

**ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ**

**«ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΕ
ΕΜΠΟΡΙΚΟΥΣ ΟΙΝΟΥΣ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΗΣ
ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ»**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΓΙΑΝΝΑΚΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ



**ΚΑΛΑΜΑΤΑ
2017**

**ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ**

**«ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΕ
ΕΜΠΟΡΙΚΟΥΣ ΟΙΝΟΥΣ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΗΣ
ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ»**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ
ΓΙΑΝΝΑΚΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ**

Εξεταστική Επιτροπή:

ΙΩΑΝΝΗΣ ΚΑΠΟΛΟΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)

ΣΠΗΛΙΟΠΟΥΛΟΣ ΙΩΑΚΕΙΜ

ΖΑΚΥΝΘΙΝΟΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

ΚΑΛΑΜΑΤΑ
2017

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα φαινολικά συστατικά αποτελούν σημαντικό κεφάλαιο της οινολογίας ως θεωρίας και πρακτικής γιατί από αυτά εξαρτάται το χρώμα των έγχρωμων οίνων και οι αποχρώσεις του, αλλά και από αυτά καθορίζονται οι ιδιαίτεροι γευστικοί χαρακτήρες τους. Εξάλλου τα φαινολικά συστατικά υπεισέρχονται στους αρωματικούς χαρακτήρες των οίνων και είναι οι κύριοι υπεύθυνοι για τις θετικές οι αρνητικές μεταβολές της οιντικής ποιότητας κατά την συντήρηση και παλαίωση. Οι ταννίνες καθώς και οι ανθοκυάνες αποτελούν τις δύο μεγάλες τάξεις των φαινολικών συστατικών.

Έχει επικρατήσει να χαρακτηρίζονται ως ταννίνες ουσίες φυτικής προέλευσης διαφορετικής χημικής δομής που έχουν κοινή ιδιότητα να ενώνονται με τις πρωτεΐνες και άλλα πολυμερή. Σε αυτή μάλιστα την ιδιότητα τους οφείλεται η στύφουσα γεύση τους. Στη φύση απαντούν δύο ομάδες ταννινών, οι υδρολύομενες και οι συμπυκνωμένες στη δεύτερη αυτή ομάδα ανήκουν οι ταννίνες των οίνων.

Οι ανθοκυάνες αποτελούν σημαντική οικογένεια των φαινολικών συστατικών και ανήκουν στην κατηγορία των φλαβοειδών φαινολών. Το μεγαλύτερο μέρος των χημικών ουσιών που δίνουν τα άνθη, τους καρπούς, τα φύλλα και καμιά φορά στο περίβλημα των σπόρων το πορφυρό, ερυθρό, πορτοκαλί, κυανό και ιώδες χρώμα τους είναι οι ανθοκυάνες. Οι ανθοκυάνες απαντώνται στη φύση υπό μορφή ετεροζιτών, οι οποίοι υδρολύονται εύκολα προς ένα άγλυκο τμήμα και ένα ή περισσότερα τμήματα σακχάρων. Τα άγλυκα τμήματα που προκύπτουν λέγονται ανθοκυανιδίνες και η πιο διαδεδομένη είναι η κυανιδίνη.

Η παρούσα μελέτη έγινε με σκοπό τον προσδιορισμό των φαινολικών ενώσεων σε δώδεκα εμπορικούς ερυθρούς οίνους με διαφορετική γεωγραφική προέλευση, ώστε να εκτιμηθεί η ικανότητα ή μη των ποικιλιών αυτών να παράγουν οίνους υψηλής ποιότητας.

Για τον προσδιορισμό των πολυφαινολών εφαρμόστηκαν διάφορες αναλυτικές μέθοδοι όπως η μέθοδος HPLC με την οποία έγινε ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης φλαβονοειδών καθώς και η ογκομέτρηση για τον προσδιορισμό της ολικής οξύτητας και του ολικού θειώδες. Τέλος, με τη μέθοδο Follin-Ciocalteu προσδιορίστηκε η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών σε mg γαλλικού οξέος ανά ml ή ανά L.

ABSTRACT

The phenolic components are an important chapter of oenology as a theory and practice because of the color of the colored wines and their shades, but also their particular flavor characteristics are depending on them. In addition, the phenolic components are implicated in the aromatic character of wines and are the main responsible for the positive and negative changes in vinic quality during maintenance and aging. Tannins as well as anthocyanins are the two major classes of phenolic components.

Tannins have been found to be substances of plant origin of a different chemical structure that have a common property to be associated with proteins and other polymers. In fact, their attributes are due to their tart flavor. In nature, two groups of tannins are found, the hydrolysates and the condensed in this second group belong to the tannins of the wines.

Anthocyanins are an important family of phenolic components and belong to the class of flavonoid phenols. Most of the chemicals that give flowers, fruits, leaves, and sometimes the purple, red, orange, cyan, and violet color of the seeds are the anthocyanins. Anthocyanins occur naturally in the form of heterozytes, which are readily hydrolyzed to an agly portion and one or more sugar moieties. The resulting non-fertile moieties are called anthocyanidins, and the most common is cyanidine.

The present study was conducted to identify phenolic compounds in twelve commercial red wines of different geographic origin to assess whether or not these varieties produce high quality wines.

For the determination of polyphenols, various analytical methods, such as the HPLC method, were used to determine the concentration of flavonoids as well as titration to determine total acidity and total sulphite. Finally, the concentration of total phenolics in mg of gallic acid per ml or per L was determined by the Follin-Ciocalteu method

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	3
ABSTRACT.....	4
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	5
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
2.ΟΙ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ.....	10
2.1. Μη φλαβονοειδείς φαινόλες.....	11
2.2. Φλαβονοειδείς φαινόλες.....	13
2.2.1. Φλαβονόλες.....	13
2.2.2. Φλαβονόνες.....	14
2.2.3. Κατεχίνες.....	14
2.2.4. Προκυανιδίνες.....	15
2.3. Ανθοκυάνες.....	17
2.3.1 Η Χημική δομή των ανθοκυανών.....	18
2.3.2. Η Χημική δομή των ανθοκυανίδων.....	18
2.3.3 Οι Χημικές ιδιότητες των ανθοκυανών.....	19
2.4. Ταννίνες.....	21
2.4.1 Η Χημική δομή των ταννινών.....	22
2.4.2 Οι Χημικές ιδιότητες των ταννινών.....	22
2.5 Αντιδράσεις μεταξύ ανθοκυανών & ταννινών.....	24
2.5.1. Υδρολύμενες ταννίνες.....	25
2.5.2. Συμπυκνωμένες ταννίνες.....	25
2.6. Οι μηχανισμοί των αντιδράσεων.....	27
3. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ.....	34
3.1. Καλλιεργούμενη ποικιλία.....	34
3.2. Βαθμός ωριμότητας.....	35
3.3. Κλιματικές συνθήκες.....	35
3.4. Καλλιεργητικές τεχνικές.....	36
3.5. Τεχνική οινοποίησης.....	36
3.6. Εδαφοκλιματικές συνθήκες.....	36
3.6.1 Έδαφος.....	36
3.6.2. Υψόμετρο.....	37

3.6.3. Ηλιακή ακτινοβολία.....	37
3.6.4. Θερμοκρασία	38
3.6.5 Υγρασία	38
4. Η ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ ΦΑΙΝΟΛΩΝ.....	39
4.1. Η βιοσύνθεση των ανθοκυανών.....	40
4.2. Η βιοσύνθεση των ταννινών	42
5. ΜΕΘΟΔΟΣ HPLC ΚΑΙ ΦΑΣΦΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΟΥ.....	44
5.1. Ανθοκυάνες φλοιών με τη μέθοδο HPLC.....	44
5.2. Προσδιορισμός φαινολικών ενώσεων στον οίνο.....	44
5.2.1. Φασματοσκοπία υπεριώδους – ορατού.....	44
5.2.2. Νόμος των Beer-Lambert	45
5.2.3. Φάσματα απορρόφησης υπεριώδους –ορατού	46
5.2.4. Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός.....	47
5.2.5. Επιλογή του αναλυτικού μήκους κύματος.....	47
5.3. Υγρή χρωματογραφία	47
5.3.1. Εφαρμογές.....	51
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	53
6. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ	53
6.1. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ	53
6.2. ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ (FOLLIN- CIOCALTEU).....	54
6.3. ΜΕΤΡΗΣΗ ΟΛΙΚΗΣ - ΕΝΕΡΓΗΣ ΟΞΥΤΗΤΑΣ	57
6.4. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΛΕΥΘΕΡΟΥ & ΟΛΙΚΟΥ ΘΕΙΩΔΗ ΑΝΥΔΡΙΤΗ.....	59
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	65
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	65
ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	66

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα φαινολικά παράγωγα είναι μια μεγάλη ομάδα χημικών ενώσεων, αποτελούμενη από δευτερογενείς μεταβολίτες που εμπλέκονται σε πολλές λειτουργίες των φυτών. Κατά κύριο λόγο, η λειτουργία τους αφορά στην προστασία των φυτικών ιστών από μικρόβια και παθογόνα, την προστασία του φυτού από την υπερϊώδη ακτινοβολία, ενώ παράλληλα λειτουργούν ως ευνοϊκός παράγοντας για την ενίσχυση της γονιμότητας των γυρεόκοκκων (Boss et al., 1996, Koes et al., 1994).

Στο φυτό της αμπέλου, τα φαινολικά παράγωγα απαντώνται στα στερεά μέρη της σταφυλής, αλλά κυρίως στο φλοιό και τα γίγαρτα, και εμπλέκονται στους μηχανισμούς άμυνας των πρέμνων κατά των παθογόνων και μικροβίων (μυκήτων και βακτηρίων) προστατεύοντάς τα, επίσης, από προσβολές εντόμων και τη βρώση από τα ζώα (Jackson et al., 2008). Η συγκέντρωσή τους εξαρτάται, αφενός μεν από το ίδιο το φυτό (ποικιλία, γενετικό δυναμικό), αφετέρου δε από περιβαλλοντικούς παράγοντες και από τις εφαρμοζόμενες καλλιεργητικές συνήθειες (Boss et al., 1996).

Για την οινολογία, τα φαινολικά παράγωγα αποτελούν ένα ιδιαίτερα σημαντικό κεφάλαιο. Η προέλευσή τους στον οίνο οφείλεται στην εκχύλιση ή διάχυσή τους από τα στέμφυλα κατά την οινοποίηση ή στην εκχύλισή τους από το ξύλο των βαρελιών, ενώ μικρές ποσότητες μπορεί να σχηματιστούν από το μεταβολισμό των ζυμών (Jackson et al., 2008, 1994). Ωστόσο, η σημαντικότητά τους εντοπίζεται στο ότι αυτά καθορίζουν και εξευγενίζουν τους χαρακτήρες ποιότητας των οίνων και είναι οι αποκλειστικοί υπεύθυνοι όλων των διαφορών που υφίστανται μεταξύ λευκών και ερυθρών οίνων (Κουράκου, 1998). Επιπλέον, υπεισέρχονται στον αρωματικό χαρακτήρα των οίνων και ευθύνονται για τις μεταβολές (θετικές ή αρνητικές) στις οποίες υπόκειται ο οίνος κατά την παραγωγή, συντήρηση και παλαίωσή του (Bautista-Ortin et al., 2007, Κουράκου, 1998).

Τα φαινολικά παράγωγα, πέρα από «ρυθμιστές της οινικής ποιότητας» (Κουράκου, 1998), είναι και «ρυθμιστές της υγείας». Χρόνιες επιδημιολογικές μελέτες απέδειξαν ότι οι ενώσεις αυτές έχουν ευεργετική επίδραση στον ανθρώπινο οργανισμό. Τα συμπεράσματα των μελετών αυτών, τους απέδωσαν αντιοξειδωτικές, αντιμυκητιακές, αντιφλεγμονώδεις και θεραπευτικές ιδιότητες (Kinsella et al., 1993, Katalinic et al., 2004), οι οποίες σχετίζονται με την προστασία από καρκινογένεση, νεοπλασίες, γήρανση των κυττάρων, διαβήτη και παθήσεις του καρδιαγγειακού συστήματος (Lopez et al., 2001, Woraratphoka et al., 2007). Το «Γαλλικό Παράδοξο», κατά το οποίο οι Γάλλοι παρά τη μεγάλη κατανάλωση λιπαρών τροφών εμφανίζουν σε μικρό ποσοστό καρδιαγγειακά νοσήματα, αποδίδεται στην πολύ συχνή κατανάλωση ερυθρού οίνου, ο οποίος είναι πλούσιος σε φαινολικά συστατικά (Lopez et al., 2001, Kalithraka et al., 2005, Woraratphoka et al., 2007).

Αναλυτικότερα, η οινοποίηση είναι μια φυσική διεργασία που πραγματοποιείται εδώ και χιλιάδες χρόνια. Οινοποιώ σημαίνει μετατρέπω τα σταφύλια σε οίνο εφαρμόζοντας μια επιλεγμένη τεχνική (Βασιλοπούλου, Φ. κ.ά., 2008).

Τα συστατικά του οίνου μπορούν να διακριθούν σε τρεις μεγάλες κατηγορίες:

- Το ύδωρ
- Τα οργανικά συστατικά: οργανικά οξέα, αλκοόλες, αρωματικές ενώσεις, σάκχαρα - πολυσακχαρίτες, φαινολικές ενώσεις, αζωτούχες ενώσεις, ένζυμα, βιταμίνες
- Τα ανόργανα συστατικά: ανιόντα και κατιόντα.

Πιο συγκεκριμένα, η τέχνη της οινοποίησης μπορεί να οριστεί ως η διαδικασία αφαίρεσης-εκχύλισης όλων των ποιοτικών στοιχείων που εμπεριέχει το σταφύλι, αλλά όχι εκείνων των ουσιών που θα είχαν αρνητικό αποτέλεσμα στην ποιότητα του κρασιού (Βασιλοπούλου, Φ., Ταμπακοπούλου, Χ. κ.ά., 2008).

Η διαδικασία οινοποίησης μαζί με το σταφύλι ορίζουν από κοινού την τελική ποιότητα του προϊόντος. Από ένα εξαιρετικό σταφύλι ένας μέτριος παραγωγός θα δημιουργήσει ένα μέτριο κρασί. Από ένα μέτριο σταφύλι ένας εξαιρετικός οινολόγος μπορεί να δημιουργήσει καλό αλλά ποτέ μεγάλο κρασί (Ασημιάδης, Μ., 2002).

Το πρώτο στάδιο της ερυθρής οινοποίησης - όπως και της λευκής - είναι ο εκραγισμός που πραγματοποιείται στο εκραγιστήριο. Οι ράγες διαχωρίζονται από τα κοτσάνια τους και περνούν από τις οπές του κυλίνδρου, ενώ τα κοτσάνια βγαίνουν από το αντίθετο άκρο και απομακρύνονται.

Στη συνέχεια οι ράγες περνούν ανάμεσα από τους κυλίνδρους του θλιπτηρίου, οι οποίοι επίσης περιστρέφονται. Η ταχύτητα και η μεταξύ τους απόσταση ρυθμίζονται ανάλογα με την ποικιλία των σταφυλιών και το βαθμό ωριμότητάς τους. Έτσι ενώ σπάζουν οι φλοιοί αποφεύγεται το σπάσιμο των κουκουτσιών που θα πρόσθετε στυφή γεύση στον οίνο. Με την σύνθλιψη των ραγών, απελευθερώνεται ο χυμός τους και όλος ο σταφυλοπολτός που δημιουργείται μεταφέρεται με τη βοήθεια μιας αντλίας στις ανοξείδωτες δεξαμενές οινοποίησης.

Εκεί ακολουθεί η διαδικασία της οινοποίησης, η διαδικασία δηλαδή μετατροπής του φρέσκου χυμού σταφυλιών (γλεύκος) σε οίνο. Αυτή προκαλείται από τις ζύμες, μονοκύτταρους οργανισμούς που βρίσκονται στο φλοιό της σταφυλής και έχουν πλέον περάσει στο σταφυλοπολτό. Εναλλακτικά χρησιμοποιούνται επιλεγμένες ζύμες με τις οποίες εμβολιάζεται το γλεύκος, προκειμένου να υπάρχει καλύτερος έλεγχος της ζύμωσης και των επιθυμητών χαρακτηριστικών του κρασιού που θα παραχθεί (Ασημιάδης, 2002).

Αν δε γίνει προσθήκη ζυμών από τον παραγωγό η αλκοολική ζύμωση λέγεται φυσική, ενώ αλλιώς ελεγχόμενη. Η κυριότερη δουλειά των ζυμών είναι να μετατρέψουν το γλυκό χυμό του σταφυλιού και πιο συγκεκριμένα τα 41 σάκχαρα του, σε αλκοόλη. Ταυτόχρονα απελευθερώνεται διοξείδιο του άνθρακα που δημιουργεί φυσαλίδες. Αυτές ανεβάζουν τους φλοιούς στην επιφάνεια των δεξαμενών όπου σχηματίζουν πυκνό «καπέλο».

Οι ερυθρές χρωστικές ουσίες στις οποίες οφείλεται το χρώμα των ερυθρών οίνων βρίσκονται στο εσωτερικό των φλοιών του σταφυλιού. Μόνο η επαφή του χυμού με το φλοιό, στη σωστή θερμοκρασία και για συγκεκριμένο χρόνο, δίνει το ποθητό αποτέλεσμα του χρωματισμού του. Για το λόγο αυτό, παίρνεται ο χυμός από τον πυθμένα της δεξαμενής και ανακυκλώνεται από την κορυφή της. Με αυτόν τον τρόπο, ή και άλλους, διαβρέχονται τα στέμφυλα. Ρυθμίζοντας λοιπόν το χρόνο της εκχύλισης, παρέχεται το επιθυμητό χρώμα.

Στα ερυθρά κρασιά ο χρόνος εκχύλισης μπορεί να διαρκέσει από ελάχιστες μέρες έως και αρκετές εβδομάδες. Παρατηρείται ακόμη ότι κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης αυξάνεται η θερμοκρασία του γλεύκους. Αυτό συμβαίνει γιατί οι ζύμες παράγουν ενέργεια. Σκοπός είναι να διατηρηθεί η θερμοκρασία ζύμωσης στο όριο των 25,0 – 28,0°C που είναι ιδανική για την παραγωγή των ερυθρών οίνων, καθώς είναι επιτρεπτή η παραλαβή των συστατικών που διαφοροποιούν τη γεύση των κόκκινων κρασιών, διατηρώντας συγχρόνως τη φρεσκάδα των αρωμάτων τους. Έτσι είναι απαραίτητο να ψυχθούν οι δεξαμενές είτε με βρέξιμο κε κρύο νερό είτε με το να τοποθετηθούν στο εσωτερικό τους ψυκτικά στοιχεία.

Μόλις ο χυμός αποκτήσει το επιθυμητό χρώμα και γευστικό χαρακτήρα απομακρύνεται από τους φλοιούς και μεταφέρεται σε άλλη δεξαμενή (η πίεση των φλοιών στο πιεστήριο δίνει το λεγόμενο «κρασί πίεσης», που είναι κατά κανόνα χαμηλότερης ποιότητας, αν και κάποτε μέρος του χρησιμοποιούνταν για ανάμιξη με το κρασί πρώτης ποιότητας). Σε αυτό το σημείο τελειώνει η αλκοολική ζύμωση και ξεκινά η μηλογαλακτική. Η δεύτερη ονομάζεται ζύμωση, αν και προκαλείται από βακτήρια,

σε αντίθεση με την αλκοολική ζύμωση που πραγματοποιείται από τις ζυμομύκητες. Στη φάση αυτή, το μηλικό οξύ μετατρέπεται σε γαλακτικό, μια αλλαγή που «μαλακώνει» το κρασί, μειώνει δηλαδή τον άγουρο χαρακτήρα του και βοηθά στην ωρίμανσή του.

2.ΟΙ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ

Τα πολυφαινολικά συστατικά αποτελούν ένα από τα σημαντικότερα κεφάλαια της οινολογίας, καθώς παίζουν καθοριστικό ρόλο στην εξασφάλιση της ποιότητας των οίνων. Συμβάλλουν στη διαμόρφωση του χρώματος, καθορίζουν τους ιδιαίτερους γευστικούς χαρακτήρες, ενώ πολλά φαινολικά παράγωγα υπεισέρχονται και στους αρωματικούς χαρακτήρες. Επιπλέον, τα πολυφαινολικά συστατικά είναι οι κύριοι υπεύθυνοι για τις θετικές ή αρνητικές μεταβολές της οινικής ποιότητας κατά τις διάφορες φάσεις της παραγωγής, της ωρίμανσης, της συντήρησης και της παλαίωσης των οίνων (Κουράκου-Δραγώνα, 1998).

Εξ άλλου, στις πολυφαινολικές ενώσεις αποδίδεται η αποδεδειγμένη πια ευεργετική επίδραση του οίνου, ιδιαίτερα του ερυθρού οίνου, στον ανθρώπινο οργανισμό. Οι αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες των συστατικών αυτών είναι πρωταρχικής σημασίας για βιολογικές λειτουργίες, όπως προστασία από καρκινογένεση, νεοπλασίες, γήρανση κυττάρων και καρδιακές διαταραχές.

Ολοένα και αυξανόμενος είναι ο αριθμός των επιδημιολογικών μελετών που υποστηρίζουν ότι μια καθημερινή, μικρή, κατανάλωση κρασιού, από ένα μέχρι τρία ποτήρια την ημέρα, έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της θνησιμότητας, που οφείλεται σε παθήσεις της στεφανιαίας νόσου, κατά 20 - 60 % σε σχέση με αυτήν που παρατηρείται σε άτομα που δεν πίνουν. Το 'γαλλικό παράδοξο', κατά το οποίο οι Γάλλοι των νότιων κυρίως περιοχών της Γαλλίας ενώ καταναλώνουν τροφές πλούσιες σε λιπαρά, εντούτοις έχουν μικρό ποσοστό καρδιακών παθήσεων, και για το ίδιο επίπεδο παραγόντων κινδύνου, ο αριθμός των καρδιακών νοσημάτων είναι κατά 55% χαμηλότερο στη Γαλλία απ' ό,τι στις Η.Π.Α., αποδίδεται στην κατανάλωση ερυθρού οίνου.

Άλλες έρευνες με αντικείμενο την επίδραση του ερυθρού οίνου στην HDL (καλή χοληστερίνη) και την LDL (κακή χοληστερίνη), λιποπρωτεΐνες υψηλής και χαμηλής πυκνότητας αντίστοιχα, έδειξαν ότι αυξάνεται η HDL, αναστέλλεται η οξείδωση της LDL, καταλήγοντας σε μείωσή της στον ορό του αίματος, επιβραδύνεται η αθηρογένεση, ενώ παράλληλα ευνοείται η δραστηριότητα της βιταμίνης C και E. Λειτουργεί επίσης, ως δραστικός αναστολέας της συσσώρευσης αιμοπεταλίων στους μύες, διαμορφώνει συνθέσεις κατάλληλες να είναι προστατευτικές της στεφανιαίας νόσου και αναδεικνύει δυναμικές αντικαρκινικές ιδιότητες.

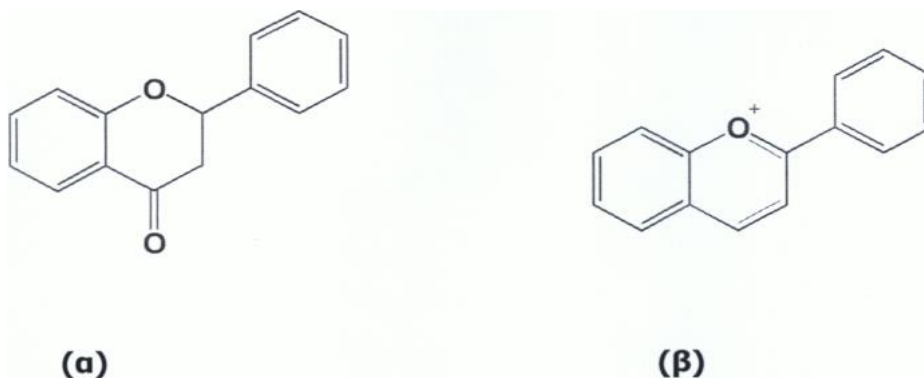
Είναι λογικό επομένως τα πολυφαινολικά συστατικά να αποτελούν αντικείμενο μελέτης όλο και περισσότερων ερευνητικών εργασιών, με στόχο την πιο ολοκληρωμένη αποσαφήνιση των χημικών δομών των πολυφαινολικών συστατικών και παραγών τους, της βιοσύνθεσής τους και των ιδιοτήτων τους αλλά και την παραγωγή οίνων καλύτερης ποιότητας.

Οι φαινολικές ενώσεις βρίσκονται στη σταφυλή και μάλιστα, όπως φαίνεται στο Σχήμα 1, το μεγαλύτερο ποσοστό αυτών βρίσκεται στους φλοιούς και στα γίγαρτα. Η παρουσία τους στον οίνο οφείλεται λόγω της εκχύλισης ή διάχυσής τους από τα στέμφυλα κατά την οινοποίηση ή λόγω της εκχύλισής τους από δρύινα βαρέλια. Πολύ μικρές ποσότητές τους τέλος σχηματίζονται κατά τον μεταβολισμό των ζυμών. Η εφαρμοζόμενη τεχνική οινοποίησης καθορίζει την εκχύλισή τους και τις μετέπειτα αντιδράσεις των εν λόγω μορίων, συνεισφέροντας έτσι με ουσιαστικό τρόπο στην πολυφαινολική σύσταση των οίνων.

Ο όρος φαινολικές ενώσεις περιλαμβάνει ένα μεγάλο αριθμό φυτικών συστατικών τα οποία έχουν στο μόριο τους έναν τουλάχιστον αρωματικό δακτύλιο υποκατεστημένο με ένα ή περισσότερα υδροξύλια. Ταξινομούνται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τις φλαβονοειδείς και τις μη φλαβονοειδείς φαινόλες. Οι πρώτες είναι ουσιαστικά οι πολυμοριακές φαινόλες που προέρχονται από την ίδια μητρική ένωση που είναι η φλαβόνη και διακρίνονται σε δύο μεγάλες ομάδες:

α) στα παράγωγα της φλαβόνης (κυρίως φλαβονοειδή)

β) στα παράγωγα του κατιόντος φλαβυλίου (ανθοκυάνες ή ανθοκυανίνες)



Σχήμα 1: Οι δομές της φλαβόνης (α) και του κατιόντος φλαβυλίου (β)

Οι μη φλαβονοειδείς φαινόλες είναι ουσιαστικά οι μονομοριακές φαινόλες, όπως το γαλλικό και το καφεϊκό οξύ. (Χαρβαλιά και Μπενά-Τζούρου, 1982, Κουράκου-Δραγώνα, 1998).

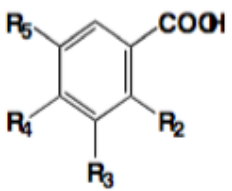
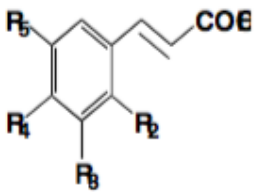
Ο όρος πολυφαινόλες περιλαμβάνει επίσης και τα παράγωγα των φαινολικών συστατικών (εστέρες, μεθυλεστέρες, γλυκοζίτες κ.ά.) που προκύπτουν με υποκατάσταση της βασικής τους δομής.

2.1. Μη φλαβονοειδείς φαινόλες

Η παρουσία τους στους οίνους οφείλεται είτε στο σταφύλι, όπου βρίσκονται στους φλοιούς και τη σάρκα, είτε στο ξύλο των βαρελιών, όπου γίνεται η παλαίωση. Οι ερυθρές ποικιλίες και οίνοι περιέχουν μεγαλύτερες ποσότητες σε σχέση με τις λευκές ποικιλίες και οίνους (Ribereau-Gayon, 2000).

