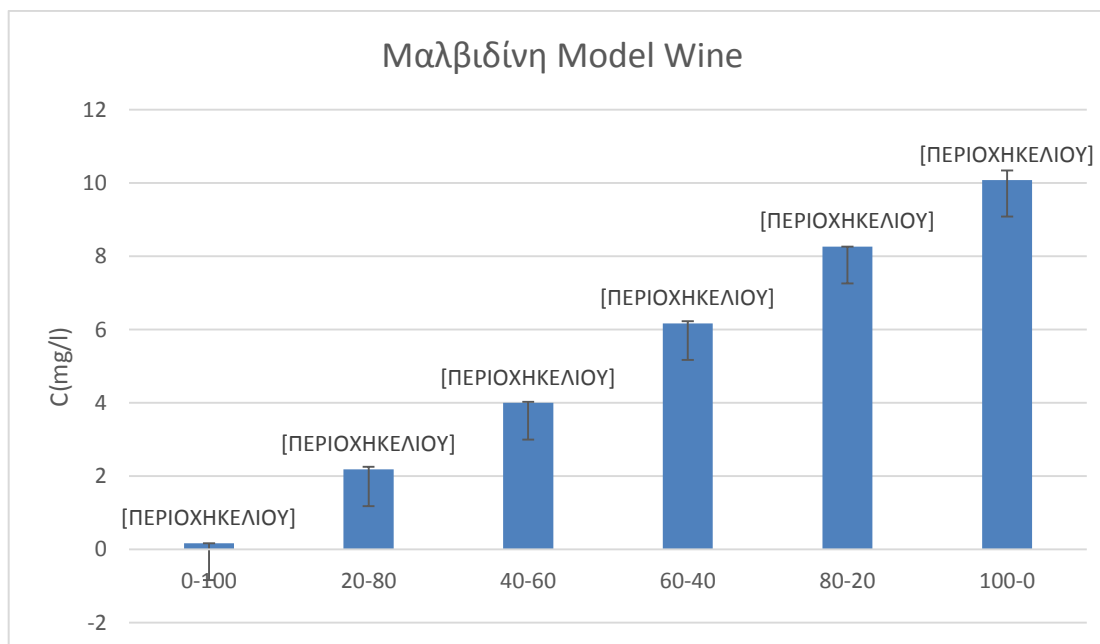
Χρωματογράφημα ανθοκυανών με HPLC

Ο προσδιορισμός των επιμέρους ανθοκυανών γίνεται μέσω του χρωματογραφήματος (εικόνα 8) έπειτα από μέτρηση της απορρόφησης του κάθε δείγματος στα 520 nm.



Εικόνα 8. Χρωματογράφημα του δείγματος οίνου 100-0, όπου παρουσιάζονται αναλυτικά οι κορυφές των επιμέρους ανθοκυανών καθώς επίσης ο οξικός εστέρας της μαλβιδίνης (Malv. Ac) και ο κουμαρικός εστέρας της μαλβιδίνης (Malv. Coum)

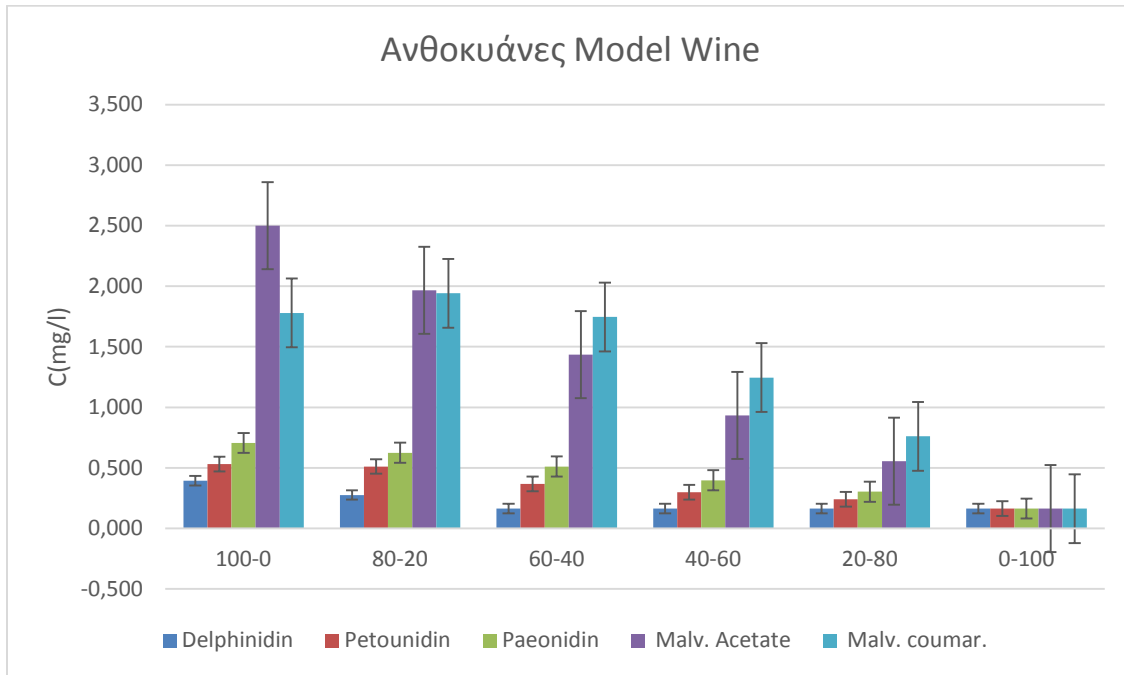
10.1 Αποτελέσματα model wine



Γράφημα 20. Συγκέντρωση μαλβιδίνης στα δείγματα του model wine. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukaey's test, $p < 0.05$)

Όπως αναφέρθηκε και στο πρώτο μέρος της εργασίας η μαλβιδίνη αποτελεί την επικρατέστερη, και σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, δομή ανθοκυανών σε όλους τους οίνους (Ribéreau-Gayon, et al., 2006). Με βάση το παραπάνω γράφημα παρατηρούμε ότι στα δείγματα του model wine υπάρχει σταδιακή αύξηση των τιμών της μαλβιδίνης με την μεγαλύτερη

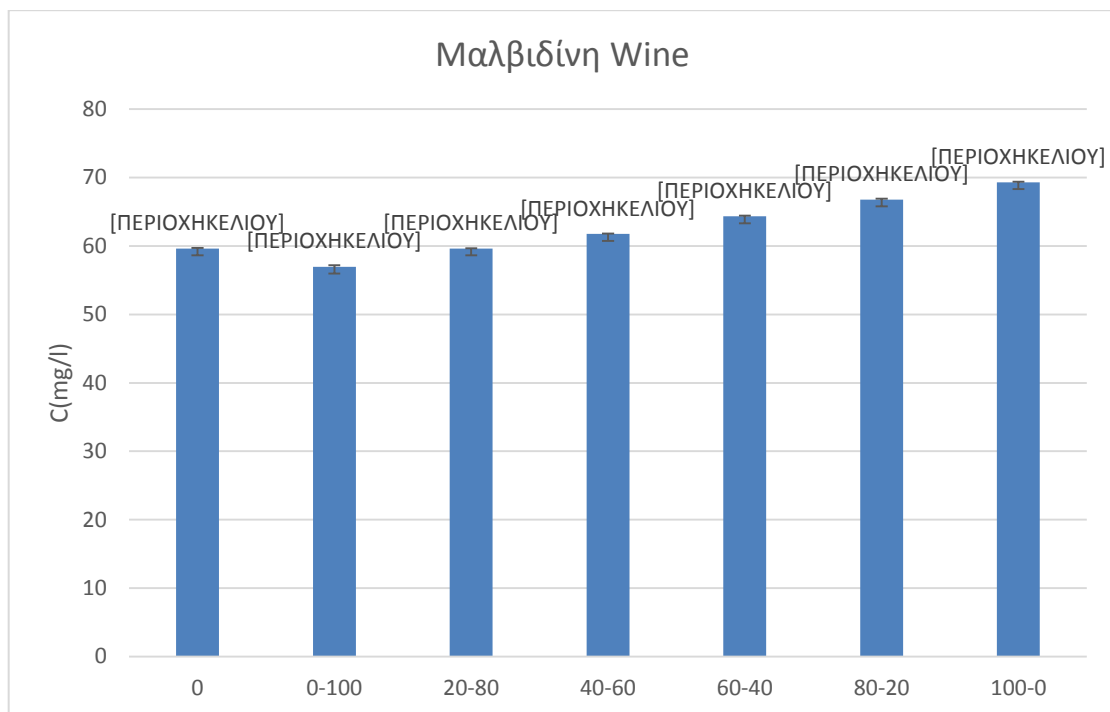
συγκέντρωση να παρατηρείται στην αναλογία 100% φλοιών (δείγμα 100-0). Δεδομένου ότι οι ανθοκυάνες εντοπίζονται κατά βάση στους φλοιούς, η σταδιακή αύξηση που παρατηρείται όσο αυξάνεται η αναλογία των φλοιών στα δείγματα του model wine είναι αναμενόμενη. Τα δείγματα έχουν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ τους.