Κύριοι εκπρόσωποι της κατηγορίας αυτής είναι τα φαινολοξέα, και ειδικότερα τα παράγωγα του βενζοϊκού και κινναμωμικού οξέος, των οποίων ένα ή περισσότερα υδρογόνα των ατόμων άνθρακα του δακτυλίου έχουν αντικατασταθεί με υδροξύλομαδες (-OH) και μεθόξυ (-OCH₃) ομάδες. Τα φαινολοξέα απαντούν στα χυμοτόπια των κυττάρων του φλοιού και της σάρκας των ραγών ως ετεροζίτες ή εστέρες. Μάλιστα είναι το κυριότερο φαινολικό συστατικό της σάρκας των ραγών (Κουράκου, 1998, Ribereau-Gayon, 2000).

Πίνακας 1: Τα κυριότερα φαινολοξέα των σταφυλών (Χαρβαλιά και Μπενά-Τζούρου, 1982)

Βασικό οξύ	Βασικός τύπος	Όνομασία φαινολοξέων	Θέση πρόσθετων ομάδων	
			-OH	-OCH ₃
Βενζοϊκό		Σαλικυλικό οξύ	2	
		π-υδροξυβενζοϊκό	4	
		Γαλλικό οξύ	3,4,5	
		Πρωτοκατεχινικό οξύ	3,4	
		Βανιλλικό οξύ	4	3
		Συριγγικό οξύ	4	3,5
		Γεντισικό οξύ	2,5	
Κινναμωμικό		π-κουμαρικό οξύ	4	
		Καφεϊκό οξύ	3,4	
		Χλωρογενικό οξύ	3,4	
		Φερουλικό οξύ	4	3

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η αντιβακτηριακή δράση που εμφανίζουν πολλά από τα φαινολοξέα. Λόγω των μικρών ποσοτήτων που απαντούν στις σταφυλές, δε θεωρείται ότι επεμβαίνουν στην οινοποιητική πρακτική, όμως συγκαταλέγονται στους παρεμποδιστές της ανάπτυξης των βακτηρίων και ερμηνεύουν μερικώς τη δυσκολία εκδήλωσης της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Αυτό συμβαίνει γιατί τα βακτήρια, έχοντας ενζυματικό μηχανισμό λιγότερο πλήρη σε σχέση με τις ζύμες, είναι αρκετά ευαίσθητα ακόμη και σε μικρές δόσεις αντισηπτικών και αντιβιοτικών (Κουράκου, 1998, Κοτσερίδης, 2005/β).

Στους οίνους, τα φαινολοξέα απαντούν με τις άνω μορφές, αλλά και ελεύθερα. Κατά την παλαίωση σε ξύλινα βαρέλια, οι ερυθροί οίνοι εμπλουτίζονται σε φαινολοξέα σε ποσότητες που ποικίλλουν ανάλογα με την προέλευση του ξύλου και το βαθμό αποξήρανσής του (Κουράκου, 1998). Η συγκέντρωσή τους στους ερυθρούς οίνους είναι της τάξης των 100-200 mg/l, ενώ στους λευκούς περί τα 10-20 mg/l (Ribereau-Gayon, 2000).

Τα φαινολοξέα, γενικότερα, δεν έχουν κάποια ιδιαίτερη γεύση και οσμή. Ωστόσο, μερικά εξ αυτών και τα παράγωγά τους έχουν μια ευχάριστη και χαρακτηριστική οσμή, ενώ στα βαλσαμικά αρώματα των ερυθρών οίνων παίρνουν

μέρος και το καφεϊκό και το φερουλικό οξύ (παράγωγα του κινναμωμικού οξέος). Επίσης, αποτελούν πρόδρομες ενώσεις πτητικών φαινολών που μπορεί να παραχθούν από τη δράση ζυμών και βακτηρίων (Κουράκου, 1998, Κοτσερίδης, 2005/β).

Στις ιδιότητες των φαινολοξέων ανήκει και η ευκολία με την οποία οξειδώνονται, κυρίως αυτά που έχουν δύο φαινολικά –OH σε ο-θέση (γαλλικό και καφεϊκό οξύ), και οδηγούν σε σχηματισμό ουσιών καστανόμαυρου χρώματος με δομή κιννόνης («καφέτιασμα οίνων»).

Στην κατηγορία των μη φλαβονοειδών φαινολών συγκαταλέγονται και τα στυλβένια. Πρόκειται για περισσότερο πολύπλοκες πολυφαινολικές ενώσεις με δύο βενζολικούς δακτυλίους, οι οποίοι συνδέονται με ένα αιθάνιο ή μια αιθυλενική αλυσίδα. Τα στυλβένια απαντούν στις σταφυλές, τους οίνους αλλά και στο ξύλο της δρυός των βαρελιών.

Το σπουδαιότερο από τα στυλβένια που απαντούν στη σταφυλή είναι η ρεσβερατρόλη (3,5,4-τρι-υδροξυ-στυλβένιο), η οποία υπάρχει στην *trans* μορφή της, καθώς και το παράγωγό της με τη γλυκόζη. Βρίσκεται μόνο στους φλοιούς της σταφυλής και η συγκέντρωσή της διαφέρει από ποικιλία σε ποικιλία. Έρευνες έδειξαν ότι η ρεσβερατρόλη εμπλέκεται σε μηχανισμούς άμυνας των σταφυλιών από την προσβολή τους από κρυπτογαμικές ασθένειες, όπως είναι ο *Botrytis cinerea*.

Ακριβώς επειδή εντοπίζεται μόνο στους φλοιούς, η ρεσβερατρόλη μπορεί να ανιχνευτεί μόνο σε ερυθρούς οίνους, στους οποίους εκχυλίζεται κατά τη διαδικασία της ερυθρής οινοποίησης. Η περιεκτικότητά της είναι της τάξης των 1-3 mg/l και εξαρτάται από την ποικιλία.

Η ρεσβερατρόλη είναι μια ουσία, στην οποία αποδίδεται πληθώρα ευεργετικών ιδιοτήτων για τον ανθρώπινο οργανισμό. Επιδημιολογικές έρευνες απέδειξαν τον προστατευτικό ρόλο της έναντι των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Επιπλέον, της αποδίδουν θεραπευτικό, αντικαρκινικό και αντιθρομβωτικό ρόλο συστήνοντας την κατανάλωση ερυθρού οίνου ως «ασπίδα προστασίας» για τον άνθρωπο (Ribereau-Gayon, 2000, Κοτσερίδης, 2005/β).

2.2. Φλαβονοειδείς φαινόλες

Τα φλαβονοειδή χαρακτηρίζονται από ένα βασικό σκελετό με 15 άτομα άνθρακα του τύπου της φλαβόνης. Στην κατηγορία αυτή των φαινολικών συστατικών των σταφυλών υπάγονται οι φλαβονόλες, οι φλαβανόνες, οι φλαβανονόλες, οι κατεχίνες, οι προκυανιδίνες, οι ανθοκυάνες και τα πολυμερισμένα τους παράγωγα, οι ταννίνες. (Χαρβαλιά και Μπένα-Τζούρου, 1982, Κοτσερίδης, 2005/β)

2.2.1. Φλαβονόλες

Οι φλαβονόλες ή 3-υδροξυ-φλαβόνες ή ανθοξανθίνες (λόγω του ανοιχτού κίτρινου χρώματος) απαντούν μόνο στους φλοιούς των ραγών (στις στιβάδες του υποδόρματος), τόσο των ερυθρών όσο και των λευκών σταφυλών, υπό μορφή γλυκοζιτών στη θέση 3 ή μονογλυκουρονοζιτών-3. Σχηματίζονται με την προσκόλληση στη θέση -3 του κεντρικού δακτυλίου (βενζοπυρόνη) ενός μορίου μονοζαχαρίτη (κυρίως γλυκόζης) ή ενός μορίου γλυκουρονικού οξέος. Αποτελούν τις κίτρινες χρωστικές των φυτών.(Κουράκου, 1998).

Στη σταφυλή βρέθηκαν οχτώ μονογλυκοζίτες και τρεις διγλυκοζίτες των φλαβονολών, οι οποίοι κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης υδρολύονται

εύκολα, με αποτέλεσμα σε οίνους να συναντώνται τα άγλυκα μέρη αυτών. Από τους μονογλυκουρονοζίτες-3 απαντά μόνο εκείνος της κερκετίνης. Οι μορφές των γλυκοζιτών απαντούν σε πολύ μεγαλύτερες ποσότητες, αλλά βρίσκονται και σημαντικές ποσότητες των εστέρων τους με το γλυκουρονικό οξύ. Τα άλλα σάκχαρα που απαντούν είναι η γαλακτόζη, η ξυλόζη και η αραβινόζη.

Τόσο οι λευκές όσο και οι ερυθρές ποικιλίες αμπέλου περιέχουν τις ίδιες ποσότητες φλαβονολών, διαφέρουν όμως στην ποιοτική τους σύσταση. Η περιεκτικότητα των φλαβονολών στις σταφυλές ποικίλει από 10-100 mg/Kg ραγών. Στους λευκούς οίνους λόγω της απουσίας φλοιών κατά την οινοποίηση, απαντούν στην ποσότητα των 1-3 mg/l ανάλογα με την ποικιλία της σταφυλής. Τα παράγωγα της κερκετίνης είναι πάντοτε κυρίαρχα, ενώ αυτά της μυρικετίνης και του γλυκοζίτη-3 της ισοραμεντόλης φαίνεται ότι απαντούν μόνο στις ερυθρές ποικιλίες (Ribereau - Gayon , 2000, Κοτσερίδης, 2005/β).

2.2.2. Φλαβονόνες

Οι φλαβανόνες διαφέρουν από τις φλαβονόλες κυρίως λόγω της απουσίας του δραστικού -OH στη θέση 3. Οι φλαβανόνες είναι ελάχιστα διαδεδομένες στη φύση και τα παράγωγά τους δεν είναι συστατικά των σταφυλών, αλλά ανήκουν στα φαινολικό συστατικά του ξύλου της δρυός. Επομένως, η παρουσία τους έχει διαπιστωθεί μόνο σε οίνους που παλαιώσαν σε δρύινα βαρέλια (Κουράκου, 1998).

2.2.3. Κατεχίνες

Το σύνολο των φυσικών ουσιών που έχουν τη δομή της 3-φλαβανόλης με δύο -OH στον πλευρικό πυρήνα, είναι γνωστές ως κατεχίνες. Οι ενώσεις αυτές έχουν δύο ασύμμετρα άτομα άνθρακα στις θέσεις 2 και 3 και επομένως παρουσιάζουν τέσσερις οπτικώς ισομερείς μορφές, την (+) και (-) κατεχίνη και την (+) και (-) επικατεχίνη. Όλες οι μορφές είναι γνωστές στη φύση, αλλά στις σταφυλές και στους οίνους απαντούν κυρίως η (+) κατεχίνη και η (-) επικατεχίνη.

Οι κατεχίνες απαντούν κυρίως στους φλοιούς και στα γίγαρτα των ραγών. Στους λευκούς οίνους η συγκέντρωσή τους κυμαίνεται μεταξύ 10-50 mg/L , ενώ στους ερυθρούς μπορεί να φθάσει 200 mg/L (Zoecklein et al. , 1995).

Η κατεχίνη είναι πολύ ευοξειδωτή ουσία και όταν θερμανθεί σε όξινο περιβάλλον πολυμερίζεται προς ενώσεις με χρώμα κίτρινο, το οποίο (ανάλογα με το βαθμό πολυμερισμού) προοδευτικά σκουραίνει και μπορεί να γίνει καστανόμαυρο. Η ιδιότητα αυτή εξηγεί το καφέτιασμα των οινών και για το λόγο για τον οποίο η παρουσία κατεχινών στους λευκούς οίνους είναι ανεπιθύμητη.

2.2.4. Προκυανιδίνες

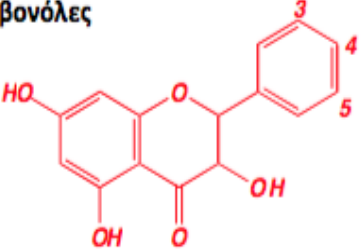
Από το 1910, ο Laborde επισήμανε την παρουσία άχρωων ουσιών στις σταφυλές και τους οίνους, οι οποίες μετατρέπονται σε ανθοκυάνες με θέρμανση σε όξινο περιβάλλον. Γι' αυτό και τις ονόμασε λευκοανθοκυόνες. Αργότερα, καθορίστηκε η δομή τους και αποδείχθηκε ότι πρόκειται για τις 3,4-φλαβανοδιόλες οι οποίες είναι αφυδρογονωμένες κατεχίνες. Επικράτησε για τις ουσίες αυτές ο όρος προκυανιδίνη, λόγω του σχηματισμού κυανιδίνης. Οι αφυδρογονώσεις μπορούν να συνεχισθούν με συνενώσεις περισσότερων μορίων προς σχηματισμό συμπυκνωμένων προκυανιδινών. Τα μόρια της κατεχίνης έχουν την τάση να ενώνονται μεταξύ τους ή με μόρια της επικατεχίνης προς διμερείς προκυανιδίνες, οι οποίες με τη σειρά τους ενώνονται προς μεγαλύτερα μόρια.

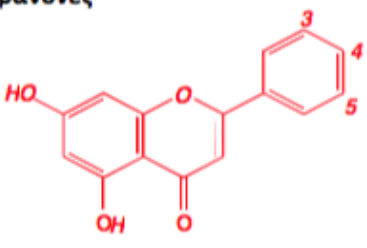
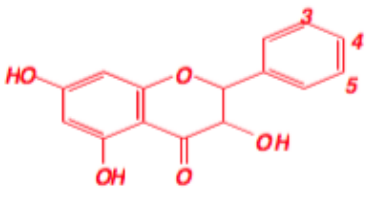
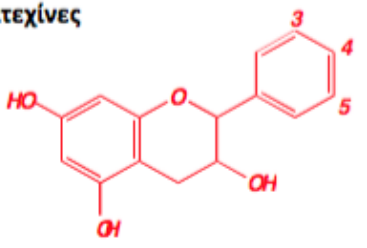
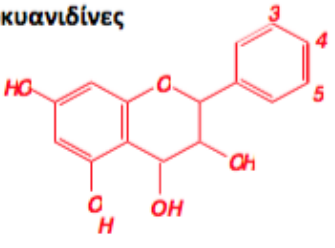
Οι ενώσεις αυτές απαντούν στους φλοιούς, κυρίως όμως στα γίγαρτα των ραγών. Κατά την ωρίμανση και παλαίωση των οίνων, οι προκυανιδίνες ενώνονται μεταξύ τους, καθώς και με άλλα μόρια, προς σχηματισμό πολυμερών μεγαλύτερου μοριακού βάρους (2000-3000), που αντιστοιχούν στις συμπυκνωμένες ταννίνες. Αντίθετα από τις ανθοκυάνες και φλαβονόλες, δεν έχουν τη μορφή γλυκοζιτών, μπορούν όμως να ενωθούν με πολυσακχαρίτες των σταφυλών και να εκχυλιστούν ως σύμπλοκα κατά την οινοποίηση.

Από έρευνες που έγιναν σχετικά με την παρουσία κατεχινών και προκυανιδινών σε σταφυλές διαπιστώθηκε ότι από όλα τα μέρη της σταφυλής, τα γίγαρτα είναι αυτά που περιέχουν τις περισσότερες κατεχίνες (Μ.Ο. 65%) και προκυανιδίνες (Μ.Ο. 56%). Οι βόστρυχοι και οι φλοιοί δεν παρουσιάζουν μεταξύ τους μεγάλες διαφορές από πλευράς μέσων όρων (περίπου 20% και για τις κατεχίνες και για τις προκυανιδίνες), ενώ ο χυμός είναι απαλλαγμένος αυτών των ουσιών. Επομένως, είναι φανερό ότι οι πρόδρομοι των συμπυκνωμένων ταννινών που διαμορφώνουν τη δομή και το 'σώμα' των ερυθρών οίνων και καθορίζουν την αντοχή τους στο χρόνο, βρίσκονται στα γίγαρτα (Κουράκου, 1998).

Άλλο ένα σημαντικό συμπέρασμα αυτής της έρευνας είναι πως οι κατεχίνες και οι προκυανιδίνες που απαντούν στα διάφορα μέρη της σταφυλής δεν έχουν την ίδια σύσταση. Έτσι, οι βόστρυχοι περιέχουν σχεδόν αποκλειστικά (+) κατεχίνη, και ενώ δεν είναι πλούσιοι σε προκυανιδίνες, επικρατούν οι ακυλωμένες προκυανιδίνες, που αντιπροσωπεύουν 50-74% των ολικών προκυανιδινών των βοστρύχων και είναι υπεύθυνες για τη στυφή γεύση τους. Στα γίγαρτα η (-) επικατεχίνη συναγωνίζεται σε μεγάλο βαθμό την (+) κατεχίνη και είναι το πλουσιότερο στερεό μέρος της σταφυλής σε προκυανιδίνες. Στους φλοιούς βρίσκεται σε υψηλό ποσοστό η (+) κατεχίνη, διμερείς προκυανιδίνες, καθώς και τριμερή και τετραμερή παράγωγά τους, που σε ορισμένες ποικιλίες αντιπροσωπεύουν υψηλό ποσοστό της ολικής περιεκτικότητας σε προκυανιδίνες.

Πίνακας 2: Οι κυριότερες φλαβονοειδείς φαινόλες των σταφυλών (Χαρβαλιά και Μπενά-Τζούρου, 1982)

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

Φλαβανόνες 	Ναριγγενίνη	4	
	Εσπερίτινη	3	4
Φλαβανονόλες 	Διυδροκαμφερόλη	4	
	Διυδροκερκετίνη	3, 4	
Κατεχίνες 	Κατεχίνη	3, 4	
	Γαλλοκατεχίνη	3, 4, 5	
Προκυανιδίνες 	Προκυανιδίνη	3, 4	
	Προδελφινιδίνη	3, 4, 5	
	Προμαλβιδίνη	4	3, 5
	Προπετουινιδίνη	4, 5	3

2.3. Ανθοκυάνες

Οι ανθοκυάνες αποτελούν ίσως τη σημαντικότερη κατηγορία των φαιολικών συστατικών της σταφυλής, καθώς είναι οι ερυθρές χρωστικές στις οποίες οφείλουν το πορφυρό, ερυθρό, πορτοκαλί, κυανό ή ιώδες χρώμα τους. Απαντούν μόνο στο φλοιό των ραγών των *vitisvinifera*, πλην των 'βαφικών ποικιλιών' στις οποίες βρίσκονται στη σάρκα των ραγών (π.χ. *Alicante bouschet*) ή ορισμένων ραγών σε στάδιο υπερωρίμανσης, λόγω γήρανσης κυττάρων και διάχυσης χρωστικών στη σάρκα. Είναι

επίσης παρούσες στα φύλλα, κυρίως κατά το τέλος της περιόδου ανάπτυξης, όπου και χρωματίζονται ερυθρά. Στις περισσότερες λευκές ποικιλίες, οι ανθοκυάνες απουσιάζουν τελείως (π.χ. Sauvignon blanc, Chardonnay), ενώ σε ορισμένες απαντούν σε ίχνη (π.χ. Pinot blanc, Ugni blanc) (Ribéreau- Gayon et al., 2000).

Από τον ποσοτικό προσδιορισμό των ολικών ανθοκυανών στους φλοιούς των πιο διαδεδομένων ελληνικών ερυθρών ποικιλιών, προέκυψε ότι αυτές κυμαίνονται από 100 mg μέχρι 1.500 mg/Kg ραγών.

Συγκεκριμένα, η σύνθεση και αποθήκευση των ανθοκυανών γίνεται κυρίως στα χυμοτόπια των κυττάρων της πρώτης υποδερμικής στιβάδας των φλοιών της ρόγας των ερυθρών σταφυλών. Οι επόμενες δύο υποδερμικές στιβάδες μπορεί να περιέχουν μικρά ποσά ανθοκυανών τα οποία τείνουν στο ελάχιστο έως την έκτη υποδερμική στιβάδα όπου σπάνια εμφανίζεται χρωματισμός. Οι ανθοκυάνες αρχίζουν να εμφανίζονται στο στάδιο του περκασμού. Τη στιγμή αυτή, οι πράσινοι καρποί χάνουν τη χλωροφύλλη και αρχίζουν να χρωματίζονται. Καθώς οι σταφυλές ωριμάζουν καταλαμβάνουν αυξανόμενο χώρο στο κυτόπλασμα. Η συγκέντρωση των ανθοκυανών παρουσιάζει μια θετική μεταβολή από το εξωτερικό προς το εσωτερικό μέρος της ράγας, καθώς τα γειτονικά κύτταρα της σάρκας είναι περισσότερο χρωματισμένα από αυτά της επιδερμίδας.

2.3.1 Η Χημική δομή των ανθοκυανών

Οι ανθοκυάνες είναι ετεροζίτες, των οποίων το άγλυκο μέρος είναι υδροξυλιωμένο και μεθυλιωμένο παράγωγο του φαινυλ-2-βενζοπυρυλίου και το σάκχαρο είναι πάντα αλδόζη, κυρίως, γλυκόζη (ενίοτε αραβινόζη, ραμνόζη, γαλακτόζη, ξυλόζη). Στα σταφύλια και στους οίνους απαντούν ανάλογα με την υποκατάσταση του πλευρικού δακτυλίου, πέντε είδη ανθοκυανών. Αυτά τα μόρια είναι πολύ πιο σταθερά υπό μορφή γλυκοζιτών (ανθοκυάνες) από ότι υπό μορφή άγλυκου (ανθοκυανιδίνες), ώστε τα τελευταία να μην απαντούν ελεύθερα στη φύση. Οι ανθοκυανιδίνες διαφέρουν μεταξύ τους μόνο ως προς τον αριθμό των -OH και -CH₃ που υπεισέρχονται στον πλευρικό δακτύλιο. Ο αριθμός αυτός επηρεάζει τόσο τη σταθερότητα της ανθοκυάνης όσο και το χρώμα της.

2.3.2. Η Χημική δομή των ανθοκυανιδίων

Από τις ανθοκυανιδίνες, η πιο διαδεδομένη στη φύση είναι η κυανιδίνη, παρ' όλο που είναι, όπως και η δελφινιδίνη, η πιο ασταθής, λόγω φαινολικών -OH σε ο-θέση. Η μαλβιδίνη επικρατεί σε ποσοστό που ανάλογα με την ποικιλία κυμαίνεται από 50% (Sangiovese) μέχρι και 90% (Grenache). Δικαιολογημένα λοιπόν θεωρείται η βάση του χρώματος των ερυθρών σταφυλιών και οίνων, και της έχει αποδοθεί από πολλούς ο χαρακτηρισμός οινίνη (Κουράκου, 1998)

Στις σταφυλές των ποικιλιών *Vinifera* βρίσκονται μόνο μονογλυκοζίτες των ανθοκυανιδίων,. Αντίθετα, σε είδη και ποικιλίες των διαφόρων γενών της βορειοαμερικανικής ηπείρου, όπως τα είδη *Vitis riparia* και *Vitis rupestris*, οι παραπάνω ενώσεις απαντούν ως διγλυκοζίτες. Η προσκόλληση του σακχάρου γίνεται στη θέση 3 του μορίου της ανθοκυανιδίνης ή για την περίπτωση των διγλυκοζιτών στις θέσεις 3 και 5 (Κουράκου- Δραγώνα, 1998, Σουφλερός, 2000/α). Η παρουσία των

διγλυκοζιτών σε οίνους αποκαλύπτει και την προέλευσή τους (ευρωπαϊκές ποικιλίες ή διάφορα υβρίδια). (Σταυρακάκης, 1999).

Πίνακας 3: Οι ανθοκυανιδίνες των σταφυλών (Χαρβαλιά και Μπενά-Τζούρου, 1982)

Βασικός τύπος		
Όνομασία	R ₁	R ₂
Κυανιδίνη	-OH	-H
Δελφινιδίνη	-OH	-OH
Παιονιδίνη	-OCH ₃	-H
Πετουνιδίνη	-OCH ₃	-OH
Μαλβιδίνη	-OCH ₃	-OCH ₃

2.3.3 Οι Χημικές ιδιότητες των ανθοκυανών

2.3.3.1 Αποχρωματισμός σε αναγωγικό περιβάλλον

Μια χημική ιδιότητα των ανθοκυανών αναφέρεται στον αποχρωματισμό τους όταν αυτές βρεθούν σε αναγωγικό περιβάλλον. Ο αποχρωματισμός των ελεύθερων ανθοκυανών είναι μόνιμος απουσία αέρα. Όμως η αντίδραση αυτή είναι αμφίδρομη και το χρώμα επανέρχεται περισσότερο ή λιγότερο πιο εύκολα, αναλόγως τις συνθήκες (Catsañeda et al., 2009).

Υφίσταται μια ισορροπία μεταξύ της ερυθρής μορφής του φλαβυλίου και μιας άχρωμης ψευδοβάσης (ΑΟΗ, ημιακετάλη) η οποία εξαρτάται από το pH. Εκτός από τη μορφή του φλαβυλίου και την μορφή της άχρωμης ψευδοβάσης, υπάρχουν άλλες δύο μορφές εντός των οίνων, η άνυδρη βάση υπό μορφή της κιννόνης (ΑΟ) χρώματος

κυανό και η χαλκόνη (C) που είναι άχρη ή ελαφρώς κίτρινη. Οι τέσσερις αυτές μορφές βρίσκονται σε ισορροπία η οποία εξαρτάται από το pH και επηρεάζεται από τη θερμοκρασία. Με τη μείωση του pH, η αντίδραση βαίνει προς την μορφή του ερυθρού φλαβυλίου (A^+) (Κουράκου, 1998, Wrolstad, 2004).

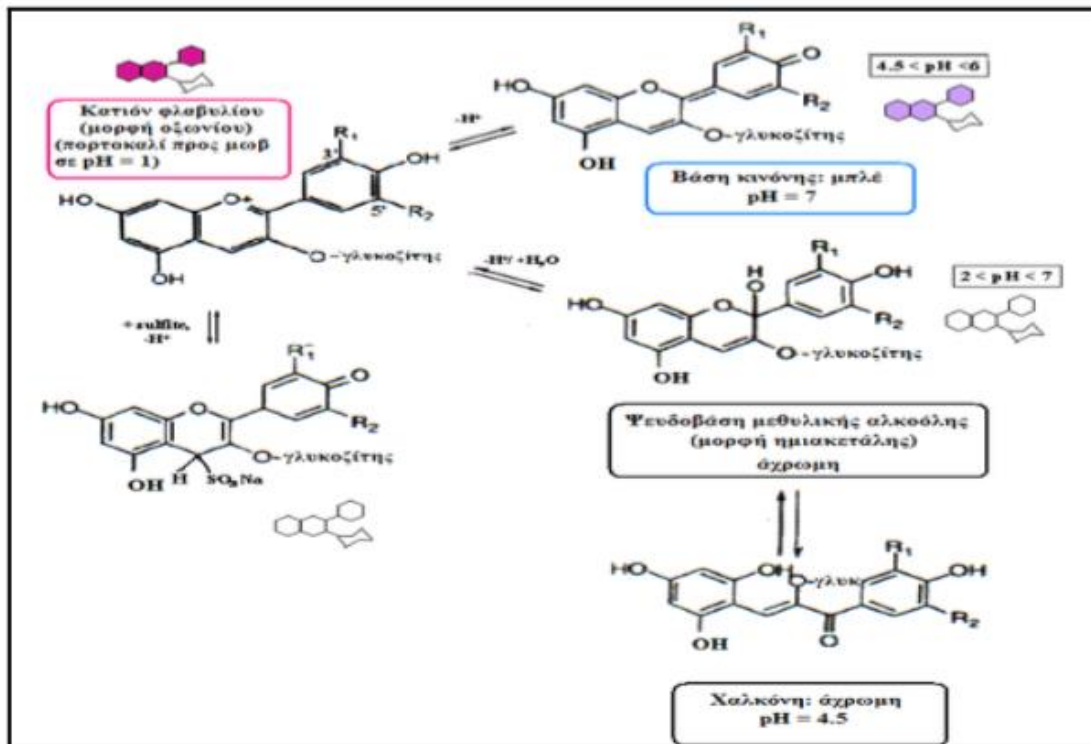
Στις τιμές του pH των οίνων, οι ανθοκυάνες απαντώνται κυρίως σε άχρωμες, υδροξυλιωμένες μορφές ημιακεταλών. Εν τούτοις, όταν διαλυθούν σε νερό, τα κατιόντα του φλαβυλίου υφίστανται μεταφορά πρωτονίων και αντιδράσεις υδροξυλίωσης, με αποτέλεσμα την δημιουργία κινονοειδών βάσεων και άχρωμων ημιακεταλών αντίστοιχως.