Γράφημα 21. Συγκέντρωση των επιμέρους ανθοκυανών στα δείγματα του model wine. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$)

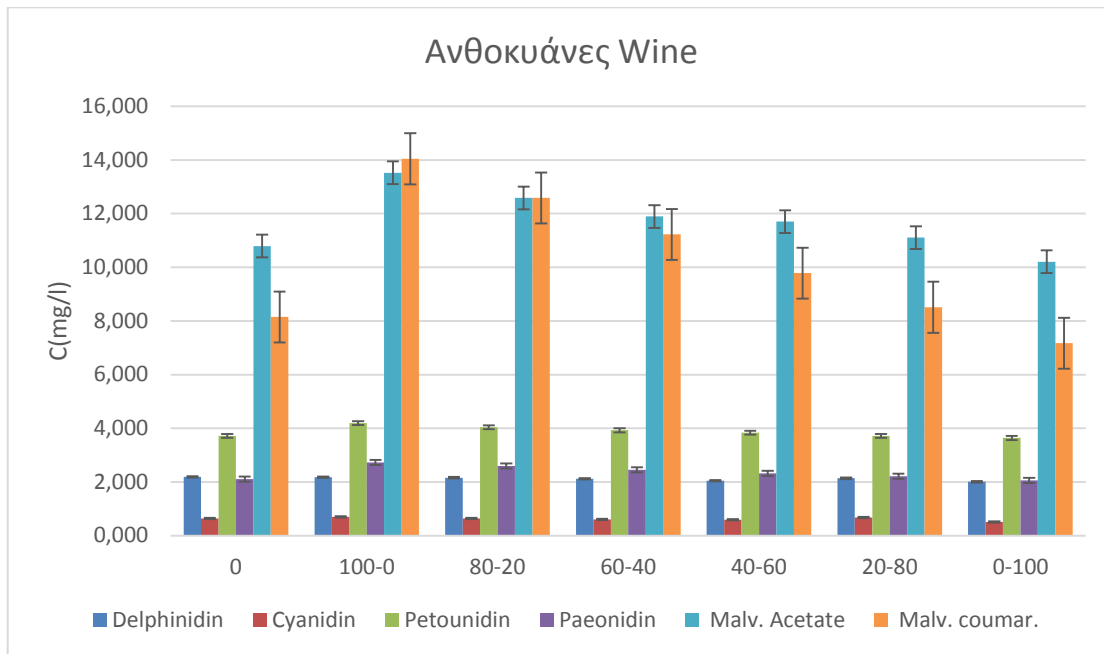
Όπως και στον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της μαλβιδίνης έτσι και στις επιμέρους ανθοκυάνες οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις παρατηρούνται στο δείγμα 100-0 με αναλογία 100% φλοιών. Ακολουθεί σταδιακή μείωση των συγκεντρώσεων των ανθοκυανών μέχρι την αναλογία 100% γιγάρτων, όπου οι συγκεντρώσεις των επιμέρους ανθοκυανών είναι σχεδόν μηδενικές. Εξάιρεση αποτελεί η δελφινιδίνη, η οποία δεν ακολουθεί την σταδιακή μείωση καθώς στο δείγμα 80-20 έχει μεγαλύτερη τιμή σε σχέση με το δείγμα 100-0.

10.2 Αποτελέσματα οίνου



Γράφημα 22. Συγκέντρωση μαλβιδίνης στα δείγματα του οίνου. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$)

Στον προσδιορισμό της μαλβιδίνης στα δείγματα του οίνου παρατηρούμε και σε αυτή την περίπτωση μια σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης της μαλβιδίνης, με την μέγιστη τιμή να παρατηρείται στο δείγμα με την αναλογία 100% φλοιών, χωρίς ωστόσο να είναι τόσο έντονη όσο στα δείγματα του model wine. Τα δείγματα διαφέρουν σημαντικά στατιστικά τόσο μεταξύ τους όσο και σε σχέση με το μάρτυρα (δείγμα 0), εκτός από το δείγμα 20-80 που δεν έχει σημαντικές στατιστικές διαφορές με το μάρτυρα.

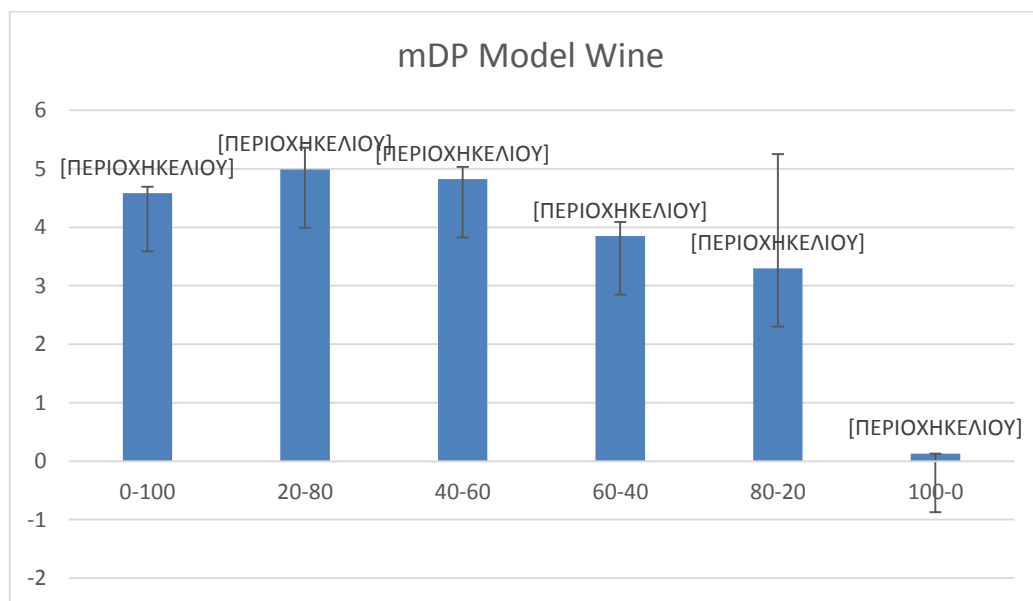


Γράφημα 23. Συγκέντρωση των επιμέρους ανθοκυανών στα δείγματα του οίνου. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$)

Παρομοίως με τον προσδιορισμό των επιμέρους ανθοκυανών στα δείγματα του model wine έτσι και στα δείγματα του οίνου παρατηρούμε την μέγιστη τιμή στο δείγμα με την αναλογία 100% φλοιών. Ακολουθεί και σε αυτήν την περίπτωση μείωση των επιμέρους ανθοκυανών, χωρίς ωστόσο να είναι τόσο έντονη όσο στα δείγματα του model wine. Οι επιμέρους ανθοκυάνες στο δείγμα 100-0 έχουν μεγαλύτερες τιμές σε σχέση με το μάρτυρα, ενώ αντίθετα το δείγμα 0-100 μικρότερες.

11. Προσδιορισμός μέσου βαθμού πολυμερισμού (mDP) ταννινών με HPLC

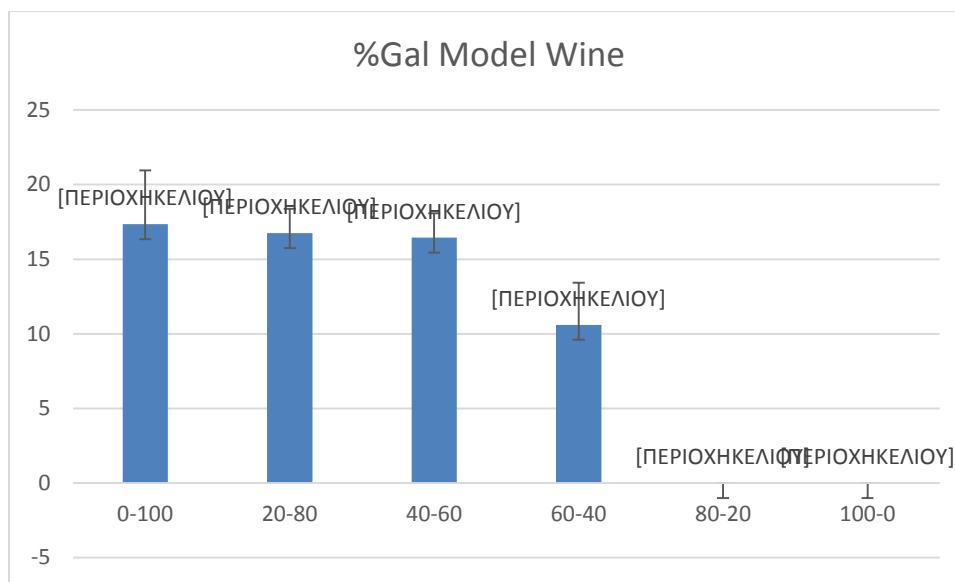
11.1 Αποτελέσματα model wine



Γράφημα 24. Μέσος βαθμός πολυμερισμού (mDP) στα δείγματα του model wine. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$)