2.3.3.2 Αποχρωματισμός με θειώδη ανυδρίτη

Οι ανθοκυάνες αντιδρούν είτε ως ηλεκτρονιόφιλα είτε ως πυρηνόφιλα αντιδραστήρια. Για το λόγο αυτό, τα ιόντα του θειώδη ανυδρίτη αντιδρούν με το ηλεκτρονιόφιλο φλαβύλιο των ανθοκυανών προς το σχηματισμό άχρωμων μορφών, με αποτέλεσμα την μείωση του χρώματος των νέων οίνων.

Ο αποχρωματισμός αυτός μάλλον οφείλεται στο ότι το ανιόν SO_3H^- συνδέεται με τον ηλεκτρονιόφιλο άνθρακα της θέσης -2' του πυριλίου και σχηματίζεται η ένωση ανθοκυάνη- SO_3H η οποία είναι άχρωμη. Ο βαθμός αποχρωματισμού εξαρτάται από το pH, το ελεύθερο SO_2 και τη συγκέντρωση των ελεύθερων ανθοκυανών. Η παραπάνω αντίδραση είναι αμφίδρομη.

Εικόνα 1: Οι διάφορες μορφές των ανθοκυανών αναλόγως τις τιμές του pH και της επίδρασης του θειώδη ανυδρίτη (Wrolstad, 2004, Cheynier, 2008).



Το ασκορβικό οξύ επηρεάζει τη σταθερότητα των ανθοκυανών (μειώνει το χρώμα τους) ανάλογα με τον τύπο της ανθοκυάνης. Για παράδειγμα, στον 3,5-

διγλυκοζίτη της μαλβιδίνης μειώνεται λιγότερο το χρώμα του συγκριτικά με τον 3-μονογλυκοζίτη της μαλβιδίνης. Έτσι, ο βαθμός αποχρωματισμού εξαρτάται από την ικανότητα αντίδρασης των ανθοκυανών και από τον τύπο του μορίου που βρίσκεται.

2.3.3.3 Συμπυκνώσεις με μέταλλα

Οι ανθοκυάνες που έχουν $-OH$ σε ο-θέση του πλευρικού δακτυλίου σχηματίζουν σε όξινο περιβάλλον σύμπλοκα με μέταλλα (Κουράκου, 1998). Οι συμπλοκοποιήσεις αυτές ευνοούν τη σταθερότητα του χρώματος (Castañeda et al., 2009).

Σημαντικό ρόλο στο χρωματισμό παίζει και η παρουσία τρισθενούς σιδήρου και αλουμινίου. Σε αυτή την περίπτωση, οι ανθοκυάνες που έχουν στο πλευρικό τους δακτύλιο δύο $-OH$ σε θέση ορθό-θέση (όπως η κυανιδίνη, η δελφινιδίνη και η πετουνιδίνη) δίνουν σύμπλοκα χρώματος κυανού.

Όσο το pH είναι υψηλότερο, τόσο πιο εύκολα γίνεται η αντίδραση. Δύο τέτοιοι τύποι συμπλόκων σταθεροποιούν τη δομή των μορίων υπό τη μορφή του φλαβυλίου (A^+) ή τη μορφή της βάσης της κινόνης (AO), εμποδίζοντας το σχηματισμό της άχρωμης βάσης της καρβινόλης (AOH). Η ίδια ανθοκυανιδίνη λοιπόν μπορεί να είναι υπεύθυνη για περισσότερους χρωματισμούς ή αποχρώσεις στο φυτικό βασίλειο (Castañeda et al., 2009).

Η ιδιότητα αυτή φαίνεται να παίρνει μέρος και στο σιδηρικό θόλωμα των ερυθρών οίνων, το οποίο είναι αποτέλεσμα σχηματισμού αδιάλυτων συμπλόκων του σιδήρου με τις ανθοκυάνες και τις ταννίνες. Επίσης, βάσει αυτής της ιδιότητας, μπορεί να εξηγηθεί ίσως και η αύξηση του χρώματος των ερυθρών οίνων που ακολουθεί την οινοποίηση. Ο αερισμός που γίνεται στους οίνους σε αυτό το στάδιο, ευνοεί την οξειδωση του δισθενή σιδήρου σε τρισθενή και επομένως, το σχηματισμό συμπλόκων που είναι υπεύθυνα για τον εντονότερο χρωματισμό (Ribéreau-Gayon et al., 2000, Κοτσερίδης, 2005/β).

2.4. Ταννίνες

Το όνομά τους προέρχεται από την κελτική λέξη 'tan' που σημαίνει βελανιδιά, στα φύλλα της οποίας σχηματίζονται μεγάλες ποσότητες των ουσιών αυτών. Οι ταννίνες απαντούν σε διάφορα είδη φυτών.

Η σύνθεσή τους είναι εντονότερη μετά από κάποιο τραυματισμό του φυτικού ιστού, όπου καταστρέφονται τα κύτταρα και η υπάρχουσα διαμερισματοποίησή τους. Λόγω αυτής της καταστροφής, οι πολυφαινολικές οξειδάσες έρχονται σε επαφή με τα φαινολικά υποστρώματα όπως το γαλλικό οξύ, το χλωρογενικό οξύ, το καφεϊκό οξύ και τα φλαβονοειδή. Η οξειδωση των φαινολικών ενώσεων από τις πολυφαινολικές οξειδάσες παράγει κινόνες, οι οποίες πολυμερίζονται και σχηματίζουν ταννίνες. Οι τελευταίες θεωρούνται προστατευτικές ουσίες απέναντι στην προσβολή των φυτών από μικροοργανισμούς.

Οι ταννίνες απαντούν στα στερεά μέρη της σταφυλής. Στα γίγαρτα απαντούν σε ποσοστό μέχρι 65%, στους βοστρύχους μέχρι 22%, στους φλοιούς μέχρι 12% ενώ στη σάρκα σε ποσοστό μόλις 1%. Στις ταννίνες των σταφυλών γίνεται διαχωρισμός μεταξύ των ταννινών των γιγάρτων και του φλοιού. Στο φλοιό οι ταννίνες είτε εντοπίζονται στα χυμοτόπια, σχηματίζοντας πυκνά συμπλέγματα στα κύτταρα που είναι κοντά στην

επιδερμίδα, είτε είναι ισχυρά συνδεδεμένες με την πρωτεϊνο-φωσφολιπιδική μεμβράνη, είτε είναι ενωμένες με το κυτταρικό τοίχωμα. Στα γίγαρτα βρίσκονται στην εφυμενίδα και στον κερατοειδή ιστό του κελύφους και αποδεσμεύονται στο περιβάλλον μόνο όταν η επιδερμίδα γίνει διαλυτή (Κουράκου, 1998, Ribéreau-Gayon et al., 2000, Castañeda et al., 2009).

2.4.1 Η Χημική δομή των ταννινών

Από χημική άποψη, οι ταννίνες είναι μεγαλομόρια με φαινολικό δακτύλιο, που προκύπτουν από τον πολυμερισμό στοιχειωδών μορίων με φαινολική ομάδα. Είναι ουσίες ικανές να δώσουν σταθερές ενώσεις με πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες.

Για να δώσουν σταθερές ενώσεις με τις πρωτεΐνες πρέπει να είναι ογκώδεις, αλλά όχι υπερβολικά διότι στην περίπτωση αυτή ενδέχεται να μη μπορούν να ενωθούν με τις δραστικές θέσεις των πρωτεϊνών. Τα Μ.Β. των δραστικών ταννινών κυμαίνονται από 600 έως 3.500 (Ribéreau-Gayon et al., 2000, Κοτσερίδης, 2005/β).

Ανάλογα με τη φύση της βασικής μονάδας, οι ταννίνες διακρίνονται σε συμπυκνωμένες (ή ταννίνες της κατεχίνης) και σε υδρολυόμενες (ή ταννίνες του γαλλικού οξέος). Η μεγάλη διαφοροποίηση στη δομή των ενώσεων – διμερείς, τριμερείς, ολιγομερείς, συμπυκνωμένες – εξηγεί την παρουσία, στις σταφυλές των διαφόρων ποικιλιών και στους αντίστοιχους οίνους, ταννινών με διαφορετικές ιδιότητες, ιδίως γευστικές. Η θέρμανση των ταννινών σε όξινο περιβάλλον οδηγεί στο σχηματισμό κυρίως ερυθρής κυανιδίνης, αποδίδοντάς τους τον όρο προκυανιδίνες (Κοτσερίδης, 2005).

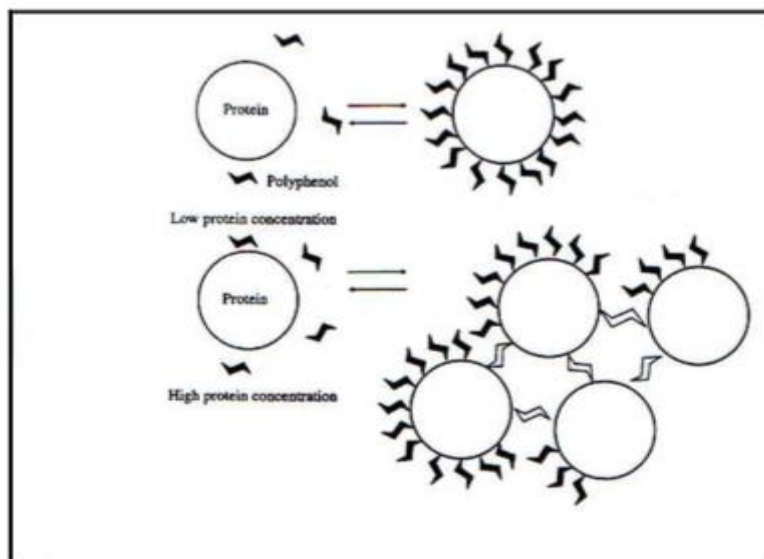
2.4.2 Οι Χημικές ιδιότητες των ταννινών

2.4.2.1 Αντιδράσεις των ταννινών με πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες

Οι πολυφαινόλες και ιδιαίτερα οι ταννίνες είναι ικανές να σχηματίζουν σταθερούς συνδυασμούς με πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες (Asano et al., 1982). Το μοντέλο αλληλεπιδράσεων μεταξύ ταννινών και πρωτεϊνών περιεγράφηκε από τον Haslam το 1981 και ισχύει ακόμη και σήμερα.

Σύμφωνα με το μοντέλο του Haslam, όταν υπάρχουν μικρές ποσότητες πρωτεϊνών, οι πολυφαινόλες τοποθετούνται γύρω από την επιφάνειά τους σε μια απλή στοιβάδα, μειώνοντας έτσι τον υδρόφιλό τους χαρακτήρα. Οι πρωτεΐνες ενώνονται μεταξύ τους και τελικά καταβυθίζονται. Όταν η συγκέντρωση των πρωτεϊνών αυξάνεται, τα φαινολικά συστατικά σκορπίζονται γύρω από την επιφάνειά τους λειτουργώντας ως 'γέφυρες' μεταξύ των διαφόρων μορίων. Η επιφανειακή υδροφοβική στοιβάδα τότε ξαναενώνεται προκαλώντας έτσι την καταβύθιση των πρωτεϊνών. Έτσι οι υπάρχουσες συγκεντρώσεις των ταννινών και των πρωτεϊνών επηρεάζουν το σχηματισμό και τη καταβύθιση των συμπλόκων ταννινών – πρωτεϊνών.

Εικόνα 2: Μοντέλο καταβύθισης των πρωτεϊνών από τις πολυφαινόλες. (Haslam, 1981).



Παράγοντες, όπως το pH και η θερμοκρασία επιδρούν στο σχηματισμό συμπλόκων ταννινών-πρωτεϊνών. Επιπλέον, ο τύπος και το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών φαίνεται να παίζουν ένα σπουδαίο ρόλο στο σχηματισμό των αδιάλυτων συμπλόκων. Οι πρωτεΐνες με υψηλή συγκέντρωση προλίνης έχουν μεγάλη επίδραση στη διαλυτοποίηση των ταννινών (Hagerman 1980, Butler 1980). Οι παράγοντες αυτοί είναι σημαντικοί για το κολλάρισμα των οίνων (Lagune, 1994) και εξηγούν τη σπουδαιότητα της σύνθεσης των πρωτεϊνών στο κολλάρισμα.

Οι προκυανιδίνες και οι πολυσακχαρίτες είναι συνδεδεμένοι στα κυτταρικά τοιχώματα των φλοιών (Amrani-Joutei, 1993) και συνιστούν έναν άλλο τύπο συμπλόκων, με έναν λιγότερο κατανοητό μηχανισμό. Οι πολυσακχαρίτες (πηκτίνες), με το α-D-γαλακτουρονικό οξύ ως τον κύριο μονοσακχαρίτη τους, και οι αραβινογαλακτάνες αντιδρούν ισχυρά. Στην περίπτωση των πρωτεϊνών, προωθούν το σχηματισμό συμπλόκων με ταννίνες οι οποίες αποτελούν έναν από τους παράγοντες οι οποίοι συντηρούν με διάρκεια ένα σταθερό αφρό στη μύρα και τις φυσαλίδες στους αφρώδεις οίνους (Siebert et al., 1996).

2.4.2.2 Αντιδράσεις οξείδωσης των προκυανιδινών

Το ευοξειδωτό της φαινολικής ομάδας είναι χαρακτηριστικό του συνόλου των φαινολικών παραγώγων. Η ιδιότητα αυτή προσδίδει έναν προστατευτικό ρόλο στα σταφύλια και τους ερυθρούς οίνους ενάντια στην οξείδωση. Η αντίδραση αυτή μπορεί να είναι είτε χημική είτε ενζυματική. Οι φαινολικές ουσίες της σταφυλής οξειδώνονται κυρίως από ένζυμα που εδράζονται στη σταφυλή, όπως η τυροσινάση, και από ένζυμα του *Botrytis cinerea*, όπως η λακκάση.

Οι φλαβανόλες, οι προκυανιδίνες, οι συμπυκνωμένες ταννίνες αντιδρούν λιγότερο ή περισσότερο εύκολα με τις ελεύθερες ρίζες, ανάλογα με τη σύνθεση των τμημάτων τους. Από τις αντιδράσεις αυτές, προκύπτουν καστανά πολυμερή με διάφορα σύμπλοκα τα οποία καταβυθίζονται.

Οι οξειδωτικοί μηχανισμοί οι οποίοι εμπλέκονται είναι ιδιαίτερα περίπλοκοι, ιδιαίτερα σε όξινο μέσο. Το φως, η θερμοκρασία, η παρουσία κάποιων μετάλλων και υπεροξειδίων, προωθούν το σχηματισμό οξειδώσιμων ριζών (Waters, 1964).

Το μοριακό οξυγόνο (O₂) έχει την εξής διπλή ιδιότητα:

είναι δυνατόν να απαντάται είτε ως υπεροξειδική ρίζα HO⁻ είτε ως υπεροξειδωμένο ανιόν O⁻, υπεύθυνο για τη δημιουργία ενός μεγάλου αριθμού οξειδώσιμων ελεύθερων ριζών. Ο σχηματισμός υπεροξειδίων μπορεί να προκαλέσει την οξειδωτική αποικοδόμηση των μεγαλομορίων (όπως των πρωτεϊνών, υδατανθράκων, ακόρεστων λιπαρών οξέων). Στο σημείο αυτό, επεμβαίνουν τα φαινολικά παράγωγα, τα οποία προηγούνται της οξείδωσης και συμβάλουν στον περιορισμό των ελεύθερων ριζών (Κουράκου, 1998, Ribéreau-Gayon et al., 2006, Eiro et al., 2002, Hermosin-Gutierrez, 2003).

Στους ερυθρούς οίνους, τα φαινόμενα αυτά εξαρτώνται από τη συγκέντρωση των φαινολών. Επίσης, η κινητική των οξειδωτικών αντιδράσεων είναι πιο αργή σε σχέση με όταν πραγματοποιούνται σε ένα ιδανικό μέσο, πιθανότατα εξαιτίας της παρουσίας άλλων περισσότερο εύκολα οξειδώσιμων συστατικών, τα οποία εμπλέκονται επίσης από την οξείδωση των προκυανιδινών (Ribereau-Gayon, 2000, Κουράκου, 1998).

2.4.2.3. Αντιδράσεις πολυμερισμού των προκυανιδινών

Τα όξινα διαλύματα διμερών, ολιγομερών και πολυμερισμένων προκυανιδινών είναι ασταθή.

Σε όξινο περιβάλλον, απουσία οξυγόνου, οι προκυανιδίνες έχουν την ικανότητα να σχηματίσουν ένα καρβοκατιόν το οποίο, εν συνεχεία, πιθανότατα να αντιδράσει με αρνητικές μονάδες άλλων προκυανιδινών και, εν τέλει, να αυξηθεί ο βαθμός πολυμερισμού. Όταν ένα διάλυμα προκυανιδίνης B₂ αποθηκευτεί, παράγει το τριμερές C₁, διάφορα πολυμερή και (-)-επικατεχίνη. Αντίθετα, διαλύματα (+)-κατεχίνης και (-)-επικατεχίνης είναι απόλυτα σταθερά στις ίδιες συνθήκες.

Το ότι οι αντιδράσεις αυτές εξαρτώνται από τη θερμοκρασία είναι ξεκάθαρο και επιβεβαιώνει το σχηματισμό του καρβοκατιόντος. Έτσι οι πολυμερισμένες προκυανιδίνες παράγονται από έναν C₄-C₈ ή C₄-C₆ 'οργανωμένο' πολυμερισμό. Ο τύπος αυτός πολυμερισμού σπάνια πραγματοποιείται στους ερυθρούς οίνους, καθώς η κατεχίνη είναι πάντα παρούσα. Στην περίπτωση που αυτή περιοριστεί, ξαναεμφανίζεται μετά από παλαίωση μερικών εβδομάδων.

Σε ένα ισχυρά οξειδωτικό μέσο, ο σχηματισμός των ελεύθερων ριζών συνοδεύεται από έναν οξειδωτικό πολυμερισμό. Με ελεγχόμενο αερισμό, η ταυτόχρονη οξείδωση των προκυανιδινών οδηγεί στο σχηματισμό αιθανάλης από αιθανόλη. Το μόριο αυτό είναι υπεύθυνο για την τροποποίηση της δομής της προκυανιδίνης. Η αντίδραση αυτή είναι πολύ πιο γρήγορη από τον πολυμερισμό και παράγει πολυμερή τα οποία είναι δυνατό να καταβυθιστούν, ανάλογα με τη συγκέντρωση και το βαθμό πολυμερισμού τους (Ribereau-Gayon, 2000, Κουράκου, Σ., 1998, Galvin, 1993).

2.5 Αντιδράσεις μεταξύ ανθοκυανών & ταννινών

Οι ανθοκυάνες δεν είναι σταθερά μόρια, οπότε η συγκέντρωσή τους στους οίνους μειώνεται κατά τους πρώτους μήνες παραμονής στο βαρέλι. Μετά από μερικά χρόνια εξαφανίζονται εντελώς, παρά το γεγονός ότι ο οίνος παραμένει ερυθρός. Αυτή η

μείωση οφείλεται σε αντιδράσεις που συμβαίνουν με άλλα συστατικά του οίνου, κυρίως ταννίνες, σε αντιδράσεις διάσπασης, αλλά και σε τροποποίηση της δομής τους. δημιουργία έγχρωμων ενώσεων ταννινών-ανθοκυανών που έχουν διαφορετικά χρώματα από τις ελεύθερες ανθοκυάνες και είναι αρκετά σταθερές στις μεταβολές του pH, της συγκέντρωσης του SO₂ και στο χρόνο, γεγονός που επιτρέπει στους ερυθρούς οίνους να διατηρήσουν το χρώμα τους κατά την αποθήκευση και την παλαίωση

Ο σχηματισμός των ενώσεων ταννινών-ανθοκυανών εξαρτάται από τις συνθήκες που επικρατούν (θερμοκρασία, οξειδωση), αλλά και από τη φύση και την ποσότητα των ανθοκυανών και των ταννινών που θα εκχυλιστούν κατά την οινοποίηση και από τη μεταξύ τους αναλογία. Συνεπώς το χρώμα των νέων ερυθρών οίνων εξαρτάται από την περιεκτικότητα των ραγών σε ανθοκυάνες, την ωριμότητα των γιγάρτων που εμπλουτίζουν το ζυμούμενο γλεύκος σε προκυανιδίνες και τη μέθοδο οινοποίησης που καθορίζει τις συνθήκες εκχύλισης. Το χρώμα κυμαίνεται από μωβ σε πορτοκαλί και είναι πιο έντονο στο pH του οίνου από αυτό των ελεύθερων ανθοκυανών. Η εξάρτησή του από το διοξείδιο του θείου είναι σχετικά μικρή (Κουράκου, 1998, Ribéreau-Gayon, et al., 2006, Eiro, et al., 2002, Hermosin-Gutierrez, 2003). Έτσι εξηγείται η αύξηση του χρώματος των νέων οίνων, παρά τη μείωση της συγκέντρωσης των ελεύθερων ανθοκυανών (Κουράκου, 1998, Κοτσερίδης, 2005).

2.5.1. Υδρολύμενες ταννίνες

Αποτελούνται από ένα μόριο σακχάρου, κυρίως γλυκόζης, ή ένα μόριο πολυσακχαρίτη, του οποίου πολλά –OH είναι εστεροποιημένα με διάφορα φαινολοξέα, εκ των οποίων σημαντικότερα είναι το γαλλικό, το διγαλλικό και το ελλαγικό (Κουράκου, 1998). Αναφέρονται συχνά και σαν γαλλοταννίνες ή ελλαγικές ταννίνες.

Τα μόρια αυτά είναι υδατοδιαλυτά και καθιζάνουν γρήγορα σε μέσα τα οποία περιέχουν αλκοόλη όπως είναι οι οίνοι και τα μπράντυ (Moutounet et al., 1989). Παίζουν ιδιαίτερο ρόλο στην παλαίωση των ερυθρών και λευκών οίνων σε δρύινα βαρέλια, εξαιτίας της οξειδωσιμότητάς τους (Vivas και Glories, 1993, 1996) και των ιδιοτήτων της γεύσης τους (Pocock et al., 1994). Οι υδρολύμενες ταννίνες δεν περιέχονται στις σταφυλές, αλλά μόνο στους οίνους. Είναι οι κύριες εμπορικές ταννίνες που νόμιμα αναγνωρίζονται για προσθήκη στους οίνους (Σουφλερός, 2000).

Οι ελάγιταννίνες στον οίνο προέρχονται είτε από τους ξύλινους περιέκτες είτε από την προσθήκη των οινολογικών ταννινών. Οι σημαντικότερες υδρολύμενες ταννίνες που υπάρχουν στο ξύλο της δρυός που χρησιμοποιείται για την κατασκευή βαρελιών είναι η βεσκαλαγίνη και η κασταλαγίνη, οι οποίες με μερική υδρόλυση δίνουν μικρότερα μόρια, τη βεσκαλίνη και την κασταλίνη. Η σύνθεση γενικά των ελλαγικών ταννινών που εκχυλίζονται από το ξύλο εξαρτάται από το είδος της βελανιδιάς. Στα είδη της ευρωπαϊκής βελανιδιάς υπάρχουν τέσσερα μονομερή και τέσσερα διμερή ελλαγικών ταννινών, ενώ στο αμερικάνικο είδος δεν ανιχνεύονται διμερή (Ribéreau-Gayon et al., 2000).

2.5.2. Συμπυκνωμένες ταννίνες

Η ομάδα των συμπυκνωμένων ταννινών είναι πολύ πιο διαδεδομένη στη φύση σε σύγκριση με τις υδρολύμενες ταννίνες (Κουράκου, 1998). Στην ομάδα αυτή

ανήκουν οι φυσικές ταννίνες των σταφυλών και απαντώνται σε όλα τα στερεά μέρη αυτών (Ribéreau-Gayon et al., 2000).

Οι συμπυκνωμένες ταννίνες προέρχονται από τον πολυμερισμό της 3-φλαβανόλης (κατεχίνης), αλλά και της 3,4-φλαβανοδιόλης (προκυανιδίνης). Τα μόρια αυτών των φλαβανοειδών φαινολών μπορεί να είναι ακυλιωμένα ή γλυκοζιλιωμένα. Αποτελούνται από περισσότερα από δέκα μόρια φλαβανολών με μοριακό βάρος μεγαλύτερο του 3000 (Ribéreau-Gayon et al., 2000). Οι ουσίες αυτές απαντώνται σε όλα τα στερεά μέρη των σταφυλών.

Οι ταννίνες των γιγάρτων είναι προκυανιδίνες με σχετικά μικρό βαθμό πολυμερισμού στο στάδιο του περκασμού, που αυξάνεται κατά την πορεία ωρίμανσης και είναι χαρακτηριστικές για την έντονη στυπτικότητα τους (Ribéreau-Gayon et al., 2000).

Οι ταννίνες των φλοιών έχουν πιο πολύπλοκη δομή συγκριτικά με τις ταννίνες των γιγάρτων. Εμφανίζουν μικρή μεταβολή του βαθμού πολυμερισμού τους, η οποία δε διαφέρει από αυτή των γιγάρτων (Cheynier, 2006). Είναι στην πλειονότητά τους διμερείς και τριμερείς προκυανιδίνες και κατά την πορεία ωρίμανσης βαθμιαία απενεργοποιούνται με πρωτεΐνες, χάνοντας την στυπτικότητα και επιθετικότητά τους. Βρέθηκαν επίσης, αξιοσημείωτες συγκεντρώσεις συμπλόκων ταννινών – πολυσακχαριτών και ταννινών – πρωτεϊνών που δίνουν την αίσθηση της στρογγυλότητας, ενώ ο συνδυασμός ανθοκυανών και ταννινών τους δίνει μια ιδιαίτερη πικράδα.

Οι ταννίνες του φλοιού, όπως αναφέρθηκε, παρουσιάζουν μεγαλύτερο βαθμό πολυμερισμού, καθώς αποτελούνται πάνω από 80 μονάδες, και εμπεριέχουν επιγαλλοκατεχίνες ενώ οι ταννίνες των γιγάρτων είναι λιγότερο πολυμερισμένες και γενικά υπολείπονται επιγαλλοκατεχινών. Από την άλλη, οι ταννίνες των γιγάρτων έχουν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις επικατεχίνης γαλλικού εστέρα (Cheynier, 2006).