Όσον αφορά τον μέσο βαθμό πολυμερισμού στα δείγματα του model wine με βάση το παραπάνω γράφημα παρατηρούμε ότι δεν ακολουθεί αύξηση ή μείωση στις τιμές αλλά διακύμανση των τιμών. Η μεγαλύτερη τιμή του μέσου βαθμού πολυμερισμού εντοπίζεται στο δείγμα 20-80, ενώ η μικρότερη τιμή με σημαντική διαφορά στο δείγμα που αποτελείται από 100% φλοιούς (δείγμα 100-0). Η διαφορά αυτή ενδεχομένως να οφείλεται στο γεγονός ότι σύμφωνα με τους Kennedy και Jones (2001) οι προανθοκυανιδίνες που προέρχονται από τους φλοιούς, χρειάζονται περισσότερο χρόνο για να φτάσουν το μέγιστο της απόδοσης της αντίδρασης με την φλωρογλουκινόνη (phloroglucinol). Ωστόσο δεν μπορούμε να αυξήσουμε τον χρόνο της αντίδρασης γιατί η χημική ένωση της επικατεχίνης δεν είναι σταθερή πέραν των 20 λεπτών που διαρκεί η αντίδραση της φλωρογλουκινόνης. Επομένως οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις συνδυαστικά με την πιο χαμηλή απόδοση της αντίδρασης πιθανώς να έδωσαν χαμηλότερες τιμές στο δείγμα που αποτελείται από 100% φλοιούς. Τα δείγματα δεν

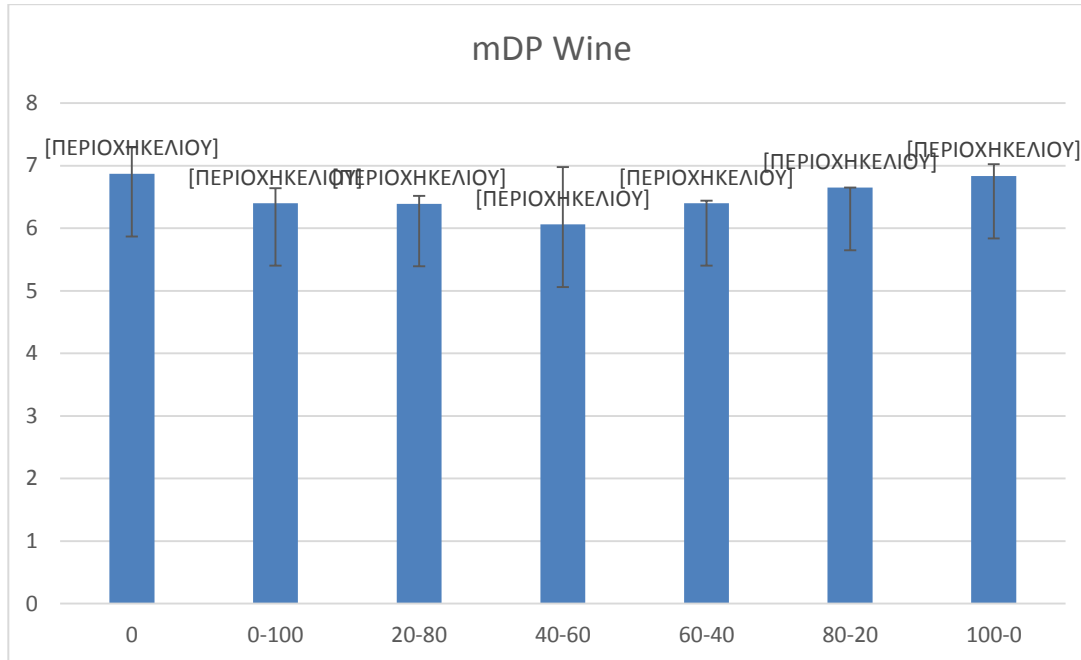
παρουσιάζουν στατικά σημαντικές διαφορές.



Γράφημα 25. Ποσοστό εστεροποίησης με γαλλικό οξύ (%G) στα δείγματα του model wine. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$)

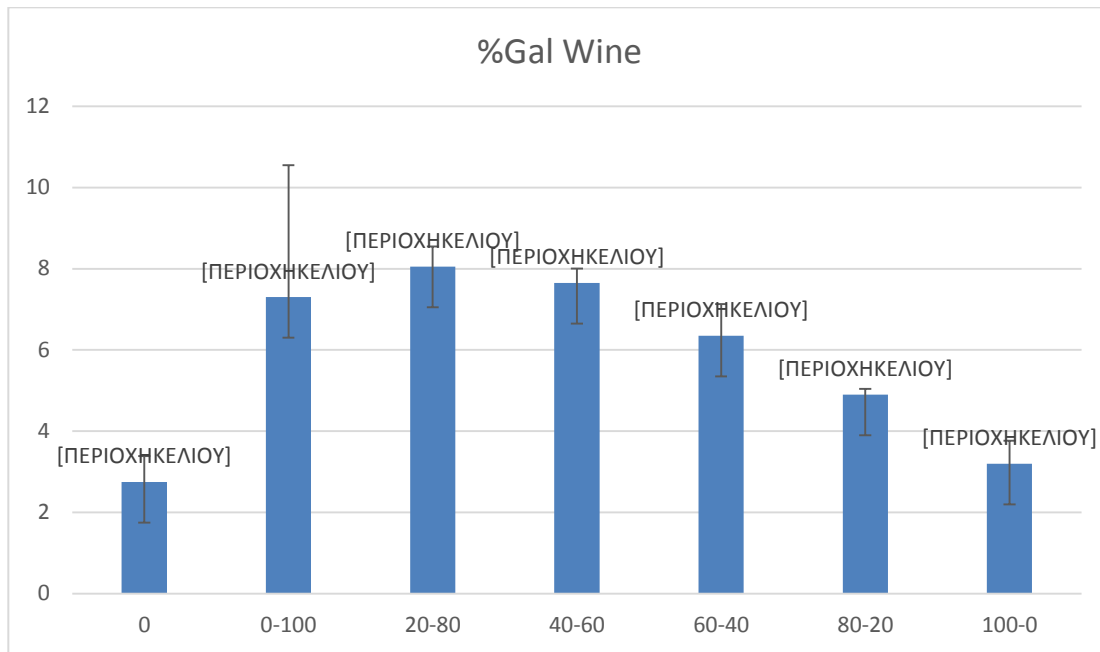
Όσον αφορά το ποσοστό εστεροποίησης με γαλλικό οξύ στα δείγματα του model wine παρατηρείται μια πολύ μικρή τάση μείωσης των τιμών ξεκινώντας από την αναλογία 100% γιγάρτων (δείγμα 0-100) ενώ στα δείγματα 80-20 και 100-0 τα αποτελέσματα ήταν μη ανιχνεύσιμα. Τα υπόλοιπα δείγματα δεν παρουσιάζουν σημαντικά στατιστικές διαφορές μεταξύ τους.

11.2 Αποτελέσματα οίνου



Γράφημα 26. Μέσος βαθμός πολυμερισμού (mDP) στα δείγματα του οίνου. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$)

Όπως και στα δείγματα του model wine έτσι και στα δείγματα του οίνου όσον αφορά τον μέσο βαθμό πολυμερισμού με βάση το παραπάνω γράφημα παρατηρούμε ότι δεν ακολουθεί αύξηση ή μείωση στις τιμές αλλά διακύμανση των τιμών. Η μεγαλύτερη τιμή του μέσου βαθμού πολυμερισμού εντοπίζεται στο δείγμα 0 (μάρτυρας). Αντίθετα, η μικρότερη τιμή εντοπίζεται στο δείγμα 40-60. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε σχέση με τα δείγματα του model wine που ακολουθούν μια αύξηση και έπειτα μείωση στην περίπτωση του οίνου παρατηρούμε το αντίθετο, δηλαδή μια μικρή μείωση και στην συνέχεια αύξηση. Τέλος, τα δείγματα δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές τόσο μεταξύ τους όσο και με το μάρτυρα.