Στο φλοιό υπάρχουν 3 τύποι ταννινών:

- Οι ταννίνες που βρίσκονται στο χυμοτόπιο, οι οποίες σχηματίζουν πυκνά συμπλέγματα εντός των κυττάρων που βρίσκονται κοντά στην επιδερμίδα. Η μεταβολή της συγκέντρωσης είναι αντίστροφη: τα εξωτερικά κύτταρα του φλοιού αποκαλούνται και τανικά κύτταρα.
- Οι ταννίνες που είναι ενωμένες πολύ ισχυρά στη πρωτεΐνοφωσφολιπιδική μεμβράνη (τονοπλάστη) και είναι ευαίσθητες στους υπέρηχους.
- Οι ταννίνες που είναι ενωμένες το κυτταρικό τοίχωμα κυτταρίνης - πηκτίνης (Ribereau-Gayon et al, 1998).

Η κατανομή των μορίων αυτών είναι συνυφασμένη με τις αντιμυκητολογικές ιδιότητες των ταννινών, καθώς οι ταννίνες έχουν την ικανότητα να σταματούν την ανάπτυξη του μυκηλίου των μυκήτων που δεν φέρουν το ένζυμο λακκάση το οποίο είναι το μόνο ένζυμο ικανό να σταματήσει τη δράση των ταννινών χωρίς να απεργοποιηθούν (Ribereau-Gayon et al, 1998).

Οι ταννίνες των βοστρύχων είναι πολυμερισμένες προκυανιδίνες με παρόμοια συμπεριφορά των ταννινών των γιγάρτων και παρόμοιας έντονης στυπτικότητας.

Στους οίνους εκχυλίζονται κατά τη διάρκεια της συμπαραμονής των στεμφύλων με το γλεύκος. Η περιεκτικότητα ενός ερυθρού οίνου σε ταννίνες εξαρτάται, πέρα από την ποικιλία, από τις συνθήκες της οινοποίησης και η συγκέντρωσή τους είναι της τάξης των 1-4 g/l. Αντίθετα, η περιεκτικότητα σε ταννίνες ενός λευκού οίνου επηρεάζεται από την ένταση της απολάσπωσης. Η συγκέντρωσή τους κυμαίνεται από

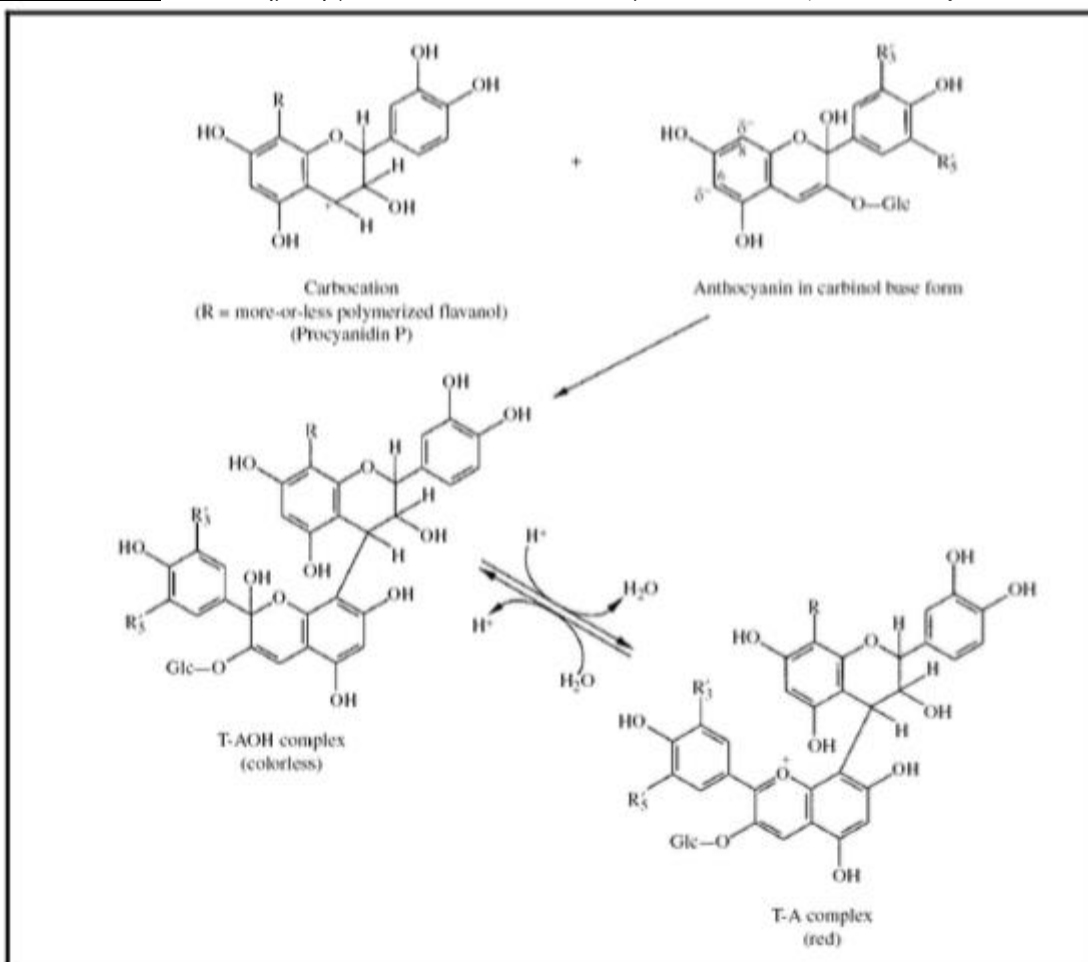
100 mg/l έως 200-300 mg/l σε μη απολασπώμενα γλεύκη (Ribéreau-Gayon et al., 2000, Κοτσερίδης, 2005).

Οι συμπυκνωμένες ταννίνες αποτελούν ουσιαστικά το 'σώμα' του οίνου. Αντιπροσωπεύουν το 30-60 % των ολικών φαινολικών παραγώγων και το ποσοστό τους αυξάνεται με την ηλικία του οίνου. Οι αλυσίδες τους σχηματίζουν ένα είδος σκελετού, στον οποίο προστίθενται και άλλα μόρια, όπως πολυσακχαρίτες, ανόργανα στοιχεία ή μόρια νερού (Κουράκου, 1998).

2.6. Οι μηχανισμοί των αντιδράσεων

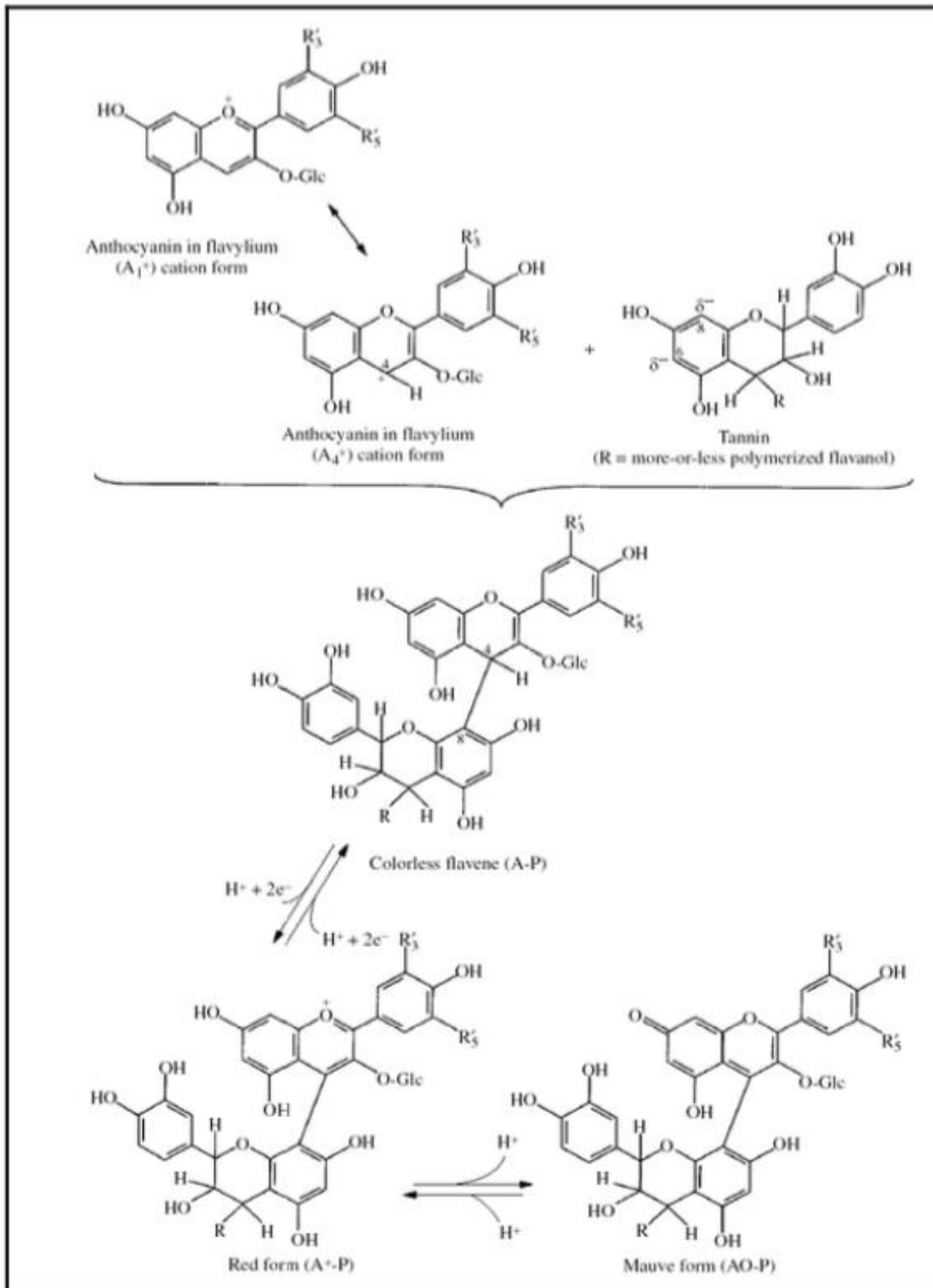
Εξαιτίας της ευαισθησίας που παρουσιάζουν οι ελεύθερες ανθοκυάνες στη μη αντιστρέψιμη υποβάθμιση, είναι σημαντικό ο πολυμερισμός μεταξύ ανθοκυανών και ταννινών να γίνει στα πρώτα στάδια της ωρίμανσης του οίνου. Κατά την εκχύλισή τους από τα σταφύλια, οι κατεχίνες και οι προκυανιδίνες είναι πολύ ευδιάλυτες και έτσι μπορούν να σχηματίσουν διαλυτά πολυμερή με τις ανθοκυάνες. Η αντίδραση αυτή οδηγεί στο σχηματισμό συμπλόκων (Jackson, R. S., 2008).

Οι περισσότερες, άχρωμες, ημιακεταλικές ανθοκυάνες δημιουργούν $T^+ \rightarrow A^-$ σύμπλοκα. Αυτά σχηματίζονται καθώς ο πυρηνόφιλος C8 (ή C6) της ανθοκυάνης, υπό τη μορφή της βάσης της καρβινόλης (AOH), ενώνεται με τον ηλεκτρονιόφιλο C4 μιας τελικής φλαβονοειδούς μονάδας μιας προκυανιδίνης ή μιας μικρής συμπυκνωμένης ταννίνης. Ο σχηματισμός καρβοκατιόντων από τις προκυανιδίνες ενισχύεται από τις υψηλές θερμοκρασίες και απαιτεί όξινο περιβάλλον (οίνος). Τα μόρια που σχηματίζονται είναι αρχικά άχρωμα, αλλά γρήγορα ακολουθεί αφυδάτωση και δημιουργούνται έγχρωμες κιτρινοπορτοκαλί ενώσεις. Για την αντίδραση σχηματισμού τους δεν απαιτείται αέρας, αφού δε χρειάζεται να γίνει οξειδωση, μάλιστα η διατήρηση του οίνου σε περιβάλλον χωρίς αέρα ευνοεί αυτόν τον τύπο της συμπύκνωσης. Τα πολυμερή που προκύπτουν μπορεί να έχουν μέχρι οχτώ φλαβονοειδείς υπομονάδες.



Αντίθετα, η κατοχή ηλεκτρονίου από τον C4 ενός ηλεκτρονιόφιλου φλαβυλίου (A^+) ανθοκυάνης και από τον αρνητικά φορτισμένο C8 ή C6 μιας νουκλεόφιλης φλαφανόλης-3 μιας προκυανιδίνης ή μιας κατεχίνης ή επικατεχίνης, δημιουργεί $A^+ \rightarrow T^-$ σύμπλοκα. Αρχικά σχηματίζεται ένα άχρωμο (ημιακεταλικό) σύμπλοκο (A-P), αλλά με επακόλουθη οξείδωση επανέρχεται η έγχρωμη κατάσταση του φλαβυλίου (A^+-P) και η AO-P, που βρίσκονται σε ισορροπία μεταξύ τους. Αυτό συμβαίνει κατά το διαχωρισμό του γλεύκους από τα στέμφυλα, λόγω αερισμού και έτσι ο νέος οίνος αποκτά χρώμα. Αν εξακολουθήσουν οι ανακατατάξεις, ενδέχεται να προκύψουν κιτρινοπορτοκαλί ξανθύλια. Η δομή του ξανθυλίου δημιουργείται από αφυδάτωση μεταξύ του της ανθοκυάνης και του C8 της φλαβανόλης με την οποία είναι ενωμένο. Έτσι σχηματίζεται ένας πυρανικός δακτύλιος μεταξύ των δύο μορίων (Κοτσερίδης, 2005, Salas et al., 2004, Jackson, 2008, Ribéreau-Gayon et al., 2006, Vidal et al., 2004, Castellari et al., 2000).

Εικόνα 4: Δημιουργία $A^+ \rightarrow T^-$ συμπλόκου (Ribéreau-Gayon 2006).



Οι φλαβανόλες-3 και τα πολυμερή τους, δηλαδή οι προκυανιδίνες, μπορούν επίσης να ενωθούν μεταξύ τους, προς σχηματισμό μεγάλων συμπυκνωμένων ταννινών, οι οποίες είναι πολύ πιο πολύπλοκες από τις ταννίνες που εκχυλίζονται από τα σταφύλια. Τα μεγάλα αυτά πολυμερή είναι λιγότερο επιρρεπή στη συμπύκνωση με ανθοκυάνες, σε σχέση με τις μικρότερες προκυανιδίνες και τις κατεχίνες. Οι παράγοντες που καθυστερούν τον πολυμερισμό των ανθοκυανών με φλαβονοειδείς ενώσεις, αυξάνουν την πιθανή οξείδωση και καστανώση των ανθοκυανών. Για

παράδειγμα η προσθήκη διοξειδίου του θείου οδηγεί σε δημιουργία θειοενώσεων των ανθοκυανών. Σε περίπτωση που οι ενώσεις αυτές δεσμεύσουν τον ίδιο άνθρακα που συνδέει τις ανθοκυάνες με τις φλαβονοειδείς ενώσεις, παρεμποδίζεται ο πολυμερισμός.

Όλα αυτά έχουν σαν αποτέλεσμα την καθυστέρηση και την παρεμπόδιση του πολυμερισμού, ο οποίος απωθεί το νερό, προστατεύοντας τις ανθοκυάνες από νουκλεόφιλες ενώσεις. Επιπλέον, ο πολυμερισμός τις προστατεύει και από τον αποχρωματισμό που προκαλεί το διοξείδιο του θείου (Jackson, 2008).

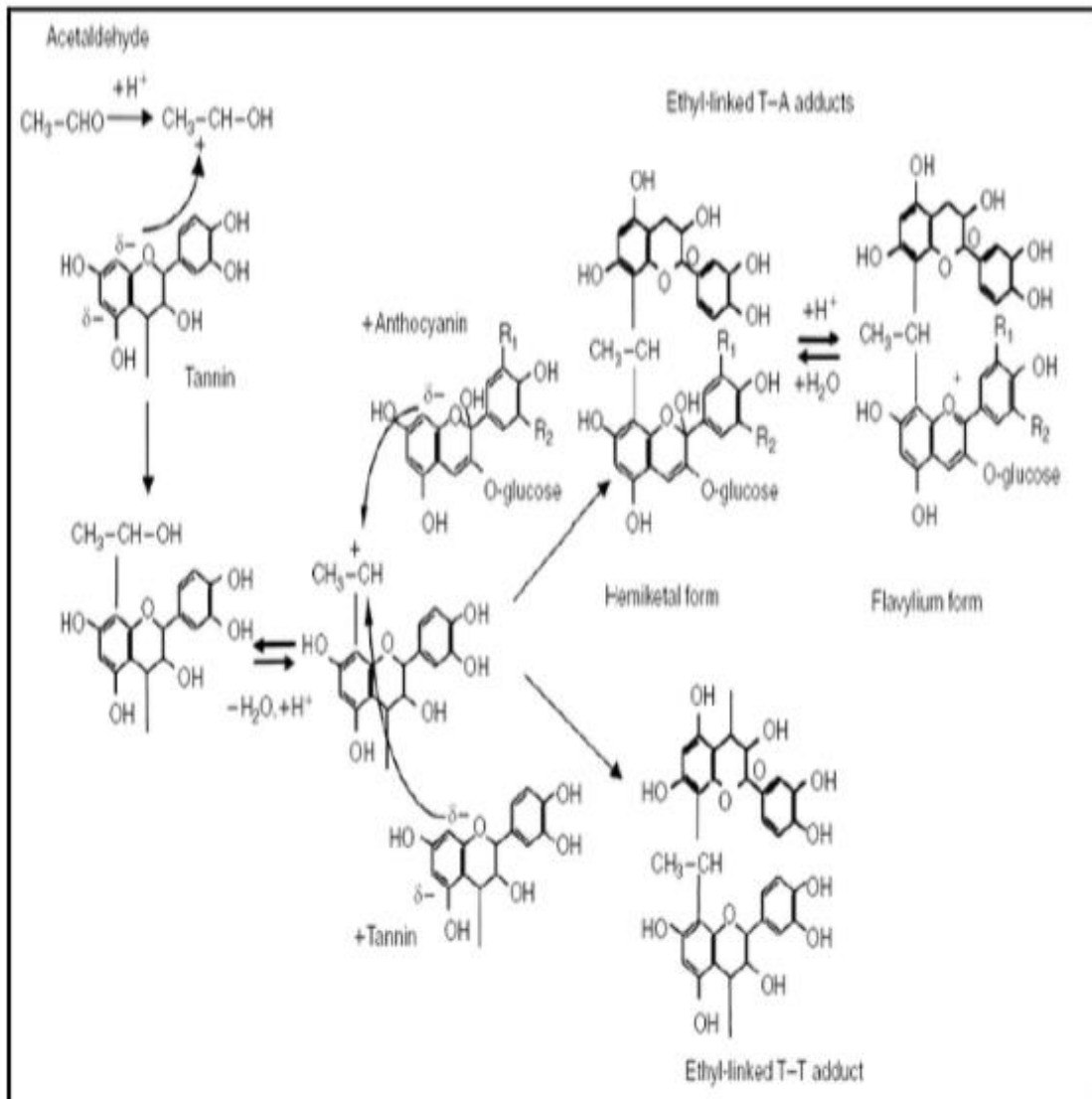
Οι αντιδράσεις συμπύκνωσης των ανθοκυανών με φλαβονοειδείς ενώσεις πραγματοποιείται αργά στον οίνο. Εκτός από τις άμεσες αντιδράσεις των ανθοκυανών με τις ταννίνες που περιγράφηκαν πιο πάνω, υπάρχουν και οι έμμεσες, μέσω της ακεταλδεΐδης, που παράγεται από την οξειδωση της αιθανόλης (Pissarra et al., 2004).

Σε χαμηλά pH η ακεταλδεΐδη σχηματίζει καρβοκατιόν, βρίσκεται δηλαδή σε κατάσταση που της επιτρέπει να αντιδράσει με τη νουκλεόφιλη (αρνητικά φορτισμένη) C8 του ακραίου τμήματος μιας προκυανιδίνης. Κατά την αφυδάτωση, η ακεταλδεΐδη μπορεί να σχηματίσει αιθυλικό σταυροδεσμό με τον C8 μιας ανθοκυάνης που βρίσκεται σε ημιακεταλική κατάσταση. Μια επόμενη αφυδάτωση μετατρέπει την άχρωμη ημιακετάλη σε ερυθρό φλαβύλιο ή σε βάση κινόνης που έχει βιολετί χρώμα, ενισχύοντας έτσι το χρώμα του οίνου. Η συμπύκνωση αυτή γίνεται κατά την ήπια οξείδωση των οίνων που πραγματοποιείται κατά την παλαίωση σε βαρέλι, οπότε σχηματίζονται μικρές ποσότητες ακεταλδεΐδης από την οξείδωση της αιθανόλης.

Παρόμοιες ενώσεις με ακεταλδεΐδη συμβαίνουν κατά τον πολυμερισμό φλαβανολών-3 μεταξύ τους, είτε μέσω παραπλήσιων νουκλεόφιλων C8, είτε μεταξύ του C8 μιας φλαβονοειδούς ένωσης και του νουκλεόφιλου C6 μιας άλλης. Ένας άλλος τρόπος σύνδεσης της ακεταλδεΐδης με ταννίνες και ανθοκυάνες εμπλέκει το νουκλεόφιλο τμήμα μιας φλαβανόλης-3 και του C4 ενός φλαβυλίου (θετικά φορτισμένου) ανθοκυάνης. Σύμφωνα μάλιστα με κάποιες έρευνες, άλλες αλδεΐδες μπορούν να συμπεριφερθούν σαν την ακεταλδεΐδη και να σχηματίσουν δεσμούς με ανθοκυάνες ή μεταξύ ανθοκυανών και φλαβανολών-3. Οι ενώσεις που προκύπτουν από την έμμεση ένωση ανθοκυανών-ταννινών μέσω της ακεταλδεΐδης έχουν μωβ χρώμα και διάφορες δομές (διμερείς, τριμερείς κ.α.) (Κοτσερίδης, 2006, Atanasova et al., 2002, Jackson et al., 2008, Ribéreau-Gayon et al., 2006).

Παρά το γεγονός ότι οι χαμηλές θερμοκρασίες που επικρατούν στα κελάρια καθυστερούν τους αιθυλικούς δεσμούς, οι αντιδράσεις ακεταλδεΐδης με ανθοκυάνες και κατεχίνες μπορεί να είναι ικανές να εμποδίσουν τον σχηματισμό πολύ μεγάλων έγχρωμων πολυμερών, τα οποία είναι πιθανό να καθιζήσουν και να προκληθεί απώλεια χρώματος.

Εικόνα 5: Δημιουργία συμπλόκου ταννίνης-ανθοκυάνης και ταννίνης-ταννίνης, μέσω ακεταλδεΐδης (Jackson,2008).

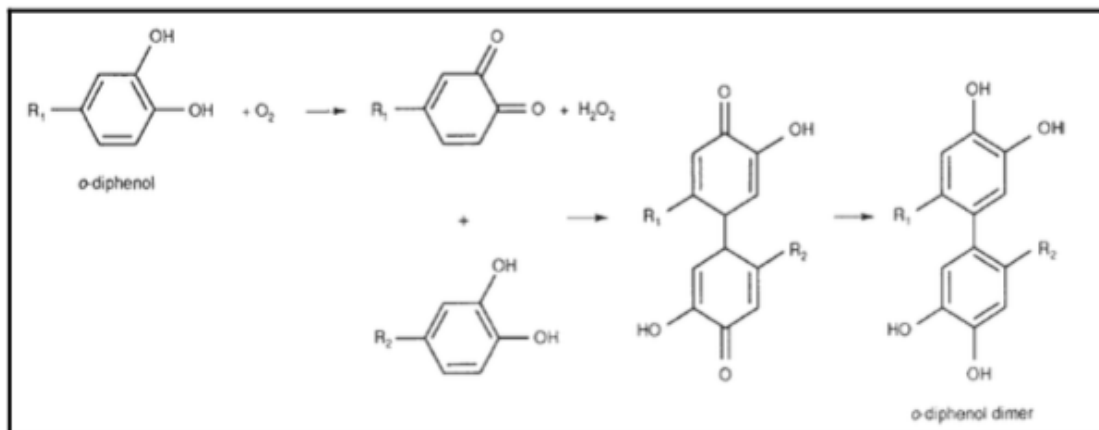


Η σημασία που έχουν οι ταννίνες του φλοιού και των γιγάρτων σε σχέση με τη σημασία των μικρότερων φλαβονολών-3, στο σχηματισμό των σταθερών συμπλόκων μεταξύ ανθοκυανών και ταννινών, δεν έχει αποσαφηνιστεί. Η ταχύτητα σχηματισμού έγχρωμων πολυμερών, αλλά και η φυσική τους ομοιότητα με τις ταννίνες, υποδεικνύει πως οι ταννίνες του σταφυλιού έχουν σημαντικό ρόλο, τουλάχιστον στους νέους οίνους.

Η πιο δραστική ανθοκυάνη για το σχηματισμό των πολυμερών είναι η μαλβιδίνη, που είναι και η πιο συνηθισμένη ανθοκυάνη των σταφυλιών. Η αντίδραση αυτή συμβαίνει πιο γρήγορα από ότι η συμπλοκοποίηση με φλαβανόλες-3, αλλά απαιτεί την αυτοοξειδωση των φαινολικών, παρουσία οξυγόνου. Αυτό εξηγεί την ενίσχυση του χρώματος και τη σταθεροποιητική επίδραση που έχει η έκθεση των νέων οίνων σε μικρές ποσότητες οξυγόνου. Κατά την αυτοοξειδωση της ο-διφαινόλης, που καταλύεται από ιόντα χαλκού ή σιδήρου, δημιουργείται υπεροξείδιο του υδρογόνου. Η ο-δικινόνη που σχηματίζεται μπορεί να αντιδράσει με την ο-διφαινόλη, προς σχηματισμό ενός διμερούς ο-διφαινόλης. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου που παράχθηκε κατά την αρχική αυτοοξειδωση, μπορεί να ενεργοποιήσει την οξείδωση της αιθανόλης σε ακεταλδεΐδη,

και πάλι παρουσία ιόντων χαλκού ή σιδήρου. Οι αντιδράσεις πολυμερισμού ανθοκυανών-ταννινών, που ενεργοποιούνται από την ακεταλδεΐδη, επίσης ενισχύουν το βιολετί χρώμα στους νέους οίνους. Η έκταση αυτής της αντίδρασης εξαρτάται από το οξυγόνο, την παρουσία διοξειδίου του θείου, και την ποσότητα και τα είδη των κατεχινών και των πολυμερών τους, των προκυανιδινών.

Εικόνα 6: Δημιουργία πολυμερών ο-διφαινόλης με αυτοοξειδωση που ακολουθεί την οξείδωση των απλών ο- διφαινόλων σε ο-δικινόνες (Jackson, R. S., 2008).



Ένας άλλος τρόπος ενίσχυσης του χρώματος, που σχετίζεται με την αυτοοξειδωτική δημιουργία του υπεροξειδίου, περιλαμβάνει την οξείδωση της γλυκερόλης, που είναι η δεύτερη ποσοτικά αλκοόλη του οίνου. Ο σχηματισμός γλυκεριναλδεΐδης και διυδροξυακετόνης, μπορεί να προάγει το σχηματισμό επιπλέον έγχρωμων ανθοκυανικών ενώσεων (Jackson, 2008).