Γράφημα 27. Ποσοστό εστεροποίησης με γαλλικό οξύ (%G) στα δείγματα του model wine. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$)

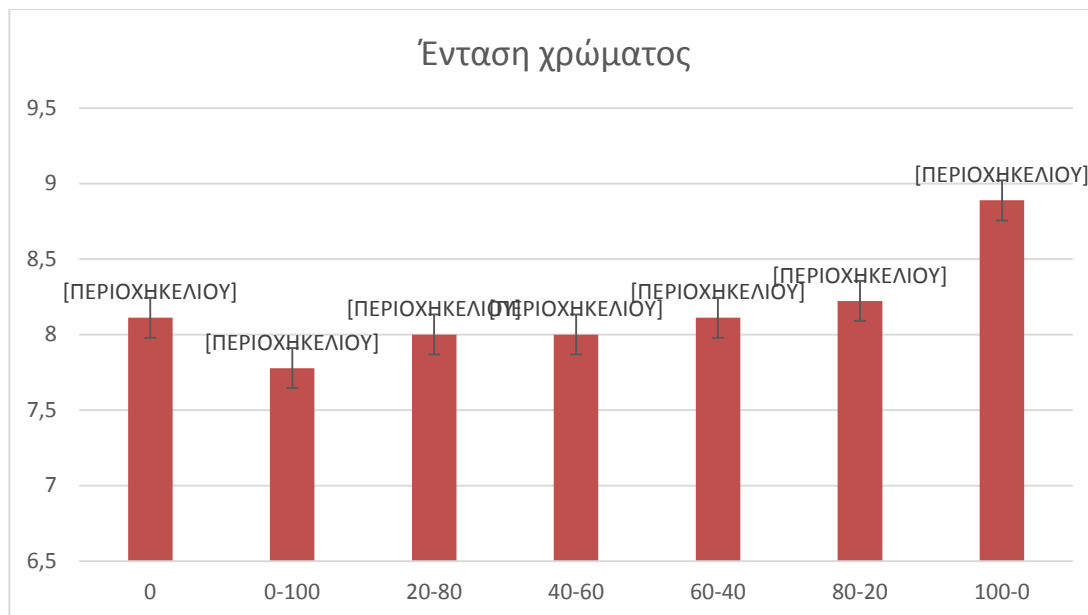
Όπως και στα δείγματα του model wine έτσι και στα δείγματα του οίνου στο ποσοστό εστεροποίησης με γαλλικό οξύ παρατηρείται και σε αυτή την περίπτωση μια σταδιακή μείωση των τιμών με εξαίρεση το δείγμα 0-100 που παρουσιάζει μικρότερη τιμή σε σχέση με το δείγμα 20-80, που αποτελεί την μεγαλύτερη τιμή και είναι το μοναδικό δείγμα που διαφέρει στατιστικά σημαντικά από το μάρτυρα (δείγμα 0).

Συνοψίζοντας τα παραπάνω αποτελέσματα, με βάση την εκχύλιση των διαφορετικών αναλογιών φλοιών και γιγάρτων για 48 ώρες σε πρότυπο διάλυμα οίνου (model wine) και οίνου, φαίνεται ότι επηρεάζεται τόσο η ένταση του χρώματος όσο και η χημική σύσταση και στις δύο περιπτώσεις. Με βάση τα αποτελέσματα της έντασης του χρώματος και του προσδιορισμού των ανθοκυανών, τόσο με την φωτομετρική μέθοδο όσο και με την μέθοδο HPLC, διακρίνουμε ότι όσο αυξάνεται η αναλογία των φλοιών σε σχέση με γιγάρτων, τόσο αυξάνεται και η ένταση του χρώματος και η παρουσία των ανθοκυανών, τόσο στα δείγματα του model wine όσο και σε αυτά του οίνου. Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τον δείκτη φαινολικών ουσιών (ΔΦΟ), τον προσδιορισμό του μέσου βαθμού πολυμερισμού (mDP) των ταννινών και τις μεθόδους προσδιορισμού των ταννινών MCP και BSA η παρουσία μεγαλύτερων αναλογιών γιγάρτων σε σχέση με φλοιών οδηγεί σε αύξηση των ταννινών τόσο στα δείγματα του model wine όσο και στα δείγματα του οίνου. Τέλος, όσον αφορά την αντιοξειδωτική ικανότητα με βάση τα αποτελέσματα της μεθόδου DPPH παρατηρούμε ότι η προσθήκη διαφορετικών αναλογιών ταννινών φλοιών και γιγάρτων προκαλεί μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα στα δείγματα που αποτελούνται από μεγαλύτερη αναλογία γιγάρτων έναντι φλοιών.

12. Οργανοληπτικός έλεγχος

Τα δείγματα του οίνου αξιολογήθηκαν οργανοληπτικά ως προς την ένταση και απόχρωση του χρώματος, την πικρή γεύση και την στυπτικότητα. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την οργανοληπτική αξιολόγηση των δειγμάτων παρουσιάζονται στα παρακάτω γραφήματα:

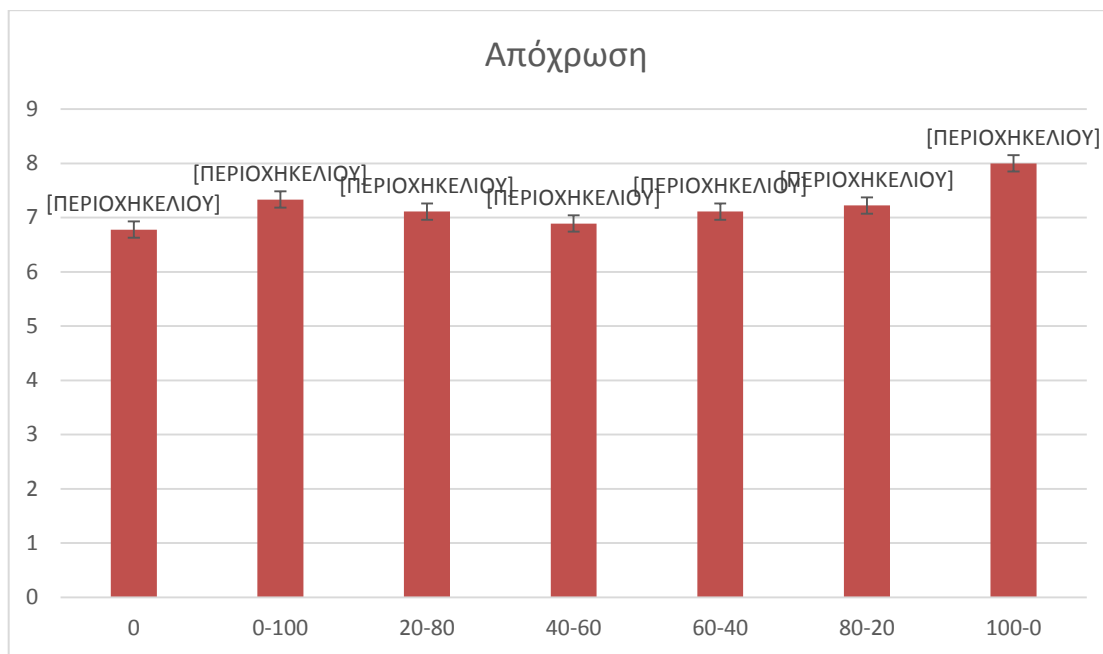
12.1 Ένταση χρώματος



Γράφημα 28. Ένταση χρώματος στα δείγματα του οργανοληπτικού ελέγχου. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$)

Από το παραπάνω γράφημα παρατηρούμε για την ένταση του χρώματος σταδιακή αύξηση των τιμών ξεκινώντας από την αναλογία 100% γιγάρτων (δείγμα 0-100) και καταλήγοντας στην αναλογία 100% φλοιών (δείγμα 100-0). Οι δοκιμαστές αξιολόγησαν ως πιο έντονο χρωματικά το δείγμα 100-0, ενώ αντίθετα λιγότερο έντονο το δείγμα 0-100. Τα δείγματα δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές τόσο μεταξύ τους όσο και με το μάρτυρα (δείγμα 0).

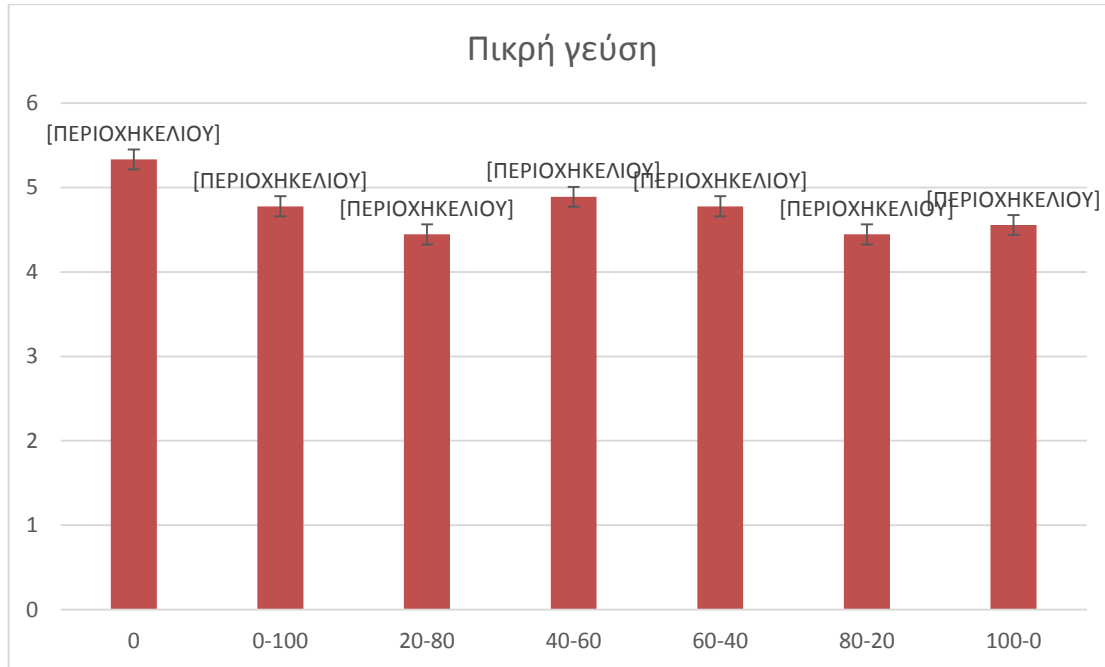
12.2 Απόχρωση



Γράφημα 29. Απόχρωση στα δείγματα του οργανοληπτικού ελέγχου. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$)

Σε σχέση με την απόχρωση παρατηρώντας το παραπάνω γράφημα οι δοκιμαστές αξιολόγησαν το δείγμα 100-0 ως το πιο έντονο σε απόχρωση, ενώ αντίθετα λιγότερο έντονο το μάρτυρα (δείγμα 0). Τα δείγματα δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές τόσο μεταξύ τους όσο και με το μάρτυρα.

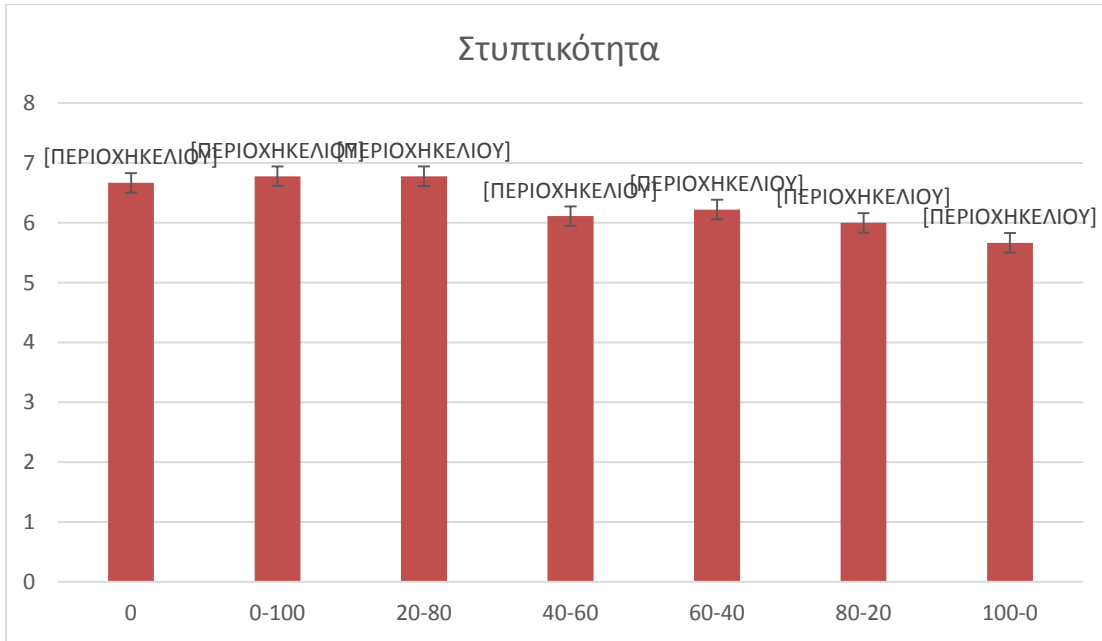
12.3 Πικρή γεύση



Γράφημα 30. Πικρή γεύση στα δείγματα του οργανοληπτικού ελέγχου. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$)

Όσον αφορά την πικρή γεύση παρατηρώντας το παραπάνω γράφημα οι δοκιμαστές αξιολόγησαν το μάρτυρα (δείγμα 0) ως το πιο πικρό, ενώ αντίθετα λιγότερο πικρά τα δείγματα 20-80 και 80-20, τα οποία παρουσιάζουν την ίδια τιμή. Τα δείγματα δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές τόσο μεταξύ τους όσο και με το μάρτυρα.

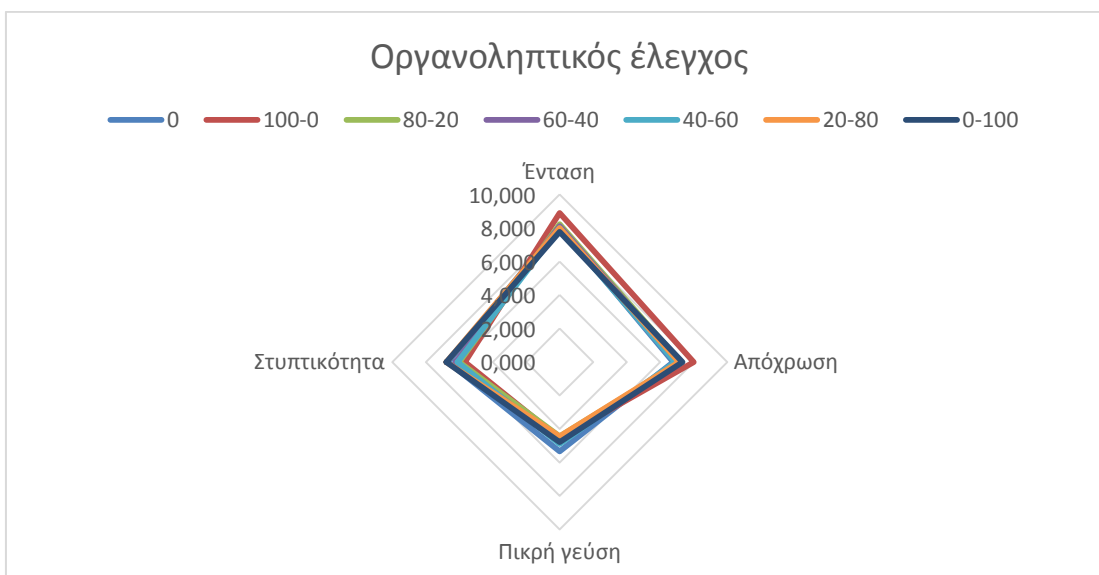
12.4 Στυπτικότητα



Γράφημα 31. Στυπτικότητα στα δείγματα του οργανοληπτικού ελέγχου. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$)

Τέλος, όσον αφορά την στυπτικότητα παρατηρούμε στο παραπάνω γράφημα ότι οι δοκιμαστές αξιολόγησαν ως πιο στυφά τα δείγματα 0-100 και 20-80, τα οποία παρουσιάζουν την ίδια τιμή, ενώ αντίθετα ως λιγότερο στυφό το δείγμα 100-0. Τα δείγματα δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές τόσο μεταξύ τους όσο και με το μάρτυρα (δείγμα 0).

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα του οργανοληπτικού ελέγχου παρατηρούμε στο παρακάτω γράφημα ότι οι μεγαλύτερες διαφορές ανάμεσα στα δείγματα του οίνου εντοπίζονται στην ένταση και απόχρωση του χρώματος. Τόσο στην ένταση του χρώματος όσο και στην απόχρωση το δείγμα που παρουσιάζει τις μεγαλύτερες τιμές είναι το δείγμα 100-0. Πρόκειται για το δείγμα αναλογίας 100% φλοιών, επομένως αποτελεί και το δείγμα με την μεγαλύτερη συγκέντρωση ανθοκυανών. Όσον αφορά την στυπτικότητα και πικρή γεύση τα δείγματα του οίνου παρουσιάζουν διαφορές μεταξύ τους χωρίς ωστόσο να είναι μεγάλες. Σχετικά με την στυπτικότητα το δείγμα που παρουσιάζει τις μεγαλύτερες τιμές είναι το δείγμα 0-100. Πρόκειται για το δείγμα αναλογίας 100% γιγάρτων, επομένως αποτελεί και το δείγμα με την μεγαλύτερη συγκέντρωση ταννινών. Τέλος, όσον αφορά την πικρή γεύση το δείγμα με την μεγαλύτερη τιμή είναι ο μάρτυρας.



Γράφημα 32. Παρουσίαση των οργανοληπτικών αποτελεσμάτων των δειγμάτων του οίνου

Κεφάλαιο 2: Συμπεράσματα

1. Συζήτηση

Στόχος της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας ήταν να μελετήσει την συμβολή της προσθήκης διαφορετικών αναλογιών ταννινών φλοιών και γιγάρτων στην ένταση και σταθεροποίηση του χρώματος, την χημική σύσταση, την αντιοξειδωτική δράση και τέλος σε ορισμένα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και συγκεκριμένα στην ένταση, την απόχρωση, την στυπτικότητα και την πικρή γεύση. Η προσθήκη των φλοιών και γιγάρτων έγινε σε δύο μέσα (model wine και οίνος), ώστε να υπάρξει συσχετισμός μεταξύ τους.