Άλλος μηχανισμός που σχετίζεται με τη σταθεροποίηση του χρώματος και πραγματοποιείται νωρίς, είναι η άμεση αντίδραση της μαλβιδίνης με δευτερεύοντα προϊόντα των ζυμών, όπως η ακεταλδεΐδη, το πυροσταφυλικό οξύ και οι βυνιλφαινόλες. Οι ενώσεις αυτές λέγονται πυρανοανθοκυάνες. Δημιουργούν έναν επιπλέον πυρανικό δακτύλιο μεταξύ του C₄ και της υδροξυλομάδας του C₅ της ανθοκυάνης. Είναι πολύ σταθερές και ανθεκτικές στον αποχρωματισμό που προκαλεί το διοξείδιο του θείου και μπορούν να συνεισφέρουν δραστικά στη σταθερότητα του χρώματος. Με εξαίρεση κάποιες πορτισίνες που έχουν μπλε χρώμα, οι περισσότερες πυρανοανθοκυάνες είναι πορτοκαλοκίτρινες. Είναι λοιπόν πιθανό να συνεισφέρουν στον καφετί χρωματισμό που δημιουργείται κατά την παλαίωση (Jackson, 2008, Hakansson et al., 2003, Mateus et al., 2005, Monagas et al., 2006, Vivar- Quintana et al., 2002).

Στον οίνο πόρτο οι κύριες μονομερείς ανθοκυάνες που παραμένουν σε παλαιομένους οίνους είναι οι βιτιζίνες. Πρόκειται για προϊόντα αντίδρασης της μαλβιδίνης με το πυροσταφυλικό οξύ (βιτιζίνες Α), ή την ακεταλδεΐδη (βιτιζίνες Β). όπως και οι ανθοκυάνες, μπορούν να υποστούν αλκυλίωση. Συνήθως σχηματίζονται κατά τα πρώτα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης. Μπορούν επίσης να σχηματίσουν πολυμερή με ταννίνες (Jackson, 2008, Bakker et al., 1996). Οι πινοτικές σχηματίζονται μεταξύ ανθοκυανών και κινναμωμικού οξέος, όπως το καφεϊκό οξύ. Συσσωρεύονται μετά την αλκοολική ζύμωση. Οι πορτισίνες προέρχονται από την ένωση ανθοκυάνης με πυροσταφυλικό οξύ και φλαβανόλες, παρουσία ακεταλδεΐδης. Μετά το σχηματισμό τους κυκλοποιούνται και οξειδώνονται (Fulcrand et al., 1997, Jackson, 2008, Oliveira et al., 2005).

Οι ανθοκυάνες και οι φλαβανόλες-3 επίσης μπορούν να ενωθούν με το

γλυοξυλικό οξύ, προς παραγωγή ξανθυλίου που έχει χρώμα κιτρινοπορτοκαλί. Το γλυοξυλικό οξύ παράγεται από το τρυγικό οξύ με οξείδωση που καταλύεται από μεταλλοϊόν. Τα προϊόντα του ξανθυλίου μπορούν να ενωθούν με φλαβανόλες προς σχηματισμό πολύπλοκων ταννικών δομών. Τελικά το γλυοξυλικό οξύ μπορεί να συμπυκνωθεί με προϊόντα αποικοδόμησης ανθοκυανών και κατεχίνες, σχηματίζοντας προϊόντα με κίτρινο χρώμα (Jackson, 2008).

3. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ

Είναι σημαντικό για παραγωγή προϊόντων, σταφυλών και κυρίως οίνων, να καθορίζεται το φαινολικό δυναμικό των σταφυλών. Μια ώριμη, καλής ποιότητας σταφυλή χαρακτηρίζεται από φλοιούς πλούσιους σε ανθοκυάνες και ταννίνες με πολύπλοκη δομή και σχετικά ανενεργός με τα άλλα συστατικά, με μεγάλο βαθμό εκχυλισματικότητας, και από γιγάρτα με μικρό ποσοστό πολύ μερισμένων ταννινών που αντιδρούν ισχυρά με πρωτεΐνες.

Γενικά, η αναλογία των φαινολικών συστατικών της ρόγας και κατ' επέκταση του οίνου, εξαρτάται από την ποικιλία, το βαθμό ωριμότητας της σταφυλής, τις εδαφοκλιματικές συνθήκες, τις καλλιεργητικές τεχνικές, αλλά και την τεχνική οινοποίησης (Arozarena et al., 2000).

3.1. Καλλιεργούμενη ποικιλία

Κάθε ποικιλία, και συγκεκριμένα κάθε καλλιεργούμενος κλώνος, χαρακτηρίζεται από ένα ξεχωριστό πολυφαινολικό δυναμικό (Arozarena et al., 2000).

Σε γενικές γραμμές, οι ερυθρές ποικιλίες χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη συγκέντρωση φαινολικών συστατικών, σε σχέση με τις λευκές. Ωστόσο, και μεταξύ των ερυθρών ποικιλιών υπάρχει σαφής διαφοροποίηση ως προς το ανθοκυανικό τους προφίλ. Επί παραδείγματι, η ποικιλία Cabernet sauvignon έχει μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του 3-μονογλυκοζίτη της μαλβιδίνης συγκριτικά με την ποικιλία Tempranillo, ενώ η ποικιλία Tempranillo έχει μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των υπόλοιπων τεσσάρων μονογλυκοζιτών συγκριτικά με την ποικιλία Cabernet sauvignon (Revilla et al., 2001). Η ποικιλία Pinot noir φέρει μόνο τις πέντε κατηγορίες των μονογλυκοζιτών ενώ δεν απαντούν ακυλιωμένες ανθοκυάνες (Boss et al., 1996, Cheynier et al., 2006).

Κατά τους Boss et al. (1996) το ανθοκυανικό προφίλ των ερυθρών ποικιλιών είναι προκαθορισμένο γενετικά και η βιοσύνθεση των ανθοκυανών αντανακλά στην πολυπλοκότητα των γονιδιακών μονοπατιών. Επομένως, οι διαφορές στο ανθοκυανικό προφίλ που παρατηρούνται μεταξύ των ποικιλιών, οφείλονται στις παραλλαγές του μονοπατιού της βιοσύνθεσης (Boss et al. 1996, 2001, Pomar et al., 2005, Roggero et al., 2006).

Όσον αφορά τις φλαβονόλες, από ποικιλία σε ποικιλία διαφέρει η ποσοτική και η ποιοτική τους σύσταση (Andrade et al., 2001), για παράδειγμα η μυρικετίνη απαντά μόνο στις ερυθρές ποικιλίες.

Η συγκέντρωση επίσης, των κατεχινών και προκυανιδινών διαφέρει σημαντικά, με ιδιαίτερα πλούσιες τις ποικιλίες με μεγάλο ποσοστό γιγάρτων λόγω μικρών ραγών, όπως το Pinot noir ή με μεγάλο αριθμό γιγάρτων ανά ράγα σταφυλών, όπως το Ξινόμαυρο (Κουράκου, 1998). Επιπλέον, το ποσοστό και το είδος των πολυμερισμένων ταννινών και ο βαθμός πολυμερισμού διαφέρουν από ποικιλία σε ποικιλία και εξαρτώνται από αυτήν. (Ribéreau-Gayon et al., 2000).

3.2. Βαθμός ωριμότητας

Σημαντικό ρόλο στη φαινολική σύσταση παίζει και ο βαθμός ωριμότητας των σταφυλών. Αρχικά, λαμβάνει χώρα συσσώρευση φαινολικών συστατικών μέχρι ενός βαθμού ωριμότητας χαρακτηριστικού της κάθε ποικιλίας. Ακολουθεί μία περίοδος στασιμότητας και εν συνεχεία, αρχίζει να μειώνεται η περιεκτικότητα σε ανθοκυάνες, ενώ η ποσότητα των ολικών φαινολών ουσιαστικά δε μεταβάλλεται. Η συγκέντρωση των ταννινών του φλοιού ακολουθεί ίδια πορεία με αυτή των ανθοκυανών, αλλά ξεκινά από υψηλότερη συγκέντρωση στην περίοδο του περκασμού, ενώ την ίδια περίοδο, η συγκέντρωση των ταννινών των γιγάρτων φθάνει σε μέγιστη τιμή και εν συνεχεία μειώνεται φθάνοντας μια σταθερή τιμή (Χαρβαλιά και Μπενά-Τζούρου, 1982, Ribéreau-Gayon et al., 2000). Σε ώριμες σταφυλές επίσης, η συγκέντρωση των μη φλαβονοειδών φαινολών είναι πολύ μικρότερη απ' ότι σε άλλες.

Συγκεκριμένα για τις ταννίνες, ο βαθμός ωριμότητας των σταφυλών επηρεάζει σημαντικά και το βαθμό πολυμερισμού τους, που είναι υπεύθυνος για το σχηματισμό διαφόρων ενώσεων, τη διαφοροποίηση του χρώματος και τη στυφή τους γεύση. Καθώς η σταφυλή ωριμάζει ο βαθμός πολυμερισμού αυξάνεται. Για το λόγο αυτό οι άωρες σταφυλές είναι ιδιαίτερα στυφές σε σχέση με τις ώριμες (Σταυρακάκης, 1999).

Σταφυλές με μη καλή ωριμότητα, έχουν χαμηλή τιμή εκχυλισματικότητας ανθοκυανών και προκυανιδινών των φλοιών και υψηλή τιμή εκχυλισματικότητας προκυανιδινών των γιγάρτων. Έτσι, οίνοι από μη ώριμες σταφυλές είναι ιδιαίτερα στυφοί (Del Laudy et al., 2008). Από την άλλη, ο βαθμός ωριμότητας επηρεάζει σημαντικά και την ένταση του χρώματος του παραγόμενου οίνου και τις αποχρώσεις του (Pérez-Magariño and González-San José, 2006).

Επίσης, η υγιεινή κατάσταση των σταφυλών επηρεάζει σε πολύ μεγάλο βαθμό την περιεκτικότητα των οίνων σε ανθοκυάνες και ειδικότερα τη σταθερότητα του χρώματος. Είναι γνωστό ότι από σάπιες σταφυλές λαμβάνονται ερυθροί οίνοι, φτωχοί σε χρώμα και ολικές φαινόλες και χαρακτηρίζονται από έντονα καφέ απόχρωση (Χαρβαλιά και Μπενά-Τζούρου, 1982).

3.3. Κλιματικές συνθήκες

Η εξέλιξη της σύνθεσης των ανθοκυανών και των ταννινών των σταφυλών επηρεάζεται σε πολύ σημαντικό βαθμό από τις κλιματικές συνθήκες, όχι μόνο αυτές που διαμορφώνουν το μεσόκλιμα της περιοχής, αλλά κυρίως αυτές που καθορίζουν το μικροκλίμα του αμπελώνα της κάθε χρονιάς. Οι διαφορές μάλιστα, ανάμεσα σε δύο χρονιές για την ίδια ποικιλία, μπορεί να είναι μεγαλύτερες από τις διαφορές που παρουσιάζουν διαφορετικές ποικιλίες την ίδια χρονιά.

Οι κλιματικές συνθήκες φαίνεται να είναι ο κύριος παράγοντας που επηρεάζει την κατάσταση του φλοιού της ρόγας και επομένως το συντελεστή εκχυλισματικότητας ανθοκυανών των ραγών, που ουσιαστικά αντικατοπτρίζει την ικανότητα των ραγών να κατακρατούν τις ανθοκυάνες και να μην τις διαχέουν στο γλεύκος. Ο συντελεστής εκχυλισματικότητας των ανθοκυανών παρουσιάζει διαφορετικές τιμές από το ένα έτος στο άλλο για τους ίδιους αμπελώνες και λαμβάνει μεγαλύτερες τιμές όταν οι σταφυλές είναι φτωχότερες σε ανθοκυάνες (Κουράκου-Δραγώνα, 1998).

Οι παράμετροι του κλίματος που ενδιαφέρουν περισσότερο είναι η ηλιακή ακτινοβολία, η θερμοκρασία και η υγρασία, και είναι αυτές που συμβάλλουν στον καθορισμό των *millesimes* (χρονιές με εξαιρετική ποιότητα πρώτης ύλης). Αυτοί οι παράγοντες σε συνδυασμό με το έδαφος και το υψόμετρο στο οποίο βρίσκεται ο αμπελώνας καθορίζουν το μικροκλίμα του αμπελώνα και παίζουν σημαντικότατο ρόλο στην πορεία ωρίμανσης των ραγών και στη σύσταση των φαινολικών συστατικών τους (Koundouras et al., 2006).

3.4. Καλλιεργητικές τεχνικές

Οι καλλιεργητικές τεχνικές επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό, θετικά ή αρνητικά τη σύνθεση των φαινολικών συστατικών. Άλλωστε, το σχήμα μόρφωσης και το μέγεθος της φυλλικής επιφάνειας των πρέμων, καθώς και η κατεύθυνση και οι αποστάσεις των γραμμών φύτευσης επηρεάζουν σημαντικά την πρόσληψη της ηλιακής ακτινοβολίας από τον αμπελώνα.

Επίσης είναι γνωστό, πως η ποιότητα των ερυθρών σταφυλών συνδυάζεται με χαμηλές στρεμματικές αποδόσεις, πολύ περισσότερο σε σχέση με την αντίστοιχη των λευκών σταφυλών. Μεγάλες στρεμματικές αποδόσεις έχουν ως αποτέλεσμα, εκτός από τη μείωση των σακχάρων των σταφυλών και τη μείωση των κατεχινών και προκυανιδινών (Κουράκου- Δραγώνα, 1998). Έτσι, η αύξηση της απόδοσης και της ζωηρότητας έχει ως αποτέλεσμα η ωρίμανση να καθυστερεί και οι παραγόμενες σταφυλές να έχουν χαμηλότερη περιεκτικότητα σε ανθοκυάνες και ταννίνες (Σταυρακάκης 1999). Σημαντικό ρόλο επομένως στη φαινολική σύσταση παίζει το χειμωνιάτικο κλάδεμα, τα χλωρά κλαδέματα, η λίπανση, η άρδευση αλλά και η επιλογή του υποκειμένου και του συστήματος μόρφωσης.

3.5. Τεχνική οινοποίησης

Είναι λογικό διαφορετικές οινοποιήσεις της ίδιας ποικιλίας της ίδιας σοδειάς να επιφέρουν διαφορετικά αποτελέσματα ως προς τη σύσταση των φαινολικών συστατικών στο τελικό προϊόν. Εδώ άλλωστε, εισέρχεται και όλη η 'τέχνη' του οινολόγου, να μπορέσει να μετατρέψει μια κοινή ποικιλία σε έναν 'μεγάλο' οίνο.

3.6. Εδαφοκλιματικές συνθήκες

3.6.1 Έδαφος

Οι ποικιλίες του είδους *Vitis vinifera* έχουν την ικανότητα να προσαρμόζονται και να ευδοκιμούν σε μεγάλη ποικιλία εδαφών. Από τις φυσικές και χημικές ιδιότητες του εδάφους σημαντικότερες, για την άμπελο, θεωρούνται από τις μεν πρώτες η δομή και η σύσταση, το χρώμα, το βάθος, η διαπερατότητα, η διαθέσιμη υγρασία και η θερμοκρασία, ενώ από τις δεύτερες η αλατότητα, η αλκαλικότητα, το pH και η γονιμότητα (Σταυρακάκης, 1999).

Τα μητρικά πετρώματα και η ηλικία των πετρωμάτων προσδιορίζουν τη δομή και τη συγκέντρωση των θρεπτικών αποθεμάτων του εδάφους.

Εδάφη αργιλώδη και συνεκτικά, οδηγούν στην παραγωγή σταφυλών χαμηλής περιεκτικότητας σε σάκχαρα, υψηλής σε οργανικά οξέα και φαινολικά συστατικά. Τέτοια μηχανικής σύστασης εδάφη δίνουν χαμηλής ποιότητας σταφυλική παραγωγή.

Συμπεράσματα μελετών που αφορούσαν στη μεταβολή των ανθοκυανιδινών των ποικιλιών Merlot και Cabernet sauvignon, σε τρία διαφορετικά πετρώματα (ασβεστολιθικά, πετρώματα που εμπεριέχουν κελύφη οστράκων και μητρικά πετρώματα της Ιαπωνίας) έδειξαν ότι στα ασβεστολιθικά εδάφη οι συγκεντρώσεις των ολικών φαινολών, των ολικών ανθοκυανών και των ολικών ερυθρών χρωστικών των ραγών της ποικιλίας Cabernet sauvignon ήταν σημαντικά μεγαλύτερες από τα άλλα δύο πετρώματα ενώ δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην ποικιλία Merlot (Yokotsuka et al., 1999).

3.6.2. Υψόμετρο

Το υψόμετρο είναι ένας εξίσου σημαντικός παράγοντας και η επίδρασή του συσχετίζεται με τη θερμοκρασία και την υγρασία. Σε υψηλότερα υψόμετρα η θερμοκρασία και η υγρασία έχουν χαμηλότερες τιμές απ' ό,τι σε χαμηλά.

Στο στάδιο της ωρίμανσης των ραγών, το χαμηλό υψόμετρο επιδρά ευνοϊκά στη βιοσύνθεση μεγαλύτερων συγκεντρώσεων των μονομερών των κατεχινών που βρίσκονται στους φλοιούς. Η διαπίστωση αυτή προέκυψε από την ερευνητική εργασία των Mateus et al. (2001) σε σταφύλια των ποικιλιών Touriga Nacional και Touriga Francesca. Ωστόσο, οι ίδιοι ερευνητές (Mateus et al., 2002) παρατήρησαν ότι στις ίδιες ποικιλίες η συγκέντρωση των ανθοκυανών αυξανόταν με την αύξηση του υψόμετρου πράγμα αναμενόμενο αφού το υψόμετρο επηρεάζει άμεσα τις κλιματικές συνθήκες, οι οποίες επηρεάζουν την ωρίμανση των ραγών.

3.6.3. Ηλιακή ακτινοβολία

Η ηλιακή ακτινοβολία εμπλέκεται καθοριστικά σε όλα τα στάδια ανάπτυξης και ωρίμανσης των ραγών (Jackson D., 1993, Coombe, B., 1992).

Η επίδρασή της στη βιοσύνθεση των φαινολικών συστατικών σχετίζεται με το ένζυμο λυάση της αμμωνιακής φαινυλαλανίνης (PAL), το οποίο είναι ένα φωτοχημικά επαγωγικό ενζυμικό σύστημα που συνδέει τον πρωτογενή με το δευτερογενή μεταβολισμό (Jackson, 1993, Coombe, 1992). Εφαρμογή σκίασης κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης των ραγών προκαλεί αφενός μεν οψίμιση της ωρίμανσης, αφετέρου δε αναστολή της βιοσύνθεσης των φαινολικών συστατικών (Jackson, 1993, Coombe, 1992, Ribereau-Gayon et al, 1998).

Η συσσωρευση των ανθοκυανών επηρεάζεται από την ένταση της φωτοσυνθετικά ενεργής ακτινοβολίας. Η συγκέντρωση των ανθοκυανών είναι αυξημένη όταν οι ράγες ωριμάζουν υπό συνθήκες υψηλής έντασης φωτός. Επιπλέον, παρατηρείται αυξημένη συγκέντρωση μονοτερπενοειδών ενώσεων (Razungles et al, 1998, Pereira et al., 2006).

Πρέπει να τονιστεί ότι η ηλιακή ακτινοβολία επιδρά μεν στη συγκέντρωση των ανθοκυανών, δεν καθορίζει όμως το ποιές ανθοκυάνες θα σχηματιστούν και με ποιά αναλογία. Ωστόσο, δρα καταλυτικά στην έκφραση των γονιδίων, τα οποία είναι

υπεύθυνα για την έκφραση των ενζύμων που εμπλέκονται στους μηχανισμούς της βιοσύνθεσης.

3.6.4. Θερμοκρασία

Η θερμοκρασία επηρεάζει άμεσα τη βιοσύνθεση των φαινολικών συστατικών. Οι υψηλές θερμοκρασίες διεγείρουν τους μηχανισμούς των μεταβολικών αντιδράσεων, ενώ οι χαμηλές θερμοκρασίες τους αναστέλλουν (Mulins et al., 1992).

Όταν επικρατούν ιδιαίτερα υψηλές θερμοκρασίες κατά την περίοδο της ωρίμανσης, τότε παρεμποδίζεται ή μειώνεται η δράση των υπεύθυνων για τη βιοσύνθεση των ανθοκυανών ενζύμων. Αποτέλεσμα αυτού είναι ο ασθενής ή και ανύπαρκτος χρωματισμός των ραγών (Mulins et al., 1992, Hushim-Buckey et al., 2006).

Πέρα από τη βιοσύνθεση, η θερμοκρασία επηρεάζει και τη συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών στη ράγα. Η συγκέντρωση επηρεάζεται, επίσης, από τη διαφορά θερμοκρασίας μεταξύ ημέρας και νύχτας. Ακραίες θερμοκρασίες (άνω των 35 και κάτω των 15 °C) και μεγάλες διαφορές θερμοκρασιών ημέρας/νύχτας μειώνουν τη συγκέντρωση των ανθοκυανών (Jackson, 1993, Coombe, 1992, Ribereau- Gayon et al., 1998).

3.6.5 Υγρασία

Η άμπελος είναι ένα φυτό χωρίς ιδιαίτερες απαιτήσεις σε υγρασία. Παρ' όλ' αυτά, η ετήσια κατανομή και το ύψος των βροχοπτώσεων επιδρά σημαντικά στην ποιότητα και το μέγεθος της παραγωγής. Οι πλέον ποιοτικοί οίνοι παράγονται σε περιοχές με ετήσιο μέγεθος βροχοπτώσεων 700-800 mm (Jackson et al., 1993).

Η υπερβολική ή η ανεπαρκής υγρασία επηρεάζει αρνητικά την ωρίμανση και την ποιότητα των σταφυλών (Van Leeuwen et al., 2003). Σε περιοχές με πολλές βροχοπτώσεις παρουσιάζεται καθυστέρηση στην πορεία ωρίμανσης των ραγών, έστω και αν οι θερμοκρασίες που επικρατούν είναι ευνοϊκές, ενώ ο κίνδυνος ανάπτυξης ασθενειών είναι ιδιαίτερα μεγάλος (Jackson et al., 1993).

4. Η ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ ΦΑΙΝΟΛΩΝ

Ο μηχανισμός σχηματισμού των φλαβονοειδών φαινολών είναι ίδιος για όλα τα μόρια των φλαβονοειδών φαινολών, και υπάρχει μια κοινή ενδιάμεση ένωση.

Η ένωση αυτή είναι μία χαλκόνη, η οποία κυκλοποιείται με τη βοήθεια του ενζύμου ισομεράση της χαλκόνης προς μια φλαβανόνη από την οποία σχηματίζονται οι διάφορες φλαβόνες, φλαβονόνες, ισοφλαβόνες και ανθοκυάνες. Κατά τον σχηματισμό, λαμβάνουν χώρα αντιδράσεις υδροξυλίωσης, μεθυλίωσης, εστεροποίησης με σάκχαρα και ακυλίωσης του σακχαρικού μορίου και καταλύονται από εξειδικευμένα ένζυμα (Κουράκου, 1998)

Στο μηχανισμό της βιοσύνθεσης συμμετέχουν 7 ένζυμα, τα οποία είναι: η λύαση της αμμωνιακής φαινυλαλανίνης (PAL), η συνθετάση της χαλκόνης (CHS), η ισομεράση της χαλκόνης (CHI), η υδροξυλάση της 3-φλαβανόνης (F3H), η αναγωγή της 4-διυδροφλαβονόλης (DFR), διοξυγενάση της λευκοανθοκυανιδίνης (LDOX) και η 3-ο-γλυκοσυλ-τρανσφεράση της φλαβονοϊκής UDP-γλυκόζης (UFGT) (Boss et al., 1996).

Αναλυτικότερα, η βιοσύνθεση των φαινολικών συστατικών γίνεται μέσω του μονοπατιού του σικιμικού οξέος. Βέβαια, υπάρχει και το μονοπάτι του μαλονικού οξέος, αλλά απαντάται σπάνια στους φυτικούς οργανισμούς. Η σημασία του μονοπατιού του σικιμικού οξέος δεν έγκειται μόνο στο σχηματισμό των φαινολικών παραγώγων, αλλά κυρίως στο ότι μέσω αυτού προμηθεύεται ο αρωματικός δακτύλιος για το σχηματισμό των αρωματικών αμινοξέων της φαινυλαλανίνης, της τυροσίνης και της τρυπτοφάνης. (Adams, 2006).

Το σικιμικό μονοπάτι ξεκινάει με τη 4-P-ερυθρόζη και το φωσφοενολοπυροσταφυλικό οξύ (PEP). Από την ένωση των δύο αυτών ουσιών προκύπτουν διάφορες ενώσεις, οι οποίες τελικά θα δώσουν τα αρωματικά αμινοξέα τα οποία με τη σειρά τους θα δώσουν τις πρόδρομες ουσίες για την παραγωγή των φαινολικών ενώσεων.

Η βιοσύνθεση των φαινολικών οξέων χωρίζεται σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο σχηματίζονται οι πρόδρομες ενώσεις του φαινυλπροπανοϊκού μεταβολισμού. Σημαντικό ρόλο στο μεταβολικό αυτό μονοπάτι έχει το ένζυμο λύαση της αμμωνιακής φαινυλαλανίνης (PAL) το οποίο επιτρέπει το σχηματισμό της φαινυλαλανίνης και οδηγεί στο σχηματισμό φαινολικών συστατικών, αφού πρώτα μετατραπεί σε κινναμωνικό οξύ.

Στη συνέχεια, σχηματίζεται το π-κουμαρικό οξύ και τέλος το π-κουμαρύλ-CoA, μέσω της δράσης τριών ενζύμων: της αμμωνιακής λύασης της φαινυλαλανίνης (PAL), της υδροξυλάση του 4-κινναμωνικού εστέρα (C4H) και την λιγκάση (ή συνθετάση) του 4-κουμαρυλ-CoA (4CL). Το π-κουμαρυλ-CoA αποτελεί πρόδρομη ένωση για το σχηματισμό των φλαβονοειδών. Κατά τη διαδικασία αυτή παράγονται και άλλα συστατικά τα οποία συσσωρεύονται ως διαλυτά στερεά εντός των κυττάρων του φλοιού των φρούτων. (Delgado-Vargas, 2000, Adams, 2006).

Στο δεύτερο στάδιο του μονοπατιού, η συνθετάση της χαλκόνης (CHS), η οποία θεωρείται το ένζυμο κλειδί της βιοσύνθεσης των φλαβονοειδών, καταλύει την αντίδραση συμπύκνωσης 3 μορίων μαλονυλ-CoA με το 4-κουμαρυλ-CoA, σχηματίζοντας την χαλκόνη. Η χαλκόνη με την σειρά της ισομερίζεται σε ναρινγκενίνη με την δράση του ενζύμου ισομεράση της χαλκόνης (CHI). Η ναρινγκενίνη, πρόδρομη ένωση των φλαβονοειδών και των ισοφλαβονοειδών συστατικών, μετατρέπεται σε διυδροξυκαμφορόλη, με τη συμμετοχή μιας διοξυγενάσης, την υδροξυλάση της 3-φλαβανόνης (F3H). Το ένζυμο αναγωγή της 4-διυδροξυφλαβονόλης (DFR) καταλύει την μετατροπή της διυδροξυκαμφορόλης σε λευκοανθοκυανιδίνη, η οποία με την σειρά

της δίνει τις έγχρωμες ανθοκυανιδίνες. Η μετατροπή καταλύεται από το ένζυμο συνθετάση των ανθοκυανιδινών (ANS) και περιλαμβάνει μια οξείδωση και μια αντίδραση αφυδάτωσης. Στη συνέχεια, οι προανθοκυανιδίνες μετασχηματίζονται σε ταννίνες και οι ανθοκυανιδίνες σε ανθοκυάνες, μέσω μια αντίδραση γλυκοσυλίωσης, η οποία καταλύεται από το ένζυμο 3-ο-γλυκοσυλ-τρανσφεράση της φλαβονοϊκής UDP-γλυκόζης (UFGT) (Boss et al., 1996, Delgado-Vargas, 2000).

4.1.Η βιοσύνθεση των ανθοκυανών

Η βιοσύνθεση των ανθοκυανών εμφανίζει την εξής ιδιαιτερότητα σε σχέση με τις άλλες φλαβονοειδείς φαινόλες: προηγείται η εστεροποίηση με το σάκχαρο η οποία οδηγεί στην σταθεροποίηση του ασταθούς ανθοκυανιδικού μορίου. Αντίθετα, στις άλλες φλαβονοειδείς φαινόλες τα άγλυκα τμήματα είναι τα μόνα υποστρώματα δράσης των ενζύμων που καταλύουν τις υδροξυλίωσεις και τις μεθοξυλίωσεις ενώ η εστεροποίηση με το σάκχαρο και η ακυλίωση αυτού είναι τα τελευταία στάδια της βιοσύνθεσής τους.

Τα ένζυμα που συμμετέχουν στην βιοσύνθεση των ανθοκυανών είναι πιθανόν κυτοπλασματικά και συνδεδεμένα στις μεμβράνες του χυμοτοπίου. Είναι πιθανόν μετά το στάδιο της γλυκοσυλίωσης, οι ανθοκυάνες μεταφέρονται εντός του χυμοτοπίου.

Συνοπτικά, η πρώτη ανθοκυανιδίνη που συντίθεται είναι η κυανιδίνη η οποία, λόγω της παρουσίας δύο -OH σε ο-θέση, είναι πολύ ευαίσθητη στην δράση των φαινολοξειδασών. Στα ανώτερα φυτά μετατρέπεται τάχιστα με υδροξυλίωση και μεθοξυλίωση σε ανθοκυάνες των οποίων τα άγλυκα μέρη είναι πιο σταθερά δηλαδή σε ανθοκυάνες της παιονιδίνης και της μαλβιδίνης. Για τη μετατροπή αυτή είναι απαραίτητη η παρουσία του ενζύμου υδροξυλάση της 3-φλαβανόνης (F3H) και ενός ενζύμου που καταλύει την μεθοξυλίωση (MT).

Συγκεκριμένα στην άμπελο, η ανθοκυάνη της κυανιδίνης είναι η πρώτη ανθοκυάνη που εμφανίζεται στους φλοιούς των ραγών των ερυθρών ποικιλιών κατά την περίοδο του περκασμού. Στην αρχή του σταδίου ωρίμανσης, η συγκέντρωσή της είναι αρκετά υψηλή φθάνοντας σε μια μέγιστη τιμή, αλλά στη συνέχεια μειώνεται τάχιστα διότι η ασταθής αυτή ανθοκυάνη μετασχηματίζεται αφ' ενός σε ανθοκυάνη της δελφινιδίνης και αφ' ετέρου σε ανθοκυάνη της παιονιδίνης με μεθοξυλίωση. Έτσι, η συγκέντρωση της δελφινιδίνης αυξάνεται κατά πολύ περισσότερο από την κυανιδίνη. Στην συνέχεια η δελφινιδίνη, ούσα και αυτή ασταθής λόγω της παρουσίας των -OH σε ο-θέση, μετασχηματίζεται σε πετουνιδίνη με μεθοξυλίωση με επακόλουθο την μείωση της συγκεντρώσεώς της. Όμως και η πετουνιδίνη έχει δύο -OH σε ο-θέση. Παρόλο που είναι σταθερότερη της κυανιδίνης και της δελφινιδίνης, το ποσοστό της εξαρτάται από το μετασχηματισμό της σε μαλβιδίνη, η οποία συνεχώς συσσωρεύεται με αποτέλεσμα να αποτελεί την κύρια ανθοκυάνη σε σχεδόν όλες τις ποικιλίες της αμπέλου (Κουράκου-Δραγώνα, 1998).

Το 1986 από ερευνητικές εργασίες του Roggero, επί της συμπεριφοράς των ανθοκυανών κατά την πορεία ωρίμανσης σταφυλών σε ποικιλίες του γαλλικού αμπελώνα, προέκυψαν τα κάτωθι συμπεράσματα:

- η δελφινιδίνη υφίσταται μια μεθοξυλίωση του -OH στη θέση -5', οπότε και μετατρέπεται σε ανθοκυάνη της πετουνιδίνης και από εκεί σε ανθοκυάνη της μαλβιδίνης.
- η παιονιδίνη, επειδή έχει ήδη την ομάδα -OCH₃ στη θέση -5', υπάρχει η πιθανότητα με μια υδροξυλίωση στη θέση -3', να μετασχηματιστεί σε ανθοκυάνη της πετουνιδίνης και στη συνέχεια σε ανθοκυάνη της μαλβιδίνης.

- και οι δύο παραπάνω μετατροπές γίνονται με τη βοήθεια του ενζύμου φαινολοξειδάση.
- οι ανθοκυάνες κατατάσσονται σε 3 κατηγορίες:

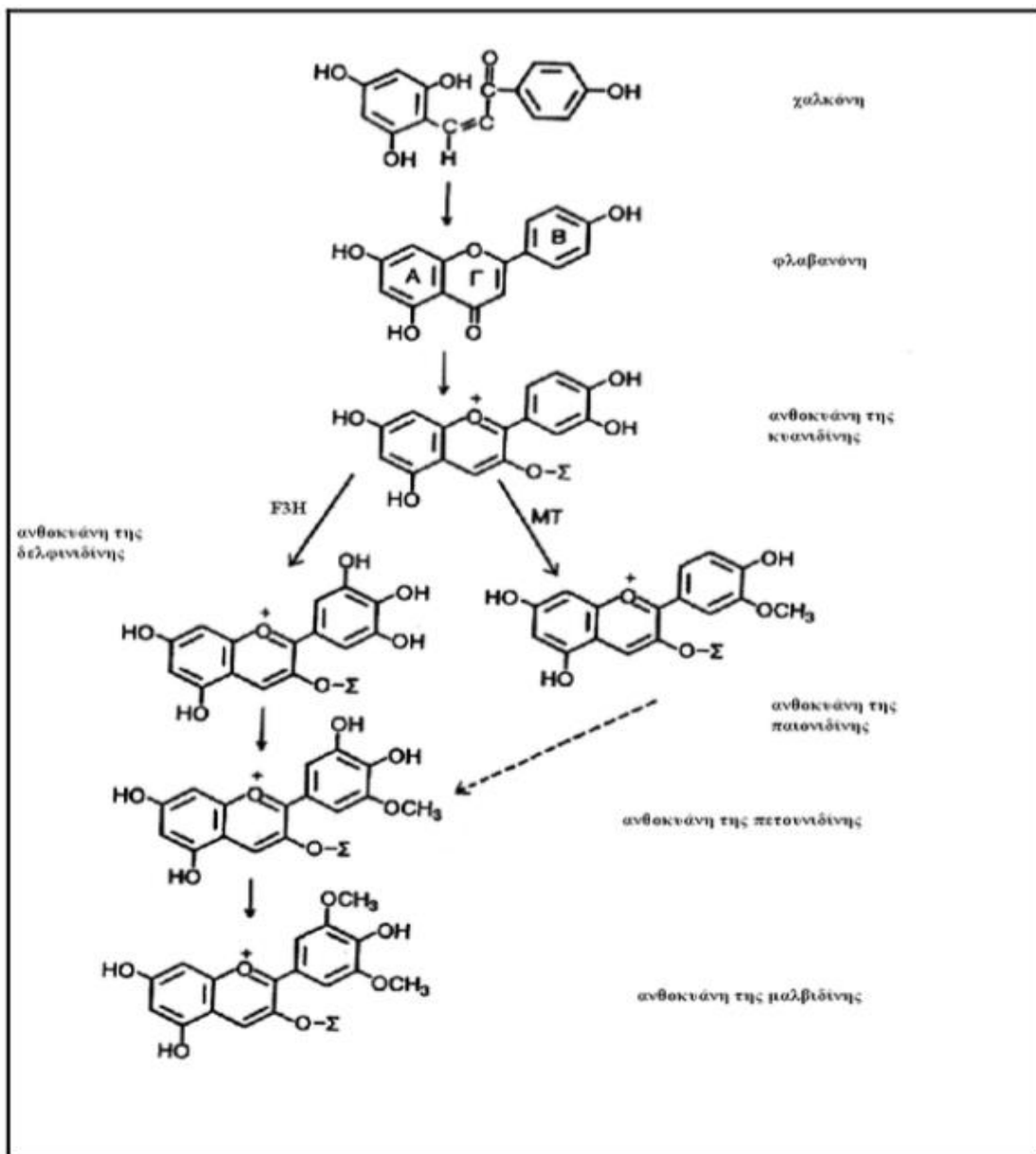
1. ασταθείς: μετασχηματίζονται σε άλλες ανθοκυάνες (κυανιδίνη, δελφινιδίνη)

2. ενδιάμεσες: σχηματίζονται από άλλες και μετασχηματίζονται σε άλλες (πετουνιδίνη),

3. σταθερές: δεν μετασχηματίζονται περαιτέρω (παιονιδίνη, μαλβιδίνη).

η παιονιδίνη μπορεί να είναι στην πραγματικότητα μια ενδιάμεση ανθοκυάνη που μετασχηματίζεται και αυτή σε ανθοκυάνη της μαλβιδίνης. (Κουράκου, 1998).

Εικόνα 7: Τα στάδια σχηματισμού και μετασχηματισμού των ανθοκυανών κατά την πορεία ωρίμανσης των σταφυλών (Κουράκου, 1998).



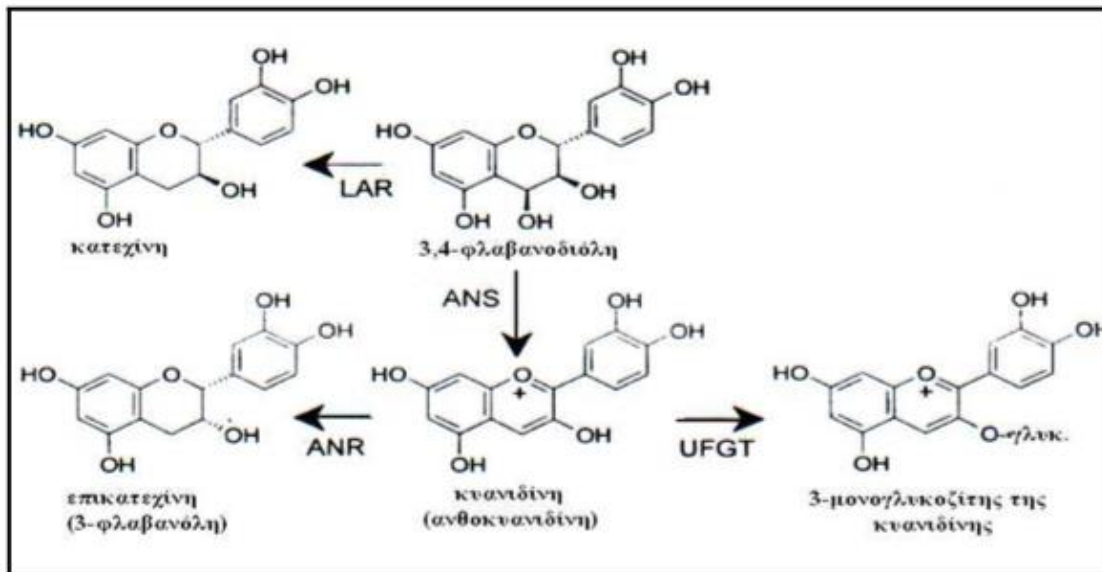
4.2. Η βιοσύνθεση των ταννινών

Οι πρόδρομες ενώσεις των ταννινών είναι οι κατεχίνες και οι επικατεχίνες. Η κατεχίνη είναι μια 2,3-trans-3-φλαβανόλη ενώ η επικατεχίνη είναι 2,3-cis-3-φλαβανόλη. Η στερεοχημική αυτή διάταξη οφείλεται στη δράση της ισομεράσης της χαλκόνης.

Η 3,4-φλαβανοδιόλη (προέρχεται από τη φλαβανονόλη με τη δράση του ενζύμου αναγωγάση της διυδροφλαβανόλης) έχει ήδη τη διάταξη 2,3-trans και μπορεί να μετασχηματιστεί σε κατεχίνη κατευθείαν με τη δράση του ενζύμου αναγωγάση της λευκοανθοκυανιδίνης (LAR).

Οι επικατεχίνες παράγονται από την ανθοκυανιδίνη της κυανιδίνης (Xie et al.,2003). Η αντίδραση καταλύεται από την αναγωγάση της ανθοκυανιδίνης (ANR). Το ένζυμο αυτό μετασχηματίζει την κυανιδίνη σε επικατεχίνη και την δελφινιδίνη σε κατεχίνη. Από τη στιγμή που η 3,4-φλαβανοδιόλη χάνει την εναντιοστερεομερείά της, δεν μπορεί πλέον να μετασχηματιστεί στις αντίστοιχες ανθοκυανιδίνες, με αποτέλεσμα η βιοσύνθεση των επικατεχινών να γίνεται μέσω του διαστερομερές της ανθοκυανιδίνης και όχι από τη δράση μιας επιμεράσης και μιας αναγωγάσης επί της 3,4-φλαβανοδιόλης.

Εικόνα 8: Βιοσύνθεση της 3,4-φλαβανοδιόλης από το καφεοϋλ-CoA και το μαλονυλ-CoA (Adams, 2006).



Δεδομένου ότι η επικατεχίνη αποτελεί δομική υπομονάδα των ταννινών, η κυανιδίνη κατέχει ένα σημαντικό ρόλο ως μια ενδιάμεση ένωση για τη βιοσύνθεση των ταννινών. Συνεπώς, εντός των κυττάρων του φλοιού όπου η επιγαλλοκατεχίνη αποτελεί μια δομική υπομονάδα των ταννινών, η κυανιδίνη και η δελφινιδίνη είναι σημαντικές ενδιάμεσες ενώσεις για τη βιοσύνθεση των ταννινών.

Τα φαινολικά συστατικά αποτελούν δευτερεύοντα συστατικά του καταβολισμού των σακχάρων και τα μονοπάτια βιοσύνθεσής τους είναι ενεργά από την έναρξη ανάπτυξης των ραγών (Κοτσερίδης, 2005).

Μια πληθώρα περιβαλλοντικών παραγόντων, που συνήθως αναφέρεται με το γαλλικό όρο «terroir», επεμβαίνει καθοριστικά στη γενικότερη σύσταση των σταφυλών, επηρεάζοντας (άμεσα ή έμμεσα) και τη βιοσύνθεση των φαινολικών συστατικών (Koundouras et al.,2006).

Ειδικά για έναν ερυθρό οίνο, οι παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοσύνθεση και τη συγκέντρωση των φαιολικών συστατικών, στην ουσία καθορίζουν την ποιότητά του και τη δυνατότητά του για παλαίωση. Ως εκ τούτου είναι σημαντικό να καθορίζεται το φαιολικό δυναμικό των σταφυλών (Arozarena et al., 2000).

5. ΜΕΘΟΔΟΣ HPLC ΚΑΙ ΦΑΣΦΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΟΥ

5.1. Ανθοκυάνες φλοιών με τη μέθοδο HPLC

Από τις ανθοκυάνες προσδιορίστηκε μόνο ο μονογλυκοζίτης της μαλβιδίνης, όπως περιγράφεται από τους Kallithraka et al. (2005).

Αρχικά, παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα της υπό μελέτη ουσίας σε διάφορες συγκεντρώσεις και αναλύονται κάτω από τις ίδιες συνθήκες με το άγνωστο δείγμα. Έπειτα, κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη αναφοράς, όπου η συγκέντρωση της ουσίας είναι συνάρτηση του εμβαδού της κορυφής της. Από την καμπύλη αυτή και μετρώντας το εμβαδόν της κορυφής της άγνωστης ουσίας βρίσκεται η συγκέντρωσή της στο δείγμα. Για την ποσοτική ανάλυση των ανθοκυανών κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη του μονογλυκοζίτη -3 της μαλβιδίνης και όλες οι ανθοκυάνες εκφράστηκαν ως προς τα ισοδύναμα μαλβιδίνης σε mg/L οίνου. Ακολουθεί ταυτοποίηση, η οποία γίνεται βάση πρότυπων ουσιών των ανθοκυανών, συγκρίνοντας τους χρόνους συγκράτησης (t_R). Το δείγμα οίνου που χρησιμοποιείται φιλτράρεται με φίλτρο 0,25 μm (whatman 0-2 μm PVDF) πριν τη χρωματογραφία.

Οι ανθοκυάνες που ταυτοποιήθηκαν είναι οι :

- κυανιδίνη
- δελφινιδίνη
- πετουνιδίνη
- παιονιδίνη
- μαλβιδίνη
- κουμαρικός εστέρας της μαλβιδίνης.

Για την παρούσα μελέτη ο εξοπλισμός του οργάνου HPLC αποτελείται από:

- 1) το σύστημα παροχής κινητής φάσης
- 2) το σύστημα εισαγωγής δείγματος
- 3) τη στήλη
- 4) τον ανιχνευτή
- 5) τον καταγραφέα

Η κινητή φάση αποτελείται από τον διαλύτη Α (υδατικό διάλυμα 10% v/v μυρμηκικού οξέος – formic acid) και τον διαλύτη Β (μεθανόλη). Ο ρυθμός ροής είναι 1mL/min με όγκο δείγματος 20μL (χειροκίνητη έγχυση), ανίχνευση στα 520nm και το πρόγραμμα έκλουσης.

5.2. Προσδιορισμός φαινολικών ενώσεων στον οίνο

5.2.1. Φασματοσκοπία υπεριώδους – ορατού

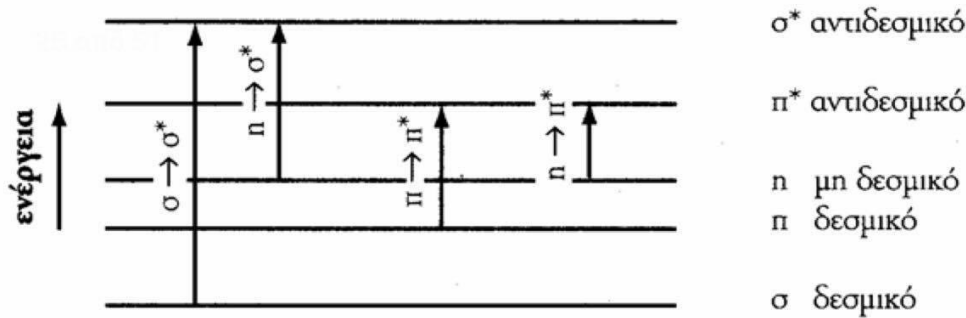
Η απορρόφηση της υπεριώδους και ορατής ακτινοβολίας από τα μόρια μιας ουσίας οφείλεται σε ηλεκτρονικές διεγέρσεις. Στις διεγέρσεις αυτές τα ηλεκτρόνια μεταπίπτουν σε διαφορετική ενεργειακή κατάσταση χωρίς να αλλάζουν ηλεκτρονική στοιβάδα.

Οι κυριότερες διεγέρσεις ηλεκτρονίων που συμβαίνουν στα μόρια των οργανικών μορίων είναι:

$\sigma \rightarrow \sigma^*$

$\pi \rightarrow \pi^*$
 $n \rightarrow \sigma^*$ και $n \rightarrow \pi^*$

Εικόνα 9: Παραδείγματα ηλεκτρονιακών μεταπτώσεων που προκαλούνται με υπεριώδη ακτινοβολία



Παραδείγματα ηλεκτρονιακών μεταπτώσεων που προκαλούνται με υπεριώδη ακτινοβολία.

Οι διεγέρσεις αυτές εμφανίζονται στην υπεριώδη περιοχή τού φάσματος. Στα μόρια, που έχουν εκτεταμένο συζυγιακό σύστημα, παρατηρούνται μετατοπίσεις των παραπάνω διεγέρσεων στα μεγαλύτερα μήκη κύματος και πολλές φορές στην ορατή περιοχή τού φάσματος.

Η απορρόφηση της υπεριώδους ακτινοβολίας από τα διαλύματα των ανόργανων ενώσεων οφείλεται κυρίως σε διεγέρσεις μεταφοράς φορτίου. Αντίθετα η απορρόφηση της ορατής ακτινοβολίας οφείλεται σε διεγέρσεις των d και f ηλεκτρονίων των μεταβατικών στοιχείων.

Οι άχρωμες οργανικές ή ανόργανες ενώσεις, που δεν απορροφούν στην ορατή περιοχή του φάσματος, μπορούν να μετατραπούν σε έγχρωμες, με κατάλληλες χημικές αντιδράσεις, (π.χ. οξείδωση, σχηματισμός συμπλοκών ενώσεων κτλ.). Οι ηλεκτρονικές διεγέρσεις συνοδεύονται από διεγέρσεις δόνησης και περιστροφής των μορίων και από διάφορες επιδράσεις των μορίων τού διαλύτη. Για το λόγο αυτό, τα μοριακά φάσματα απορρόφησης έχουν την μορφή ταινιών. Αντίθετα τα ατομικά φάσματα απορρόφησης είναι γραμμωτά. (Μπασσιούρας & Παπαθανασοπούλου, 2010)

5.2.2. Νόμος των Beer-Lambert

Σε μία κυψελίδα με πάχος στοιβάδας l , περιέχεται διάλυμα μιας ουσίας με συγκέντρωση C . Στο διάλυμα προσπίπτει κάθετα στα τοιχώματα της κυψελίδας παράλληλη μονοχρωματική δέσμη που έχει ένταση I_0 . Η δέσμη περνά μέσα από το διάλυμα και βγαίνει με ένταση I , ενώ ένα ποσοστό της απορροφάται από το διάλυμα. Το ποσοστό αυτό εξαρτάται από το πάχος της στοιβάδας l και από τη συγκέντρωση της ουσίας C . Επειδή η απορρόφηση μιας ακτινοβολίας συνοδεύεται και από ορισμένες ηλεκτρονικές διεγέρσεις είναι επόμενο ότι το μήκος κύματος της ακτινοβολίας και εκείνο το ποσοστό της που απορροφάται από ένα διάλυμα εξαρτώνται από τη φύση της διαλυμένης ουσίας, δηλαδή από ένα συντελεστή ϵ .

Η μαθηματική σχέση που συνδέει την ένταση της προσπίπτουσας δέσμης I_0 με την ένταση εκείνης που βγαίνει από το διάλυμα I , είναι γνωστή σαν νόμος των Beer-Lambert:

$$I = I_0 \cdot 10^{-\epsilon l C} \quad (1)$$

Αν λογαριθμίσουμε τη σχέση αυτή παίρνουμε τη σχέση,

$$-\log \frac{I}{I_0} = -\epsilon l C \quad (2)$$

Ο λόγος I/I_0 ονομάζεται διαπερατότητα (transmittance) και συμβολίζεται με T . Ο δεκαδικός λογάριθμος του αντίστροφου της διαπερατότητας ($-\log T$) ονομάζεται οπτική πυκνότητα (optical density) και συμβολίζεται με O.D, ή απορρόφηση (absorbance), οπότε συμβολίζεται με A . Στη διεθνή βιβλιογραφία επικράτησε τελικά ο όρος απορρόφηση. Έτσι η σχέση (2) υπάρχει και με τη μορφή,

$$A = -\log \frac{I}{I_0} = -\epsilon l C \quad (3)$$

Από τη σχέση αυτή προκύπτει: α) η απορρόφηση διαλύματος μιας ουσίας για ορισμένη συγκέντρωση και σε ορισμένο μήκος κύματος είναι γραμμική εξάρτηση τού πάχους της στοιβάδας l (νόμος του Lambert) και β) η απορρόφηση διαλύματος μιας ουσίας για ορισμένο πάχος στοιβάδας και σε ορισμένο μήκος κύματος είναι γραμμική εξάρτηση της συγκεντρώσεως C (νόμος του Beer). Ο νόμος του Beer αποτελεί τη βάση της φασματοφωτομετρίας.

Ο συντελεστής ϵ ονομάζεται μοριακός συντελεστής απόσβεσης (molar extinction coefficient). Ο συντελεστής ϵ παριστάνει την απορρόφηση διαλύματος μιας ουσίας, όταν η συγκέντρωσή της είναι 1mole/L και το πάχος της στοιβάδας είναι 1cm. Οι διαστάσεις του ϵ είναι $\text{mole}^{-1} \cdot \text{cm}^2$. Η τιμή του ϵ εξαρτάται από τη φύση της ουσίας και από το μήκος κύματος, στο οποίο γίνεται η μέτρηση της απορροφήσεως. (Μπασσιούρας & Παπαθανασοπούλου, 2010).

5.2.3. Φάσματα απορροφήσεως υπεριώδους -ορατού

Η γραφική απεικόνιση της απορροφήσεως ενός διαλύματος σε σχέση με το μήκος κύματος της μονοχρωματικής δέσμης δίνει το φάσμα απορροφήσεως της διαλυμένης ουσίας. Η συγκέντρωση του διαλύματος και το πάχος της κυψελίδας εκλέγονται με τέτοιο τρόπο, ώστε οι μετρήσεις της απορροφήσεως να έχουν τη μεγαλύτερη δυνατή ακρίβεια.

Στην ποιοτική ανάλυση προτιμώνται οι καμπύλες $\log e$, σε σχέση με το μήκος κύματος επειδή η μορφή των καμπύλων αυτών είναι ανεξάρτητη από τη συγκέντρωση. Σε ορισμένες περιπτώσεις τα φάσματα δίνονται και σαν μεταβολή της διαπερατότητας.

Σε ορισμένα φασματοφωτόμετρα διπλής δέσμης υπάρχει αυτόματη διάταξη καταγραφής της πρώτης ή της δεύτερης παραγώγου των φασμάτων απορρόφησης. Οι παράγωγοι των φασμάτων χρησιμοποιούνται τόσο στην ποιοτική, όσο και στην ποσοτική χημική ανάλυση.

Το μήκος κύματος, στο οποίο παρατηρείται το μεγαλύτερο ποσοστό απορροφήσεως, ονομάζεται μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης και συμβολίζεται με λ_{\max} . Η θέση που βρίσκεται το μέγιστο απορροφήσεως εξαρτάται από το ηλεκτρονικό σύστημα της ουσίας που συμμετέχει στη διέγερση. Στο λ_{\max} ο μοριακός συντελεστής απόσβεσεως έχει τη μέγιστη τιμή και συμβολίζεται με ϵ_{\max} . (Μπασσιούρας & Παπαθανασοπούλου, 2010).

5.2.4. Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός

Οι φασματοφωτομετρικοί προσδιορισμοί βασίζονται στο γνωστό νόμο του Beer. Τα δείγματα, στα οποία πρόκειται να γίνει ο προσδιορισμός ενός ή περισσοτέρων συστατικών, κατεργάζονται έτσι, ώστε στο τελικό στάδιο της κατεργασίας να έχουμε διάλυμα. Ο προσδιορισμός των συστατικών στο διάλυμα αυτό γίνεται, είτε με τη βοήθεια πρότυπων διαλυμάτων, ή με μία φασματοφωτομετρική ογκομέτρηση.