Αναφορικά με την ένταση του χρώματος σύμφωνα με την Κουράκου-Δραγώνα, 1998 οι χρωστικές ενώσεις εντοπίζονται κατά κύριο λόγο στους φλοιούς. Επομένως αναμένουμε η ένταση του χρώματος να αυξάνεται με την παρουσία μεγαλύτερων αναλογιών φλοιών.

Όσον αφορά το δείκτη φαινολικών ουσιών (ΔΦΟ) σύμφωνα με την Krithika, *et al.* 2015, τα γίγαρτα φαίνεται να έχουν το μεγαλύτερο ποσοστό (62%) σε φαινολικά συστατικά (σε κόκκινο σταφύλι). Επομένως σε αναλογίες με μεγαλύτερο ποσοστό γιγάρτων αναμένουμε μεγαλύτερες τιμές του ΔΦΟ.

Σύμφωνα με τους Ribéreau-Gayon, *et al.* 2006, οι ανθοκυάνες είναι οι ερυθρές χρωστικές στα σταφύλια, που βρίσκονται κυρίως στους φλοιούς και σπανίως στη σάρκα. Επομένως η παρουσία μεγαλύτερων αναλογιών φλοιών αναμένεται να παρουσιάσει αύξηση των τιμών των ανθοκυανών.

Σύμφωνα με τον Gawel, 1997), οι ταννίνες συναντώνται στα γίγαρτα σε ποσοστό έως 65% και είναι αυτές που προκαλούν την στυπτικότητα στο στόμα, λόγω της ιδιότητας τους να δημιουργούν σύμπλοκα με τις πρωτεΐνες και άλλους πολυσακχαρίτες. Επομένως οι αυξημένες αναλογίες γιγάρτων αναμένεται να παρουσιάσουν αύξηση των ταννινών και της στυπτικότητας.

Όσον αφορά την αντιοξειδωτική ικανότητα, σύμφωνα με τον Ricardo-da-silva, *et al.* 1991,

η παρουσία των ταννινών αυξάνει την αντιοξειδωτική ικανότητα. Επομένως, οι μεγαλύτερες τιμές της μεθόδου DPPH αναμένονται στα δείγματα που εμπεριέχουν μεγαλύτερες αναλογίες γιγάρτων.

Τέλος, σύμφωνα με τον Souquet, et al. 1996, οι ταννίνες των φλοιών έχουν πολυπλοκότερη δομή συγκριτικά με τις ταννίνες των γιγάρτων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ο μέσος βαθμός πολυμερισμού να είναι μεγαλύτερος από αυτόν των ταννινών των γιγάρτων με βάση τον Cheynier, et al., 2005. Επομένως, οι τιμές του mDP αναμένονται μεγαλύτερες στις αναλογίες που αποτελούνται από μεγαλύτερα ποσοστά ταννινών φλοιών.

2. Συμπεράσματα

Όσον αφορά την ένταση και σταθεροποίηση του χρώματος αναλύοντας τα αποτελέσματα της έντασης του χρώματος συμπεραίνουμε ότι η παρουσία μεγαλύτερων αναλογιών φλοιών σε σχέση με γιγάρτων οδηγεί σε αύξηση της έντασης και σταθεροποίησης του χρώματος τόσο στα δείγματα του model wine όσο και σε αυτά του οίνου. Το ίδιο συμπέρασμα προκύπτει και από τον οργανοληπτικό έλεγχο, όπου οι δοκιμαστές αξιολόγησαν ως πιο έντονα σε χρώμα και σε απόχρωση τα δείγματα του οίνου με μεγαλύτερες αναλογίες σε φλοιούς. Επομένως, η προσθήκη διαφορετικών αναλογιών φλοιών οδηγεί σε αντίστοιχη αύξηση της έντασης του χρώματος του οίνου.

Για τον δείκτη φαινολικών ουσιών (ΔΦΟ) τα αποτελέσματα παρουσίασαν την αναμενόμενη μείωση του ΔΦΟ στα δείγματα που είχαν χαμηλότερα ποσοστά φλοιών.

Αναφορικά με τον προσδιορισμό των ανθοκυανών, τόσο με την φωτομετρική μέθοδο όσο και με την μέθοδο HPLC, συμπεραίνουμε ότι η παρουσία μεγαλύτερων αναλογιών φλοιών σε σχέση με γιγάρτων οδηγεί σε αύξηση των ανθοκυανών τόσο στα δείγματα του model wine όσο και σε αυτά του οίνου.

Σχετικά με την χημική σύσταση από τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις μεθόδους προσδιορισμού των ταννινών MCP και BSA συμπεραίνουμε ότι υπάρχει μεταβολή της χημικής σύστασης έπειτα από την προσθήκη διαφορετικών αναλογιών ταννινών φλοιών και γιγάρτων. Με βάση τα αποτελέσματα του προηγούμενου κεφαλαίου συμπεραίνουμε ότι η παρουσία μεγαλύτερων αναλογιών γιγάρτων σε σχέση με φλοιών οδηγεί σε αύξηση των ταννινών τόσο στα δείγματα του model wine όσο και στα δείγματα του οίνου. Αυτό είναι και το συμπέρασμα που προκύπτει από τον οργανοληπτικό έλεγχο, όπου οι δοκιμαστές αξιολόγησαν τα δείγματα του οίνου με μεγαλύτερες αναλογίες σε γιγάρτα ως τα δείγματα με την υψηλότερη στυπτικότητα. Επομένως, η προσθήκη διαφορετικών αναλογιών γιγάρτων οδηγεί σε αντίστοιχη αύξηση των ταννινών και κατ' επέκταση της στυπτικότητας του οίνου. Σε αντίθεση με την στυπτικότητα, με βάση την αξιολόγηση των δοκιμαστών η πικρή γεύση μειώθηκε σε όλα τα δείγματα του οίνου έπειτα από την προσθήκη διαφορετικών αναλογιών φλοιών και γιγάρτων.

Αναφορικά με την αντιοξειδωτική ικανότητα αναλύοντας τα αποτελέσματα της μεθόδου DPPH συμπεραίνουμε ότι η προσθήκη διαφορετικών αναλογιών ταννινών φλοιών και γιγάρτων προκαλεί μικρή αύξηση στην αντιοξειδωτική ικανικότητα στα δείγματα του οίνου σε σχέση με το μάρτυρα. Επίσης, παρατηρείται μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα στα δείγματα που αποτελούνται από μεγαλύτερη αναλογία γιγάρτων έναντι φλοιών.

Τέλος, τα αποτελέσματα της μεθόδου προσδιορισμού του μέσου βαθμού πολυμερισμού (mDP) δεν έδωσαν την αναμενόμενη αύξηση στις αναλογίες που επικρατούν οι φλοιοί στα δείγματα του model wine, σε αντίθεση με τα δείγματα του οίνου. Ωστόσο τόσο στην περίπτωση των δειγμάτων του model wine, όσο και στην περίπτωση του οίνου παρατηρήθηκε διακύμανση των τιμών και όχι σταδιακή αύξηση στις αναλογίες που αποτελούνται από μεγαλύτερα ποσοστά φλοιών.

3. Προτάσεις - Μελλοντική έρευνα

Τα συμπεράσματα της παρούσας έρευνας παρουσιάζουν οινολογικό ενδιαφέρον σχετικά με την αύξηση της έντασης του χρώματος των οίνων, τον εμπλουτισμό τους σε ταννίνες και τέλος την επίδραση σε ορισμένα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Αναλόγως με τον σκοπό που θέλει να πετύχει ο οινοποιός μπορεί να χρησιμοποιήσει και διαφορετική αναλογία. Αν για παράδειγμα επιθυμεί να προσδώσει μόνο ένταση στο χρώμα του οίνου ενδείκνυται με βάση τα αποτελέσματα ως πιο αποτελεσματική η προσθήκη αναλογίας 100% φλοιών. Αντίθετα, αν επιθυμεί αποκλειστικά τον εμπλουτισμό ταννινών με σκοπό την αύξηση της στυπτικότητας ενδείκνυται ως πιο αποτελεσματική η προσθήκη αναλογίας 100% γιγάρτων. Ανάλογα με τις ανάγκες του οινοποιού για συνδυασμό αύξησης της έντασης του χρώματος και των ταννινών μπορεί να χρησιμοποιηθεί κάποια ενδιάμεση αναλογία, με βάση το αποτέλεσμα που επιθυμεί στο τελικό προϊόν. Τέλος, ιδιαίτερα σημαντική παρατήρηση που μπορεί να χρησιμοποιηθεί από κάποιον οινοποιό σε περίπτωση οίνου με πικρή γεύση είναι η μείωση της πικρής γεύσης του οίνου μετά από προσθήκη οποιασδήποτε αναλογίας ταννινών φλοιών και γιγάρτων, με σημαντικότερη την επίδραση των αναλογιών 80% φλοιών - 20% γιγάρτων και 20% φλοιών - 80% γιγάρτων.