5.2.5. Επιλογή του αναλυτικού μήκους κύματος

Η μέτρηση της απορροφήσεως των διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται για ποσοτικούς προσδιορισμούς, γίνεται στο λ_{\max} . Η επιλογή του λ_{\max} έχει τα παρακάτω πλεονεκτήματα: α) συνήθως, στο λ_{\max} το εύρος της ταινίας απορροφήσεως είναι μεγάλο. Έτσι τα μικρά σφάλματα στη ρύθμιση (θέση) του επιθυμητού μήκους κύματος δεν επηρεάζουν τις μετρήσεις απορροφήσεως. Επίσης οι αποκλίσεις από το νόμο του Beer που προέρχονται από το μεγάλο εύρος της μονοχρωματικής δέσμης είναι αμελητέες, β) η ευαισθησία και η ακρίβεια των προσδιορισμών έχουν τη μέγιστη τιμή στο λ_{\max} και γ) η επίδραση διαφόρων προσμείξεων, που μπορεί να υπάρχουν στα δείγματα ή στα αντιδραστήρια, ελαχιστοποιείται.

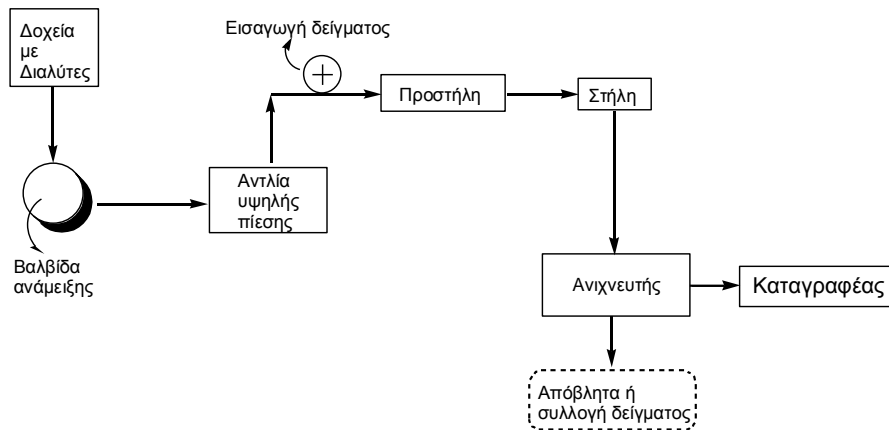
Όταν στο άγνωστο διάλυμα υπάρχουν και άλλες ουσίες που απορροφούν στο λ_{\max} , τότε εκλέγεται ένα μήκος κύματος, όπου οι απορροφήσεις των ουσιών αυτών να είναι μηδέν. Αν δεν υπάρχει τέτοιο μήκος κύματος, τότε οι ουσίες αυτές παρεμποδίζουν τον προσδιορισμό του συστατικού, και πρέπει να απομακρυνθούν. Η απομάκρυνση των παρεμποδισέων γίνεται συνήθως με μία από τις μεθόδους διαχωρισμού, δηλαδή εκχύλιση, ιοντοανταλλαγή, χρωματογραφία κ.α. Πολλοί προσδιορισμοί μπορούν να γίνουν χωρίς να απομακρυνθούν οι παρεμποδίσεις, αν χρησιμοποιηθεί η δεύτερη παράγωγος των φασμάτων απορροφήσεως. Με τη βοήθεια της δεύτερης παραγώγου μπορούν να γίνουν ποσοτικοί προσδιορισμοί και σε θολά διαλύματα. Στις περιπτώσεις αυτές, σαν χαρακτηριστικό μέγεθος χρησιμοποιείται η κατακόρυφη απόσταση ανάμεσα σε ένα μέγιστο και σε ένα διπλανό ελάχιστο. Η απόσταση αυτή είναι γραμμική συνάρτηση της συγκεντρώσεως. Όταν υπάρχουν πολλά ζεύγη μέγιστου-ελάχιστου, τότε χρησιμοποιείται το ζεύγος που έχει τη μεγαλύτερη απόσταση. (Μπασσιούρας & Παπαθανασοπούλου, 2010)

5.3. Υγρή χρωματογραφία

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ανήκει στις μεθόδους υγρής χρωματογραφίας κατά την οποία η κινητή υγρή φάση, υπό την επίδραση ελεγχόμενης πίεσης, περνάει μέσα από μία στήλη που περιέχει τη στατική φάση, η οποία μπορεί να είναι είτε στερεή είτε υγρή, ενωμένη χημικά σε στερεό υπόστρωμα. Η HPLC θεωρείται σήμερα η καλύτερη μέθοδος υγρής χρωματογραφίας αλλά και ο πιο δόκιμος τρόπος χρωματογραφικού διαχωρισμού και ποσοτικού προσδιορισμού χημικών ενώσεων, αντικαθιστώντας την TLC.

1. Οργανολογία

Τα σπουδαιότερα μέρη ενός συστήματος HPLC φαίνονται στο σχήμα 2 και είναι:
 Τα δοχεία που περιέχουν τους διαλύτες.
 Η βαλβίδα ανάμειξης των διαλυτών.
 Η αντλία υψηλής πίεσης που προωθεί τους διαλύτες.
 Η προστήλη.
 Η στήλη
 Ο ανιχνευτής και
 Ο καταγραφέας



Σχήμα 2 : Σχηματικό διάγραμμα υγρού χρωματογράφου

2. Δοχεία διαλυτών

Η αποθήκευση των διαλυτών γίνεται συνήθως σε σκούρα γυάλινα δοχεία τα οποία συνδέονται με απαερωτές για την απομάκρυνση του διαλυμένου αέρα, ο οποίος επηρεάζει την ανάλυση.

- **Βαλβίδα ανάμειξης διαλυτών**

Όταν το σύστημα έκλουσης αποτελείται από μείγμα διαλυτών, τότε οι διαλύτες πριν εισέλθουν στη στήλη, αναμιγνύονται. Αυτό γίνεται με κατάλληλη βαλβίδα ανάμειξης. Η ανάμειξη των διαλυτών μπορεί να προγραμματιστεί αλλάζοντας προοδευτικά, κατά τη διάρκεια του διαχωρισμού, τις αναλογίες ανάμειξης των διαλυτών.

3. Αντλία

Η αντλία παράγει την υψηλή πίεση που πρέπει να εφαρμοστεί στην υγρή κινητή φάση για να διέλθει αυτή από τη στήλη με ικανοποιητική ταχύτητα.. Η πιο δημοφιλής αντλία είναι η παλινδρομική που μπορεί να δημιουργήσει πίεση μέχρι και 6000 psi και ρυθμό ροής 1-10 ml/min. Οι αντλίες κατασκευάζονται είτε από υψηλής ποιότητας ανοξείδωτο χάλυβα είτε από αδρανή πολυμερή (π.χ. πολυτετραφθοροαιθυλένιο) ώστε να μην προσβάλλονται από την κινητή φάση.

4. Βαλβίδα εισαγωγής δείγματος

Η βαλβίδα εισαγωγής δείγματος περιέχει ένα βαθμονομημένο βρόγχο έτσι ώστε να εισάγεται σταθερός και επαναλήψιμος όγκος δείγματος κάθε φορά με χρήση σύριγγας.

5. Προστήλη

Η κινητή φάση πριν περάσει από τη στήλη περνά από την προστήλη που έχει ακριβώς το ίδιο υλικό πλήρωσης με την στήλη. Η προστήλη δρα ως χημικό φίλτρο απομακρύνοντας ισχυρώς κατακρατούμενες ενώσεις που είναι δυνατό να κορέσουν την αναλυτική στήλη και να ελαττώσουν τη διάρκεια ζωής της. Το μήκος της προστήλης είναι 1-5cm.

6. Στήλη

Οι στήλες στην HPLC κατασκευάζονται από υψηλής ποιότητας ανοξείδωτο χάλυβα. Έχουν εσωτερική διάμετρο 3.9-7.5mm και μήκος 5-30cm και είναι συνήθως ευθύγραμμες. Πολλά συστατικά έχουν χρησιμοποιηθεί ως υλικά πλήρωσης των στηλών, π.χ. άνθρακας, οργανικά πολυμερή. Η επιλογή τους καθορίζει και το φυσικοχημικό φαινόμενο που λαμβάνει χώρα στους διαχωρισμούς (κατανομή, ιονανταλλαγή, προσρόφηση) και συνεπώς το είδος της χρωματογραφίας.

Η silica είναι το πιο διαδεδομένο υλικό πλήρωσης των στηλών και λειτουργεί τόσο ως στατική φάση στην υγρά-στερεά χρωματογραφία όσο και ως υπόστρωμα για την ακινητοποίηση της υγρής στατικής στιβάδας στην υγρή-υγρή χρωματογραφία. Η silica παράγεται σε διαφορετικές φυσικές μορφές που διαφέρουν στο μέγεθος των σωματιδίων της και στο μέγεθος και τον αριθμό των πόρων.

7. Ανιχνευτής

Στην HPLC χρησιμοποιείται πληθώρα ανιχνευτών. Όλοι τους παράγουν ένα ενισχυμένο ηλεκτρικό σήμα ανάλογο της ποσότητας της ουσίας που εκλούεται εκείνη τη στιγμή. Τα χαρακτηριστικά ποιότητας ενός ανιχνευτή είναι:

1. Σταθερότητα.
2. Υψηλή ευαισθησία,.
3. Καλή απόκριση για όλες τις οργανικές τάξεις ενώσεων.
4. Γραμμική απόκριση σε ευρεία περιοχή.
5. Χαμηλό επίπεδο θορύβου.
6. Απλότητα στη χρήση
7. Μη ύπαρξη ευαισθησίας σε μεταβολή ροής και θερμοκρασίας

Οι πιο σημαντικοί ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται στην HPLC είναι οι παρακάτω:

A) Φασματοφωτομετρικοί

Οι φασματοφωτομετρικοί ανιχνευτές μετρούν την απορρόφηση της ακτινοβολίας συγκεκριμένου μήκους κύματος που διέρχεται από το δείγμα όταν αυτό

εκλούεται από τη στήλη. Το μέγεθος της απορρόφησης καθώς και το μήκος κύματος εξαρτάται από τη συγκέντρωση και τη δομή των μορίων που απορροφούν. Υπάρχουν δύο βασικοί τύποι φασματοφωτομετρικών ανιχνευτών, οι ανιχνευτές υπεριώδους (Ultra Violet, UV) και οι ανιχνευτές υπέρυθρου (Infra Red, IR).

Ο UV ανιχνευτής που χρησιμοποιείται τις πιο πολλές φορές, περιέχει φίλτρα που επιτρέπουν τη διέλευση διακριτού φάσματος καθορισμένου μήκους κύματος. Ως πηγή ακτινοβολίας χρησιμοποιείται λάμπα δευτερίου. Η πιο εξελιγμένη μορφή ανιχνευτή μας δίνει τη δυνατότητα να επιλέξουμε ανά πάσα στιγμή οποιοδήποτε μήκος κύματος στο UV. Αυτό επιτυγχάνεται με ένα σύστημα φωτοδιόδων (PhotoDiode Array, PDA) που επιτρέπουν στον ανιχνευτή να μετρά την απορρόφηση σε όλο το φάσμα του UV. Οι UV ανιχνευτές έχουν μεγάλη εκλεκτικότητα και ευαισθησία και είναι αρκετά σταθεροί σε μεταβολές θερμοκρασίας ή ροής διαλύτη.

Οι IR ανιχνευτές έχουν παρόμοια λειτουργία με τους UV ανιχνευτές, με την διαφορά ότι τα μήκη κύματος που εκπέμπονται από την πηγή ακτινοβολίας ανήκουν στην περιοχή του υπέρυθρου ($600-3500\text{ cm}^{-1}$). Οι IR ανιχνευτές δεν επηρεάζονται από αλλαγές της θερμοκρασίας και της ροής των διαλυτών. Μειονέκτημα των συγκεκριμένων ανιχνευτών είναι ότι οι περισσότεροι διαλύτες που χρησιμοποιούνται στην HPLC απορροφούν στην υπέρυθη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Το πρόβλημα αυτό λύνεται με τη χρήση ειδικών κυψελίδων. (Ζαμπετάκης & Προεστός, 2012)

B) Φθορισμομετρικοί

Η ανίχνευση με τους συγκεκριμένους ανιχνευτές βασίζεται στην ιδιότητα που έχουν πολλές ενώσεις να φθορίζουν. Φθορισμό εμφανίζουν ενώσεις που φωτοδιεγείρονται εκπέμποντας ακτινοβολία στο ορατό ή στο υπεριώδες και κατόπιν αποδιεγείρονται εκπέμποντας ακτινοβολία χαρακτηριστικού μήκους κύματος. Οι φθορισμομετρικοί ανιχνευτές μετράνε την ένταση φθορισμού. Το οπτικό σύστημα του ανιχνευτή αποτελείται από φωτοπολλαπλασιαστές λόγω της μικρής έντασης που έχει η ακτινοβολία φθορισμού. Κύριο πλεονέκτημα των φθορισμομετρικών ανιχνευτών είναι η μεγάλη τους ευαισθησία που είναι μέχρι και 10.000 πιο μεγάλη από αυτή των φασματοφωτομετρικών. Θα πρέπει να προσέχουμε στην εκλογή της κινητής φάσης ώστε να μην προκαλεί απόσβεση φθορισμού. Διαλύτες όπως μεθανόλη, εξάνιο και υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα δεν προκαλούν προβλήματα.

Γ) Δείκτη διάθλασης

Οι ανιχνευτές του δείκτη διάθλασης (Refractive Index, RI) συγκρίνουν το δείκτη διάθλασης του εκλούσματος (δηλ. της κινητής φάσης με το δείγμα) με το δείκτη διάθλασης της καθαρής κινητής φάσης. Όταν μια ουσία εκλούεται προκαλείται μεταβολή στο δείκτη διάθλασης και το προκαλούμενο σήμα καταγράφεται. Λόγω της φύσης της ανίχνευσης, δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν συστήματα έκλυσης μεταβαλλόμενης σύστασης.

Οι RI ανιχνευτές είναι πολύ ευαίσθητοι στις διαφορές θερμοκρασίας και στις μεταβολές ρυθμού ροής των διαλυτών. Οι κορυφές του χρωματογραφήματος μπορεί να είναι θετικές ή αρνητικές. Οι RI ανιχνευτές είναι λιγότερο ευαίσθητοι από τους φασματοφωτομετρικούς ή τους φθορισμομετρικούς ανιχνευτές. Λόγω των μειονεκτημάτων αυτών, χρησιμοποιούνται κυρίως για κορεσμένα λιποειδή, στην παρασκευαστική χρωματογραφία και όχι για ποσοτικές αναλύσεις.

5.3.1. Εφαρμογές

Η HPLC εφαρμόζεται στην ανάλυση σχεδόν όλων των συστατικών των τροφίμων. Η ευελιξία της μεθόδου σε συνδυασμό με το γεγονός ότι δεν απαιτείται μετατροπή του δείγματος σε παράγωγα και δεν καταστρέφεται το δείγμα, έχουν καταστήσει την HPLC σε μία από τις βασικότερες μεθόδους ανάλυσης των τροφίμων. Μερικά σημαντικά παραδείγματα εφαρμογής της HPLC είναι τα παρακάτω.

8. Σάκχαρα

Χρησιμοποιούνται στήλες από silica στις οποίες το υλικό πλήρωσης έχει στην επιφάνειά του κυανο- και αμινομάδες. Η ανίχνευση γίνεται κυρίως με RI ανιχνευτή.

9. Βιταμίνες

Χρησιμοποιούνται στήλες είτε κανονικής είτε αντίστροφης φάσης και η ανίχνευση τους γίνεται με UV ανιχνευτή στην περιοχή 210-280 nm.

10. Πρόσθετα τροφίμων

Χρησιμοποιούνται κυρίως τεχνικές αντίστροφης φάσης και ανιχνευτής UV. Η κινητή φάση είναι κυρίως μεθανόλη ή προπανόλη και νερό ή κάποιο ρυθμιστικό διάλυμα.

11. Αμινοξέα

Χρησιμοποιούνται τεχνικές αντίστροφης φάσης και ανιχνευτής UV. Η κινητή φάση είναι μεταβαλλόμενης σύστασης και αποτελείται συνήθως από ρυθμιστικά διαλύματα οξικού οξέος και ακετονιτρίλιο ή μεθανόλη.

12. Λιπαρές ύλες

Στην περίπτωση των ουδέτερων λιποειδών, χρησιμοποιείται σύστημα κανονικής φάσης. Η στήλη είναι από πυριτικό οξύ και η κινητή φάση μη πολικοί διαλύτες (π.χ. τολουόλιο, εξάνιο, οξικός αιθυλεστέρας). Τα πολικά λιποειδή αναλύονται κατά τάξεις με σύστημα κανονικής φάσης και ιοντοανταλλαγής και οι τάξεις κατά είδη με αντίστροφης φάσης. Λόγω της υψηλής τους πολικότητας, χρησιμοποιούνται πολύ πολικοί διαλύτες. Και στα ουδέτερα και στα πολικά λιποειδή, η ανίχνευση των λιποειδών γίνεται με ανιχνευτή UV. (Ζαμπετάκης & Προεστός, 2012).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

6.ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

6.1.ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Ένας από τους στόχους της παρούσας μελέτης είναι η εύρεση της διαφοράς της αντιοξειδωτικής ικανότητας ανάμεσα σε διαφορετικές ποικιλίες κρασιών.

Συγκεκριμένα, έγινε με σκοπό τον προσδιορισμό των φαινολικών ενώσεων σε δώδεκα εμπορικούς ερυθρούς οίνους με διαφορετική γεωγραφική προέλευση, ώστε να εκτιμηθεί η ικανότητα ή μη των ποικιλιών αυτών να παράγουν οίνους υψηλής ποιότητας.

Για τον προσδιορισμό των πολυφαινολών εφαρμόστηκαν διάφορες αναλυτικές μέθοδοι όπως η μέθοδος HPLC με την οποία έγινε ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης φλαβονοειδών καθώς και η ογκομέτρηση για τον προσδιορισμό της ολικής οξύτητας και του ολικού θειώδους. Τέλος, με τη μέθοδο Follin-Ciocalteu προσδιορίστηκε η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών σε mg γαλλικού οξέος ανά ml ή ανά L.

6.2. ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ (FOLLIN- CIOCALTEU)

Η μέθοδος Folin-Ciocalteu (FC) προτάθηκε αρχικά για την ανάλυση πρωτεϊνών επωφελούμενη από την δραστικότητα του αντιδραστηρίου που χρησιμοποιεί έναντι του πρωτεϊνικού καταλοίπου της τυροσίνης, η οποία περιέχει μία φαινυλομάδα.

Η μέθοδος βασίζεται στην οξείδωση των φαινολών με ταυτόχρονη αναγωγή διαλύματος φωσφορομολυβδενικού και φωσφοροβολφραμικού οξέως (Folin-Ciocalteu reagent, FCR) με τις ακόλουθες δομές:



σε φωσφορομολυβδενικό/φωσφοροβολφραμικό-φαινολικό σύμπλοκο, κυανού χρώματος σε αλκαλικό περιβάλλον. Το κυανό χρώμα που προκύπτει παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση περίπου στα 750nm, και έτσι είναι ανάλογο της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών. Οι φαινόλες που προσδιορίζονται με τη μέθοδο αυτή εκφράζονται σε ισοδύναμα Trolox.

Δεδομένου ότι η μέθοδος αυτή μετράει το σύνολο των φαινολών η επιλογή του γαλλικού οξέος ως πρότυπο βασίζεται στη διαθεσιμότητα μιας καθαρής και σταθερής ουσίας, και το γαλλικό οξύ τηρεί και τους δυο αυτούς παράγοντες και είναι σχετικά φθηνό.

Το αντιδραστήριο FC είναι μη ειδικό στα φαινολικά συστατικά διότι μπορεί να αναχθεί και από άλλα μη φαινολικά συστατικά όπως η βιταμίνη C και ο Cu. Τα φαινολικά συστατικά αντιδρούν με το FC μόνο υπό βασικές συνθήκες, γι' αυτό πραγματοποιείται ρύθμιση με διάλυμα ανθρακικού νατρίου σε pH 10. Ο ιοντισμός ενός φαινολικού πρωτονίου οδηγεί στο σχηματισμό φαινολικού ανιόντος, το οποίο ανάγει το FC. Η αντίδραση αυτή υποστηρίζει το μηχανισμό μεταφοράς ηλεκτρονίου. Τα κυανού χρώματος συστατικά που σχηματίζονται, είναι ανεξάρτητα από τη δομή των φαινολικών συστατικών, αποκλείοντας την πιθανότητα σχηματισμού συμπλόκων μεταξύ του κεντρικού μετάλλου και των φαινολικών συστατικών. Η μέθοδος των ολικών φαινολών

με χρήση του FC είναι απλή και αναπαραγωγίμη. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται συχνά στη μελέτη των φαινολικών αντιοξειδωτικών.

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

Για την δημιουργία της καμπύλης αναφοράς και την ανάλυση των δειγμάτων με την μέθοδο Folin-Ciocalteu παρασκευάστηκαν τα παρακάτω διαλύματα:

• Διάλυμα 1

:Για την παρασκευή αυτού του διαλύματος χρησιμοποιήθηκαν

- 1ml διαλύματος Α
- 1ml διαλύματος Β
- 1ml διαλύματος Γ

Διάλυμα Α

Σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml προστίθενται 0,5 γραμμάρια στερεού $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ και αραιώνεται με απεσταγμένο νερό μέχρι τα 50 ml.

Διάλυμα Β

Σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml προστίθενται 1 γραμμάριο στερεού τρυγικού καλίου-νατρίου και αραιώνεται με απεσταγμένο νερό μέχρι τα 50 ml.

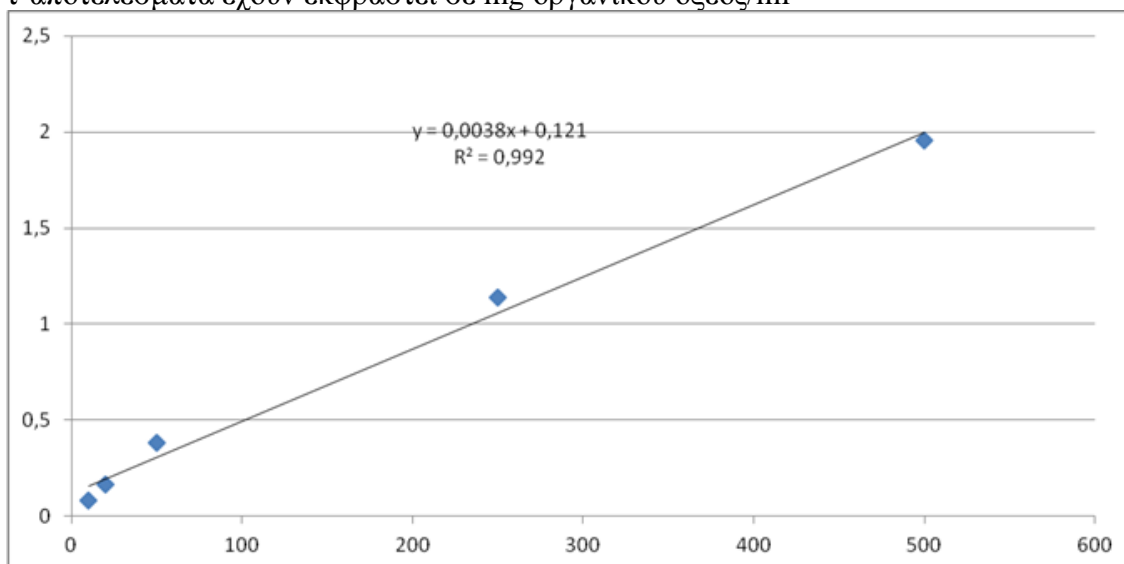
Διάλυμα Γ

Σε ογκομετρική φιάλη 1L προστίθενται 20 γραμμάρια Na_2CO_3 και 4 γραμμάρια NaOH και αραιώνεται με απεσταγμένο νερό μέχρι τα 50 ml. Πυκνό αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu αραιώνεται σε απεσταγμένο νερό σε 1:1 αναλογία.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ FOLIN CIOCALTEU

Σε δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκαν 0,5ml κρασιού, 4ml νερό και 0,5 ml από το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu και ανακινούνται με το Vortex. Αναμονή δύο ώρες στο σκοτάδι. Επειδή παρατηρήθηκε ίζημα το οποίο θα είχε επίδραση στις μετρούμενες τιμές των απορροφήσεων, έγινε φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 2 λεπτά στις 3000rpm. Τέλος, έγινε η μέτρηση της απορρόφησης των δειγμάτων στα 760nm. Με βάση τις τιμές απορρόφησης υπολογίστηκε η συγκέντρωση των ολικών φαινολών από πρότυπη καμπύλη με διάλυμα γαλλικού οξέος σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

Ο προσδιορισμός έγινε με βάση την πρότυπη καμπύλη follin-ciocalteu και τ'αποτελέσματα έχουν εκφραστεί σε mg οργανικού οξέος/ml



Πίνακας 4: Μεθοδολογία folin-ciocalteu κατά την πειραματική διαδικασία.

ΔΙΑΛΥΜΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ 1^{ος} ΔΟΚΙΜΑΣΤΙΚΟΣ ΣΩΛΗΝΑΣ	CONTROL(ΤΥΦΛΟ) 2^{ος} ΔΟΚΙΜΑΣΤΙΚΟΣ ΣΩΛΗΝΑΣ
0,5 ml οίνου	
0,5 ml folin-ciocalteu	0,5 ml folin-ciocalteu
4 ml H ₂ O	4,5 ml H ₂ O
ANAMONH 3min	ANAMONH 3min
1 ml 20% Na ₂ CO ₃	1 ml 20% Na ₂ CO ₃
ANAMONH 2 ΩΡΕΣ ΣΤΟ ΣΚΟΤΑΔΙ ΦΩΤΟΜΕΤΡΗΣΗ ΣΤΑ 725 nm	ANAMONH 2 ΩΡΕΣ ΣΤΟ ΣΚΟΤΑΔΙ ΦΩΤΟΜΕΤΡΗΣΗ ΣΤΑ 725 nm

Πίνακας 5: Αποτελέσματα δειγμάτων κατά τη φωτομέτρηση στα 725 nm.

ΟΝΟΜΑΣΙΑ- ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΟΙΝΟΥ	ΦΩΤΟΜΕΤΡΗΣΗ ΣΤΑ 725 nm ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ	ΟΛΙΚΑ ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΣΕ mg γαλλικού οξέος/ml
SAMPLE 4 – CABERNET	0,870 nm	197,1053
SAMPLE G – ΑΓΙΩΡΓΙΤΙΚΟ	0,849 nm	191,5789
SAMPLE NAOYSSI – BOYTARI	0,888 nm	201,8421
SAMPLE NEMEA – NEMEA	0,851 nm	192,1053
SAMPLE 11 – SAUVIGNON 2011	1,612 nm	392,3684
SAMPLE 8 – SANTA ALICIA	1,589 nm	386,3158
SAMPLE 9 – CALIFORNIA	1,661 nm	405,2632
SAMPLE 3 – TEMPRANILLO 2011	1,474 nm	356,0526
SAMPLE 13 – MERLOT	1,548 nm	375,5263
SAMPLE 10 – CIMAROSA CABERNET SAUVIGNON 2012	1,399 nm	336,3158
SAMPLE 2 – CANEPA – CARMENERE CLASSICO 2009	1,444 nm	348,1579
SAMPLE 1 – BARBERA D’ASTI	1,482 nm	358,1579

6.3. ΜΕΤΡΗΣΗ ΟΛΙΚΗΣ - ΕΝΕΡΓΗΣ ΟΞΥΤΗΤΑΣ

Το γλεύκος και ο οίνος είναι διαλύματα με όξινη αντίδραση και γεύση λόγω των οργανικών οξέων που υπάρχουν ελεύθερα και τα οποία δίστανται ανάλογα με τη σταθερά ιονισμού τους. Τα κύρια οξέα του γλεύκους είναι το τρυγικό, το μηλικό και το κιτρικό και δημιουργούνται μέσα από μεταβολικά μονοπάτια στο φυτό της αμπέλου. Κατά τη σύνθλιψη και πίεση των σταφυλιών για την παραλαβή του γλεύκους περνάνε στην υγρή φάση και είναι υπεύθυνα για την όξινη σύσταση του. Όταν το γλεύκος ζυμώνεται σε οίνο, τα παραπάνω οξέα υφίστανται ποσοτικές μεταβολές ενώ παράλληλα εμφανίζονται και νέα (π.χ. ηλεκτρικό, γαλακτικό, οξικό κ.ά.) σαν δευτερεύοντα προϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης ή σαν προϊόντα βακτηριακής ή ενζυμικής δράσης.