Ολοκληρώνοντας την παρούσα έρευνα με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα και συμπεράσματα μπορούμε να οδηγηθούμε και σε περαιτέρω μελέτη άλλων ερυθρών ποικιλιών σχετικά με την εκχύλιση και την επίδραση αυτών στην ένταση και σταθεροποίηση του χρώματος, την χημική σύσταση, την αντιοξειδωτική δράση και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά που μελετήσαμε.

Βιβλιογραφία

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Κοτσερίδης, Γ. (2005), Σημειώσεις/Εργαστηριακές Ασκήσεις Οινολογίας Ι, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Αθήνα.

Κοτσερίδης, Γ.,(2014/α),. Σημειώσεις/Εργαστηριακές Ασκήσεις Οινολογίας Ι, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, Αθήνα

Κουράκου-Δραγώνα, Σ. (1998). Θέματα οινολογίας: επιστήμη και τεχνολογία στους τομείς της οινοποιητικής τεχνικής. Αθήνα: Εκδόσεις Τροχαλία-Γ. Τρουφάκος & ΣΙΑ Ε.Ε.

Νικολάου, Ν. Α. (2008). Αμπελουργία. Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις Σύγχρονη παιδεία.

Σουφλερός, Ε. Η. (1997). Οίνος και αποστάγματα: Μέθοδοι ανάλυσης. Θεσσαλονίκη :Τυπογραφία Παπαγεωργίου 1997.

Σουφλερός, Ε. Η. (2000). Οινολογία : επιστήμη και τεχνολογία. Θεσσαλονίκη: 2000.

Σταυρακάκης, Μ. Ν. (2013). Αμπελουργία. Εκδόσεις: ΤΡΟΠΗ.

Σταύρακας Δ. Ε. (2011). Αμπελογραφία. Εκδόσεις Ζήτη.

Ταραντίλη Π.Α. (2019). Σημειώσεις του μαθήματος «Μηχανική των πολυμερών», Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Σχολή Χημικών Μηχανικών, Τομέας ΙV: Σύνθεσης και Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διαδικασιών, Εργαστήριο Τεχνολογίας Πολυμερών

Τσακιρης Α., (2014), Οινολογία: Από το σταφύλι στο κρασί, Εκδόσεις Ψύχαλος

Τσέτουρας, Π. Α. (2009). Η τέχνη της αμπελουργίας: Αμπέλι οινοποιίας. Αθήνα: Εκδόσεις Σταμούλη Α.Ε.

ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Andersen, O. M. (2006). Flavonoid: Chemistry, Biochemistry and Applications.

Arnous, A., Makris, D. P., & Kefalas, P. (2001). Effect of principal polyphenolic components in relation to antioxidant characteristics of aged red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (12): 5736–5742.

Becker E., Nissen L. and Skibsted L., (2004), Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. *European Food Research and Technology* ,2004:219, 561–571

Bordiga, M.; Travaglia, F.; Locatelli, M.; Coisson, J.D.; Arlorio, M. (2011). Characterization of polymeric skin and seed proanthocyanidins during ripening in six *Vitis vinifera* L. cv. *Food Chemistry*, 127, 180-187.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30.

Bravo, L. (1998), Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance, *Nutrition Reviews*, 1998:56, 317–333

Brossaud, F.; Cheynier, V.; Noble, A.C. (2001). Bitterness and astringency of grape and wine polyphenols. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 7(1), 33-39.

Castillo-Sánchez J. X., García-Falcón M. S., Garrido J., Martínez-Carballo E., Martins-Dias L. R., Mejuto X.C., (2008). Phenolic compounds and colour stability of Vinho wines: Influence of wine-making protocol and fining agents. *Food Chemistry*, 106: 18-26.

Cheynier V., Dueñas-Paton M., Salas E., Maury C., Souquet J., Sarni-Manchado P. and Fulcrand H., (2005), Structure and Properties of Wine Pigments and Tannins, ASEV 2005 Phenolics Symposium, *American Journal Of Enology and Viticulture*, 2006:57, 298-305

Chira, K., Schmauch, G., Saucier, C., Fabre, S., & Teissedre, P.-L. (2009). Grape Variety Effect on Proanthocyanidin Composition and Sensory Perception of Skin and Seed Tannin Extracts from Bordeaux Wine Grapes (Cabernet Sauvignon and Merlot) for Two Consecutive Vintages (2006 and 2007). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 545–553.

Chira, K.; Zeng, L.; Le Floch, A; Péchamat, L.; Jourdes, M.; Teissedre, P.L. (2015) Compositional and sensory characterization of grape proanthocyanidins and oak wood ellagitannin. *Tetrahedron*, 71, 2999-3006.

Cohen, S.D.; Tarara, J.M.; Kennedy J.A. (2008). Assessing the impact of temperature on grape phenolic metabolism. *Analytica Chimica Acta*, 621, 57-67.

Considine J.A., Knox R.B., (1979). Development and histochemistry of the cells, cell walls and cuticle of the dermal system of fruit of the grape, *Vitis vinifera L., Protoplasma*, 99: 347-365.

Cortell J. M., (2006). Influence of Vine Vigor and Shading in Pinot noir (*Vitis vinifera L.*) on the Concentration and Composition of Phenolic Compounds in Grapes and Wine. Oregon State University.

Cosme, F.; Ricardo-Da-Silva, J.M.; Laureano, O. (2009). Tannin profiles of *Vitis vinifera L. cv.* red grapes growing in Lisbon and from their monovarietal wines. *Food Chemistry*, 112(1), 197-204.

Ćurko, N.; Kovačević Ganić, K.; Gracin, L.; Đapić, M.; Jourde, M.; Teissedre, P.L. (2014). Characterization of seed and skin polyphenolic extracts of two red grape cultivars grown in Croatia and their sensory perception in a wine model medium. *Food Chemistry*, 145, 15-22.

Da-Costa C. T., Horton D., Margolis S. A., (2000). Analysis of anthocyanins in foods by liquid chromatography-mass spectrometry and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography*, 881: 403-410.

Downey, M.O.; Harvey, J.S.; Simon, R. (2003) Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz

grapes throughout berry development. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 9, 15-27.

Fang, F., Ming Li, J., Zhang, P., Tang, K., Wang, W., Pan, Q. and Huang, W. (2008), Effects of grape variety, harvest date, fermentation vessel and wine ageing on flavonoid concentration in red wines, *Food Research International*, 41, 53-60.

Gagné, S.; Saucier, C.; Gény, L. (2006). Composition and cellular localization of tannins in Cabernet Sauvignon skins during growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9465-9471.

Gawel R., (1997), The use of language by trained and untrained experienced wine tasters, *Journal of sensory studies*, 1997:12, 267-284

Gil-Munoz, R., Gomez-Plaza, E., Martinez, A., and Lopez-Roca, J. M. (1999), Evolution of phenolic compounds during wine fermentation and post-fermentation: influence of grape temperature, *Journal of Composition and Analysis*, 12, 259-272.

Gonzalez-Neves, G., Charamelo, D., Balado, J., Barreiro, L., Bochicchio, R., Gatto, G., Gil, G., Tessore, A., Carbonneau, A. and Moutounet, M. (2004), Phenolic potential of Tannant, Cabernet Sauvignon and Merlot grapes and their correspondence with wine composition, *Analytica Chimica Acta*, 513, 191-196.

Grainger, K., & Tattersall, H. (2005). *Wine production: vine to bottle*. Blackwell.

Hanlin R.L. and Downey, M.O. Condensed tannin accumulation and composition in Shiraz and Cabernet Sauvignon grapes during berry development. *American Journal of Enology and Viticulture*, 2009, 60(1), 13-23.

Hassanpour S., Maheri-Sis N., Eshratkhah B. and Mehmandar F., (2011), Plants and secondary metabolites (Tannins): A Review, *Int. J. Forest, Soil and Erosion*, 2011:1, 47-53

Herderich M. and Smith P., (2005), Analysis of grape and wine tannins: Methods, applications and challenges, *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 2005:11, 205–214

Jackson D. and Lombard P., (1993), Environmental and management practices affecting grape composition and wine quality: A Review, *American Journal of Enology and Viticulture*, 1993:44, 409-430

James F. Harbertson, James A. Kennedy, Douglas O. Adams. (2002). *American Journal of Enology and Viticulture*, 53: 54-59

Kahkoken, M. P., & Heinonen, M. (2003). Antioxidant Activity of Anthocyanins and Their Aglycons. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 628–633.

Kallithraka, S.; Bakker, J.; Clifford, M.N. (1996). Evaluation of bitterness and astringency of (+)-catechin and (-)-epicatechin in red wine and in model solution *Journal of Sensory Studies*, 12 (1), 25-37.

Kassara S, Kennedy JA. (2011). Relationship between red wine grade and phenolics. 2. Tannin composition and size. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 59(15), pp.8409-8412.

- Kennedy J.A., (2002): Understanding Grape Berry Development. Practical winery and vineyard magazine.
- Kennedy, J. A., & Jones, G. P. (2001). Analysis of Proanthocyanidin Cleavage Products Following Acid-Catalysis in the Presence of Excess Phloroglucinol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1740–1746.
- Khanbabae K. and van Ree T., (2001), Tannins: Classification and definition, *Natural Product Reports*, 2001:18, 641–649
- Krause, D.O., Smith, W.J.M., Brooker, J.D. & McSweeney, C.S., (2005). Tolerance mechanisms of streptococci to hydrolysable and condensed tannins. *Anim. Feed Sci. Technol.* 121, 59-7
- Krithika, V., Naik, R., & Pragalyaashree. (2015). Functional properties of grape (*Vitis vinifera*) seed extract and possible extraction techniques -A review. *Agricultural Reviews*, 36(4), 313–320.
- Labarbe B., Cheynier V., Brossaud F., Souquet J.M., Moutounet M., (1999). Quantitative Fractionation of Grape Proanthocyanidins According to Their Degree of Polymerization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 2719-2723.
- Lee H. S., Hong V., (1992). Chromatographic analysis of anthocyanins. *Journal of Chromatography*, 624: 221-234.
- Leeuw, R. Van, Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J. O., & Dommes, J. (2014). Journal of Food Composition and Analysis Antioxidant capacity and phenolic composition of red wines from various grape varieties: Specificity of Pinot Noir. *Journal of Food Composition and Analysis*, 36(1–2), 40–50.
- Li, Q.; Liu Y.X.; Pan, Q.H.; Duan, C.Q.; Shi, Y. (2014). Comparison of Proanthocyanidins with Different Polymerisation Degrees among Berry Skins of ‘Shiraz’, ‘Cabernet Sauvignon’, and ‘Marselan’. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 35(1), 51-58.
- Lorrain B., Ky I., & Pechamat L., & Teissedre P.-L., (2013). Evolution of Analysis of Polyphenols from Grapes, Wines, and Extracts. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 18. 1076-100.
- Markham, K. R.; Bloor, S. J. Analysis and identification of flavonoids in practice. In *Flavonoids in Health and Disease*; Rice-Evans, C. A., Packer, L., Eds.; Dekker: New York, 1998; pp 1-33.
- Mattivi, F.; Vrhovsek, U.; Masuero, D.; Trainotti, D. (2008). Differences in the amount and structure of extractable skin and seed tannins amongst red grape varieties. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 15, 27-35.
- Monagas, M., Gomez-Cordoves, C., Bartolome, B., Laureano, O., & Ricatdo da Silva, J. M. (2003). Monomeric, ligomeric and polymeric flavan-3-ol composition of Wines and Grapes from *Vitis vinifera* L. Cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6475–6481.
- Monteleone E., Condelli N., Dinella C. and Bertuccioli M., (2004), Prediction of perceived astringency induced by phenolic compounds, *Food Quality and Preference*, 2004:15, 761–769

Moutounet, M., Rabier, P.H., Puech, J.L., Verette, E. & Barillere, J.M., 1989. Analysis by HPLC of extractable substances in oak wood. Application to a Chardonnay wine. *Sci. Aliments* 9, 35-51.

Mullins G.M., Bouguet Al., Williams E.L., (1990). *Biology of Grapevine*. Cambridge University Press, USA.

Nikolaos Gougoulas, Ioannis Vagelas, Liviu Giurgiulescu, Maria-Nektaria Ntalla, Polyxeni Nterkou, Afroditi Salonikioti, Spyridoula Efthimiou, Ioan-Radu Sugar (2018), Comparative study on polyphenols content and antioxidant effect of some grape varieties grown in central Greece. *Carpathian Journal of Food Science & Technology*, Vol. 10 Issue 1, p141-149. 9p.

Obreque-Slier, E; Peña-Neira, A.; Lopez-Solis, R.; Zamora-Marín, F.; Ricardo-da Silva, M.A.; Laureano, O. (2010). Comparative Study of the Phenolic Composition of Seeds and Skins from Carménère and Cabernet Sauvignon Grape Varieties (*Vitis vinifera* L.) during Ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58, 3591-3599.

Ortega-Regules, A., Romero-Cascales, I., Ros-Garcia, J.M., Lopez-Roca, J.M., Plaza-Gomez, E. (2006), A first approach towards the relationship between grape skin cell-wall composition and anthocyanin extractability, *Analytica Chimica Acta*, 563, 26-32.

Pannala, A. S., Chan, T. S., O'Brien, P. J., & Rice-Evans, C. A. (2001). Flavonoid B-Ring Chemistry and Antioxidant Activity: Fast Reaction Kinetics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 282(5), 1161–1168.

Peleg H., Gacon K., Schlich P., Noble A.C., (1999). Bitterness and astringency of flavan-3-ol monomers, dimers, and trimers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79:1123-1128.

Prieur C., Rigaud J., Cheynier V. and Moutounet M., (1994), Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds, *Phytochemistry*, 1994:36, 781–784

Quijada-Morín, N.; Regueiro, J.; Simal-Gándara, J.; Tomás, E.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Escribano-Bailón, M.T. (2012). Relationship between the sensory-determined astringency and the flavanolic composition of red wines. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 60(50), 12355-12361.

Revilla E., Ryan J. M., Mart n-Ortega G., (1998). Comparison of several procedures used for the extraction of anthocyanins from red grapes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46: 4592-4597.

Ribéreau-Gayon P. and Stonestreet E. (1965) *Bull. Soc. Chim.*, 9, 2649.

Ribéreau- Gayon P., Glories Y., Maujean A. and Dubourdiou, D. (2000), *Handbook of Enology*, Vol. 2, *The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments*, Wiley

Ribreau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdiou D., (2006). *Handbook of Enology*. Vol 2: *The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments* (2nd Edition).

Ricardo-da-Silva, J.M.; Cheynier, V.; Souquet, J.M.; Moutounet, M.; Cabanis, J.C.; Bourzeix, M. (1991a). Interaction of grape seed procyanidins with various proteins in relation to wine fining.

Journal of the Science of Food and Agriculture, 57, 111-125.

Ricardo da Silva, J.M.; Darmon, N.; Fernández, Y.; Mitjavila, S. (1991b). Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 39, 1549-1552.

Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, 20(7), 933–956.

Rinaldi, A.; Jourdes, M.; Teissedre, P.L.; Moio L.A. (2014). Preliminary characterization of Aglianico (*Vitis vinifera* L. cv.) grape proanthocyanidins and evaluation of their reactivity towards salivary proteins. *Food Science and Technology*, 164, 142-149.

Sarneckis C., Dambergis R., Jones P., Mercurio M., Herderich M., Smith P., 2006. Quantification of condensed tannins by precipitation with methyl cellulose: development and validation of an optimised tool for grape and wine analysis. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 12:39-49.

Skoog, D., Holler, F. J., & Nieman, T. A. (2005). Αρχές ενόργανης ανάλυσης.

Smith P. and Herderich M., (2004) The effects on red wine of pre- and post-ferment additions of grape-derived tannin. *Australian Wine Research Institute Technical Review*, 2004:152, 3–10

Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM. Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention. *J Clin Lab Anal*. 1997 11:287-313.

Souquet J., Cheynier V., Brossaud F. and Moutounet M., (1996), Polymeric proanthocyanidins from grape skins, *Phytochemistry*, 1996:43, 509–512

Sun, B.; De Sa, M.; Leonardo, M.; Caldeira, I.; Duarte, F.L.; Spranger, I. (2013). Reactivity of polymeric proanthocyanidins toward salivary proteins and their contribution to young red wine astringency. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 939-926.

Sun, B., Neves, A. C., Fernandes, T. A., Fernandes, A. L., Mateus, N., Freitas, V. De, & Spranger, M. I. (2011). Evolution of Phenolic Composition of Red Wine during Vinification and Storage and Its Contribution to Wine Sensory Properties and Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 6550–6557.

Sun, B. S., Pinto, T., Leandro, M. C., Ricardo-Da-Silva, J. M., & Spranger, M. I. (1999). Transfer of catechins and proanthocyanidins from solid parts of the grape cluster into wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50(2), 179–184.

Tsuruta Y., Nagao K., Kai S., Tsuge K., Yoshimura T., Koganemaru K., Yanagita T., (2011). Polyphenolic extract of lotus root (edible rhizome of *Nelumbo nucifera*) alleviates hepatic steatosis in obese diabetic db/db mice. *Lipids Health Dis* 10, 202.

Vidal S., Francis L., Guyot S., Marnet N., Kwiatkowski M., Gawel R., Chenier V., Waters E., (2003). The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83: 564-573.

Watson B., (2003). Evaluation of winegrape maturity. In: E.W. Hellman (ed.). *Oregon viticulture*. Oregon State University Press. Corvallis, Oregon. Pp 235-245.

ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΕΣ

Measuring tannins in grapes and red wine using the MCP (methyl cellulose precipitable) tannin assay (2009) AWRI, www.awri.com.au