Τόσο στο σύνολο τους, όσο και το καθένα ξεχωριστά, συμβάλλουν στη διαμόρφωση των γευστικών χαρακτήρων των οίνων αλλά και τους προσδίδουν ιδιότητες που θα πρέπει να λάβει υπόψη του ο οινολόγος για την τεχνολογικά σωστή παραγωγή, επεξεργασία και συντήρηση των οίνων.

1. Ολική ή ογκομετρούμενη οξύτητα

Το σύνολο των ελεύθερων καρβοξυλομάδων που βρίσκονται στο γλεύκος και τον οίνο, είτε σε μοριακή κατάσταση είτε σε μορφή ανιόντων, αποτελεί την ολική ή ογκομετρούμενη οξύτητα. Εξαρτάται από την περιεκτικότητα του γλεύκους ή του οίνου σε ελεύθερα οργανικά οξέα, ενώ το είδος τους ουσιαστικά δεν παίζει ρόλο στη διαμόρφωση της τιμής, π.χ. είναι αδιάφορο αν ο οίνος περιέχει τρυγικό ή ηλεκτρικό οξύ. Ο προσδιορισμός της βασίζεται στην εξουδετέρωση των όξινων ομάδων του δείγματος με πρότυπο διάλυμα αλκάλειας (συνήθως 0.1 M NaOH) παρουσία ενός δείκτη. Για μια μεγάλη χρονική περίοδο, σαν δείκτης χρησιμοποιούνταν η φαινολοφθαλείνη με περιοχή εξουδετέρωσης (pH αλλαγής χρώματος) 8.0-9.8. Όμως στον προσδιορισμό της οξύτητας στους ερυθρούς οίνους η μέτρηση ήταν ασαφής γιατί στην αλλαγή του χρώματος του δείκτη παρεμβάλλεται και η αντίδραση των χρωστικών του οίνου με το άλαλι. Έτσι η αρμόδια επιτροπή του ΟΙV όρισε σαν 'ολική οξύτητα': το σύνολο των όξινων ομάδων που τιτλοδοτούνται όταν το pH του οίνου φέρεται στην τιμή 7 με προσθήκη πρότυπου διαλύματος αλκάλειας. Το CO₂ δεν λαμβάνεται υπόψη στον υπολογισμό. Για τον καθορισμό του τέλους της αντίδρασης χρησιμοποιείται ως δείκτης το κυανό της βρωμοθυμόλης που έχει περιοχή αλλαγής χρώματος το pH 7 ή παρακολουθείται η μεταβολή του pH.

Εκφράζεται σε χλιοστοϊσοδύναμα ανά λίτρο οίνου ή γλεύκους (meq/L) ή σε γραμμάρια τρυγικού οξέος ανά λίτρο οίνου ή γλεύκους (g/L).

Υλικά και όργανα

- Διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) 0.1 M.
- Διάλυμα κυανού της βρωμοθυμόλης (4 g/L)
- Προχοΐδα, κωνική φιάλη, σιφόνια
- pH-μετρο
- Μαγνητικός αναδευτήρας
- Ποτήρι ζέσεως, μαγνήτης, σιφόνια

Διαδικασία προσδιορισμού

Μέτρηση ογκομετρούμενης οξύτητας

α. Προετοιμασία δείγματος:

Το δείγμα (γλεύκος ή οίνος) πρέπει να είναι διαυγές. Επίσης πρέπει να έχει απομακρυνθεί ο αέρας (με αντλία κενού) γιατί το CO₂ παρεμβάλλεται στη μέτρηση. Αυτό είναι απαραίτητο, ειδικά στο γλεύκος που ζυμώνεται και στον οίνο.

β. Μέτρηση οξύτητας με χρήση δείκτη:

Γεμίζουμε μια προχοΐδα με πρότυπο διάλυμα NaOH 0.1 M και παίρνουμε την αρχική τιμή. Σε μια κωνική φιάλη τοποθετούμε 2 mL δείγματος, 1 mL δείκτη κυανού της βρωμοθυμόλης και περίπου 30 mL απεσταγμένου νερού. Αναμειγνύουμε και τιτλοδοτούμε με το διάλυμα του NaOH, αναδεύοντας συνεχώς, μέχρι την αλλαγή του χρώματος (κυανοπράσινη χροιά). Σημειώνουμε την τελική τιμή της προχοΐδας. Από τη διαφορά αρχικής και τελικής τιμής βρίσκεται ο αριθμός των καταλωθέντων ml, έστω n .

Έκφραση αποτελεσμάτων

Η ολική οξύτητα εκφραζόμενη σε χλιοστοϊσοδύναμα ανά λίτρο (meq/L) δίνεται από τη σχέση:

$$A = 10 * n$$

με ένα δεκαδικό ψηφίο.

Η ολική οξύτητα εκφραζόμενη σε γραμμάρια τρυγικού οξέος ανά λίτρο (g/L) δίνεται από τη σχέση:

$$A = 0.75 * n$$

με ένα δεκαδικό ψηφίο.

Μέτρηση οξύτητας με δείκτη φαινολοφθαλείνη

Σε κωνική φιάλη μεταφέρονται 2 mL αντιπροσωπευτικού δείγματος από το γλεύκος ή τον οίνο που εξετάζεται. Στην ίδια φιάλη προστίθενται 30 mL απεσταγμένο νερό και 3-4 σταγόνες δείκτη φαινολοφθαλείνης (διάλυμα 1 % σε αιθανόλη). Τιτλοδοτούμε με διάλυμα καυστικού νατρίου γνωστής κανονικότητας (συνήθως 0,1 N) αναδεύοντας συνεχώς μέχρι να εμφανιστεί ρόδινο χρώμα το οποίο θα παραμείνει σταθερό για 30 sec. Από την ποσότητα του διαλύματος NaOH που καταναλώθηκε (n) υπολογίζεται η οξύτητα όπως και παραπάνω.

Πίνακας 6: Αποτελέσματα οξύτητας των δώδεκα διαφορετικών εμπορικών οινών.

ΟΞΥΤΗΤΑ	V1	V2	V3	A=0,75*V3(g/L)
SAMPLE 4 –CABERNET	21,1	22,5	1,4	1,05
SAMPLE G – ΑΓΙΩΡΓΙΤΙΚΟ	31,5	32,9	1,4	1,05
SAMPLE NAOYSSI – BOYTARI	23,6	25	1,4	1,05
SAMPLE NEMEA –NEMEA	27,1	28,7	1,6	1,2

SAMPLE 11 – SAUVIGNON 2011	15,8	17,1	1,3	0,975
SAMPLE 8 – SANTA ALICIA	30	31,5	1,5	1,125
SAMPLE 9 – CALIFORNIA	18,5	19,9	1,4	1,05
SAMPLE 3 – TEMPRANILLO 2011	14,6	15,8	1,2	0,9
SAMPLE 13 – MERLOT	199	21,1	1,2	0,9
SAMPLE 10 – CIMAROSA – CABERNET SAUVIGNON 2012	21,1	23,6	2,5	1,875
SAMPLE 2 – CANEPA – CARMENERE CLASSICO 2009	25	27,1	2,1	1,575
SAMPLE 1 – BARBERA D’ASTI	28,7	30	1,3	0,975

6.4. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΛΕΥΘΕΡΟΥ & ΟΛΙΚΟΥ ΘΕΙΩΔΗ ΑΝΥΔΡΙΤΗ

Ο θειώδης ανυδρίτης (SO₂) χρησιμοποιείται στην οινολογική πρακτική εδώ και 300 χρόνια αλλά μόνο τα τελευταία τριάντα χρόνια έγινε αντικείμενο μελέτης για την ορθολογική χρήση του και τον περιορισμό των χρησιμοποιούμενων δόσεων στις απολύτως αναγκαίες ποσότητες. Οι δόσεις καθορίζονται από τις συνθήκες ορθολογικής χρήσης του σε όλα τα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας, ώστε ο οινοποιός να επωφελείται των ιδιοτήτων του χρησιμοποιώντας τη μικρότερη δυνατή ποσότητα. Προϋπόθεση γι’ αυτό είναι η γνώση των μορφών με τις οποίες ο θειώδης ανυδρίτης απαντά στο γλεύκος και τον οίνο, τη δραστηριότητα κάθε μορφής και τους παράγοντες που επηρεάζουν τη δράση του (pH, θερμοκρασία, αλκοόλη, ουσίες αδρανοποίησης του κλπ).

1. Ελεύθερος θειώδης ανυδρίτης

Όταν ο θειώδης ανυδρίτης βρεθεί σε διάλυμα και μάλιστα σε pH 3.0-4.0 (συνήθεις τιμές pH των γλευκών και των οίνων) διίσταται ως εξής:

$SO_2 + H_2O \longrightarrow HSO_3^- + H^+$ όπου SO₂: ο θειώδης ανυδρίτης που παραμένει διαλυμένος ως μοριακός (η κυρίως δραστική μορφή) και HSO₃⁻: τα ανιόντα του εξουδετερωμένου θειώδους οξέος.

Η διάσταση αυτή εξαρτάται από το pH και τη θερμοκρασία. Όσο υψηλότερο είναι το pH τόσο λιγότερος ο μοριακός SO₂, ενώ η αύξηση της θερμοκρασίας συντελεί σε θεαματική αύξηση. Το άθροισμα των δύο μορφών (μοριακού και εξουδετερωμένου) δίνει τον ελεύθερο θειώδη ανυδρίτη. Στη σχέση μοριακού ως προς ελεύθερο SO₂

σημαντικό ρόλο παίζει και η συγκέντρωση της αλκοόλης. Για το ίδιο pH και την ίδια συγκέντρωση ελεύθερου SO₂ η συγκέντρωση του μοριακού SO₂ είναι ανάλογη του αλκοολικού τίτλου του διαλύματος.

2. Δεσμευμένος θειώδης ανυδρίτης

Ο θειώδης ανυδρίτης έχει την ιδιότητα να ενώνεται με ουσίες που διαθέτουν καρβονυλομάδες, αλδεϋδομάδες ή κετονομάδες, προς σχηματισμό ενώσεων από τις οποίες άλλες είναι ασταθείς και άλλες σταθερές. Οι ενώσεις του με σάκχαρα, γενικά, είναι ασταθείς. Με τη γλυκόζη δίνει ενώσεις που λειτουργούν ως 'αποθήκη' SO₂ (ανάλογα με τις συνθήκες ελευθερώνεται μοριακό SO₂) ενώ η φρουκτόζη δεσμεύει ελάχιστο SO₂. Η ακεταλδεϋδη, που σχηματίζεται κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης των σακχάρων ενός γλεύκους, δεσμεύει το θειώδη ανυδρίτη μη αναστρέψιμα δημιουργώντας σταθερές ενώσεις που δεν έχουν καμία από τις ευεργετικές ιδιότητες του ελεύθερου SO₂. Με τις ελεύθερες ανθοκυάνες δίνει άχρες ενώσεις με αποτέλεσμα τη μείωση της έντασης του χρώματος κυρίως των ερυθρών οίνων. Η αντίδραση είναι αντιστρεπτή, δηλαδή, με μείωση του SO₂ λόγω οξειδωσης το χρώμα επανέρχεται. Οι ενώσεις αυτές διασπώνται κι ελευθερώνουν μοριακό SO₂ λειτουργώντας σαν 'αποθήκη' SO₂ που παρέχει στους ερυθρούς ξηρούς οίνους προστασία από τις οξειδώσεις. Στο γλεύκος και τον οίνο υπάρχει πληθώρα άλλων ουσιών που στην ελεύθερη μορφή τους παίζουν αρνητικό ρόλο στους οργανοληπτικούς χαρακτήρες του οίνου. Ο θειώδης ανυδρίτης με το να ενώνεται μαζί τους αμβλύνει τις αρνητικές επιπτώσεις τους.

Δράσεις του θειώδη ανυδρίτη

Αντιοξειδωτική δράση:

Οι αντιδράσεις οξειδωσης, που λαμβάνουν χώρα όταν το γλεύκος ή ο οίνος έρθει σε επαφή με τον αέρα-οξυγόνο, είναι ανεπιθύμητες σε οποιοδήποτε στάδιο της παραγωγικής διαδικασίας. Μπορεί να είναι χημικής ή ενζυμικής φύσεως. Εκδηλώνονται με αλλοίωση του χρώματος και συνοδεύονται από μεταβολή της οσμής. Η χρήση του θειώδους ανυδρίτη ασκεί άμεση (οξειδώνεται ο ίδιος και συνεπώς προφυλάσσει άλλα ευοξειδωτα συστατικά π.χ. φαινολικά) και έμμεση αντιοξειδωτική προστασία (απενεργοποιεί τις οξειδάσες που καταλύουν τις ενζυμικές οξειδώσεις). Η πιο δραστική μορφή είναι τα ιόντα του (αναγωγική ικανότητα: $\text{HSO}_3^- \rightarrow \text{SO}_2$). Ο δεσμευμένος SO₂ δεν έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες.

Αντιμικροβιακή:

Αποτελεί μία από τις σημαντικότερες δράσεις του θειώδους ανυδρίτη. Δεν είναι συνάρτηση της ολικής ποσότητας που προστίθεται αλλά του μοριακού SO₂ που είναι πολύ πιο δραστικός έναντι των διαφόρων μικροοργανισμών σε σύγκριση με τα ιόντα του ελεύθερου θειώδους (HSO_3^-). Τα διάφορα γένη, είδη και στελέχη ζυμών αντιδρούν διαφορετικά στην παρουσία του. Πιο ευαίσθητα είναι τα είδη των 'άγριων' ζυμών και γενικά τα αναερόβια είδη, ενώ μεγαλύτερη αντοχή παρουσιάζουν τα διάφορα είδη *Saccharomyces*. Πολύ πιο ευαίσθητα από τις ζύμες είναι τα βακτήρια και μάλιστα τα οξικά (αερόβια). Για να ανασταλεί η δράση των ανεπιθύμητων αερόβιων μικροοργανισμών (άγριες ζύμες και οξικά βακτήρια) πρέπει να υπάρχει στο γλεύκος μοριακό SO₂ 0.54-0.90 mg/L ανάλογα με το pH του γλεύκους. Υποβαθμισμένης ποιότητας σταφύλια απαιτούν πιο ισχυρές θειώσεις.

Διαλυτική:

Διευκολύνει την εκχύλιση χρωστικών, διαφόρων φαινολικών, αρωματικών συστατικών κ.ά.

Οξίνη:

Αυξάνει την οξύτητα

Διαυγαστική:

Έχει άμεση (παρουσία του καθιζάνουν ορισμένα κολλοειδή) και έμμεση διαυγαστική δράση (καθυστερεί την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης και δίνει χρόνο για απολάσπωση του γλεύκους).

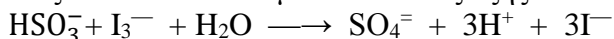
Επιτρεπτά όρια

Ο θειώδης ανυδρίτης μπορεί να προστεθεί στο γλεύκος ή στον οίνο ως καθαρό θείο, στερεό μεταθειώδες κάλιο (μεταμπισουλφίτ), υγροποιημένος θειώδης ανυδρίτης ή ως διαλύματα θειώδη ανυδρίτη ανάλογα με το μέγεθος των δοχείων και των μέσων που διαθέτει ο οινοποιός. Η συγκέντρωση του παρακολουθείται συνεχώς έτσι ώστε να προσδίδει προστασία στο γλεύκος και στον οίνο χωρίς να υπερβαίνει τα νόμιμα όρια, ειδικά για τους εμπορεύσιμους οίνους και τους οίνους ποιότητας.

Η Ε.Ε. με τον κανονισμό 822/87 θέσπισε τα όρια της συνολικής περιεκτικότητας των οίνων σε θειώδη ανυδρίτη. Τη στιγμή που ο οίνος διατίθεται για ανθρώπινη κατανάλωση δεν μπορεί να υπερβαίνει τα 160 mg/L για τους ερυθρούς οίνους και τα 210 mg/L για τους λευκούς και ροζέ. Κατά παρέκκλιση από τα παραπάνω όρια, αν ο οίνος έχει περιεκτικότητα σε ανάγοντα σάκχαρα μεγαλύτερη από 5 g/L, οι ερυθροί οίνοι επιτρέπεται να έχουν ολικό θειώδη ανυδρίτη μέχρι 210 mg/L, ενώ οι λευκοί και ροζέ μέχρι 260 mg/L.

Προσδιορισμός του θειώδη ανυδρίτη

Ο προσδιορισμός του θειώδη ανυδρίτη βασίζεται στην οξειδοαναγωγική αντίδραση του διοξειδίου του θείου με το ιώδιο ως εξής



Η οξείδωση γίνεται σε ισχυρά όξινο περιβάλλον, διαφορετικά το ιώδιο αντιδρά με πολυφαινόλες, σάκχαρα, αλδεΐδες και άλλους αναγωγικούς παράγοντες. Το τέλος της αντίδρασης ελέγχεται με την εμφάνιση μπλε χρώματος όταν η περίσσεια του ιωδίου δίνει χρώμα παρουσία αμύλου. Έτσι προσδιορίζεται ο ελεύθερος θειώδης ανυδρίτης.

Μεταβάλλοντας το pH του οίνου σε ισχυρά αλκαλικό με προσθήκη ΚΟΗ αποδεσμεύουμε τον ανυδρίτη από τις ενώσεις του με την ακεταλδεΐδη επιτρέποντας τον προσδιορισμό και της δεσμευμένης μορφής. Το άθροισμα του ελεύθερου και του ενωμένου δίνει τον ολικό θειώδη ανυδρίτη.

Υλικά και όργανα:

- Πρότυπο διάλυμα ιωδίου (I₂) 0.02 N
- Διάλυμα θειικού οξέος (H₂SO₄) 25% (v/v)
- Δείκτης αμύλου 5 g/L
- Προχοΐδα, κωνική φιάλη, ογκομετρικοί κύλινδροι, σιφόνια
- Διάλυμα υδροξειδίου του καλίου (ΚΟΗ) 1 Μ.

Λαδικασία προσδιορισμού

1. Μέτρηση ελεύθερου θειώδους ανυδρίτη

Ο προσδιορισμός πρέπει να γίνεται αμέσως μετά το άνοιγμα της φιάλης γιατί ο ανυδρίτης οξειδώνεται από τον αέρα.

Σε μια κωνική φιάλη των 250 mL μεταφέρουμε

25 mL οίνου

2.5 ml διαλύματος H₂SO₄ 25%

0.5 mL δείκτη αμύλου και απεσταγμένο νερό και αναδεύουμε.

Ακολουθεί τιτλοδότηση με πρότυπο διάλυμα ιωδίου 0.02 N μέχρι να εμφανιστεί μπλε χροιά και να παραμείνει σταθερή για 20-30 sec. Έστω *A* τα ml του I₂ που καταναλώθηκαν.

2. Μέτρηση ολικού θειώδους ανυδρίτη

Σε μια κωνική φιάλη των 250 mL μεταφέρουμε

25 mL οίνου και

12.5 mL διαλύματος KOH 1N και απεσταγμένο νερό

Το μίγμα ανακινείται και αφήνεται να αντιδράσει για 10 min. Στη συνέχεια προστίθενται

5 mL διαλύματος H₂SO₄ 25%

0.5 mL δείκτη αμύλου και αναδεύουμε.

Ακολουθεί τιτλοδότηση με πρότυπο διάλυμα ιωδίου 0.02 N μέχρι να εμφανιστεί μπλε χροιά και να παραμείνει σταθερή για 20-30 sec. Έστω *B* τα mL του I₂ που καταναλώθηκαν.

Έκφραση αποτελεσμάτων

Ο ελεύθερος θειώδης ανυδρίτης εκφραζόμενος σε χιλιοστογραμμάρια SO₂ ανά λίτρο (mg/L) δίνεται από τον τύπο

$$\text{Ελεύθερος SO}_2 = 25.6 * A$$

Αντίστοιχα ο ολικός θειώδης ανυδρίτης εκφραζόμενος σε χιλιοστογραμμάρια SO₂ ανά λίτρο (mg/L) δίνεται από τον τύπο

$$\text{Ολικός SO}_2 = 25.6 * B$$

Η διαφορά τους δίνει τον δεσμευμένο θειώδη ανυδρίτη

$$\text{Δεσμευμένος} = \text{Ολικός} - \text{Ελεύθερος}$$

Πίνακας 7: Τα αποτελέσματα του ολικού θειώδους των δώδεκα εμπορικών οινών διαφορετικής προέλευσης .

ΟΛΙΚΟ ΘΕΙΩΔΕΣ	V1	V2
SAMPLE 4 –CABERNET	37,6	41,5
SAMPLE G – ΑΓΙΩΡΓΙΤΙΚΟ	33,6	37,6

SAMPLE NAOYSSI – BOYTARI	45	48,5
SAMPLE NEMEA –NEMEA	30,5	33,6
SAMPLE 11 – SAUVIGNON 2011	35,5	38,6
SAMPLE 8 – SANTA ALICIA	24,3	27,9
SAMPLE 9 – CALIFORNIA	31,8	35,5
SAMPLE 3 – TEMPRANILLO 2011	38,6	35,5
SAMPLE 13 – MERLOT	27,9	31,8
SAMPLE 10 – CIMAROSA – CABERNET SAUVIGNON 2012	27	30,5
SAMPLE 2 – CANEPA – CARMENERE CLASSICO 2009	41,9	45
SAMPLE 1 – BARBERA D’ASTI	21	24,3

Πίνακας 8: Τα αποτελέσματα του ελεύθερο θειώδες των δώδεκα εμπορικών οινών διαφορετικής προέλευσης.

ΕΛΕΥΘΕΡΟ ΘΕΙΩΔΕΣ	V1	V2	V3=V2-V1
SAMPLE 4 –CABERNET	19,6	21	2,2
SAMPLE G – ΑΓΙΩΡΓΙΤΙΚΟ	17,2	19,6	2,4

SAMPLE NAOYSSI – BOYTARI	15,5	17,2	1,7
SAMPLE NEMEA –NEMEA	14	15,5	1,5
SAMPLE 11 – SAUVIGNON 2011	35,5	38	2,5
SAMPLE 8 – SANTA ALICIA	10,2	12,8	2,6
SAMPLE 9 – CALIFORNIA	33,5	35,5	2
SAMPLE 3 – TEMPRANILLO 2011	40,5	42,7	2,2
SAMPLE 13 – MERLOT	38	40,5	2,5
SAMPLE 10 – CIMAROSA – CABERNET SAUVIGNON 2012	12,8	14	1,2
SAMPLE 2 – CANEPA – CARMENERE CLASSICO 2009	45,5	48	2,5
SAMPLE 1 – BARBERA D’ASTI	42,7	45,5	2,8

Πίνακας 9: Ελεύθερος και δεσμευμένος θειώδης ανυδρίτης σε ποσοστα (%) επί του συνόλου.

ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ	ΟΛΙΚΟΣ ΘΕΙΩΔΗΣ ΑΝΥΔΡΙΤΗΣ (mg/L)	ΠΟΣΟΣΤΟ ΕΛΕΥΘΕΡΟΥ ΘΕΙΩΔΟΥΣ ΑΝΥΔΡΙΤΗ ΕΠΙ ΤΟΥ ΣΥΝΟΛΙΚΟΥ(%)	ΠΟΣΟΣΤΟ ΔΕΣΜΕΥΜΕΝΟΥ ΘΕΙΩΔΟΥΣ ΑΝΥΔΡΙΤΗ ΕΠΙ ΤΟΥ ΣΥΝΟΛΙΚΟΥ(%)
SAMPLE 4 –CABERNET	99,84	2,2	97,64
SAMPLE G – ΑΓΙΩΡΓΙΤΙΚΟ		2,4	

	102,4		100
SAMPLE NAOYSSI – BOYTARI	89,6	1,7	87,9
SAMPLE NEMEA – NEMEA	79,36	1,5	74,86
SAMPLE 11 – SAUVIGNON 2011	79,36	2,5	76,83
SAMPLE 8 – SANTA ALICIA	92,16	2,6	89,56
SAMPLE 9 – CALIFORNIA	94,72	2	92,72
SAMPLE 3 – TEMPRANILLO 2011	84,48	2,2	82,28
SAMPLE 13 – MERLOT	99,84	2,5	97,34
SAMPLE 10 – CIMAROSA – CABERNET SAUVIGNON 2012	89,60	1,2	88,4
SAMPLE 2 – CANEPA – CARMENERE CLASSICO 2009	79,36	2,5	76,86
SAMPLE 1 – BARBERA D’ASTI	84,48	2,8	81,68

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ασημαδάης, Μανώλης Κ. (2002). *Οινοποίησης Εγχειρίδιο*. Αθήνα.

- Βασιλοπούλου, Φωτεινή (επιμέλεια κειμένων); Ταμπακοπούλου, Χριστίνα (μετάφραση) κ.ά. (2008). *Εγκυκλοπαίδεια του κρασιού (Petit Larousse des Vins. Greek)*. ΟΞΥ. Αθήνα.
- Ζαμπετάκης, Ι. & Προεστός, Χ. (2012), Εργαστήριο Χημείας Τροφίμων, Τμήματος Χημείας, Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Κουράκου - Δραγώνα, Σ. (1998), Θέματα Οινολογίας Επιστήμη και Τεχνολογία στον τομέα της οινοποιητικής τεχνικής, Εκδόσεις Τροχαλία, Αθήνα.
- Χαρβαλιά, Α. και Μπενά - Τζούρου, Ε. (1982), Τα φαινολικά συστατικά και το χρώμα των ελληνικών οίνων, *Ελληνικά Οινολογικά Χρονικό*, τόμος 2, ρρ. 1-77, Ινστιτούτο Οίνου, Αθήνα.
- Κοτσερίδης, Γ. (2005/α), Σημειώσεις/Εργαστηριακές Ασκήσεις Οινολογίας Ι, *Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα επιστήμης και τεχνολογίας τροφίμων*, Αθήνα.
- Κοτσερίδης, Γ. (2005/β), Σημειώσεις Οινολογίας ΙΙ, *Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα επιστήμης και τεχνολογίας τροφίμων*, Αθήνα.
- Μπασιούρας Σ. Παπαθανασοπούλου Α. (2010) Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης και φαινολικών ενώσεων σε λευκά κρασιά με τη μέθοδο ABTS, DPPH & FOLIN-CIOCALTEU. Πτυχιακή εργασία, Α.Τ.Ε.Ι.Θ Σχολής Τεχνολογίας Τροφίμων & Διατροφής, Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων.
- Σταυρακάκης, Μ.Ν. (1999), Ειδική Αμπελουργία, ΙΙ. Φυσιολογία και οικολογία της αμπέλου, *Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Εργαστήριο Αμπελολογίας*, Αθήνα.
- Σουφλερός, Ε.Η. (2000/α), Οινολογία Επιστήμη και Τεχνογνωσία, τόμος Ι, Θεσσαλονίκη.
- Σουφλερός Ε.Η. (2000/β), Οινολογία Επιστήμη και Τεχνογνωσία, τόμος ΙΙ, Θεσσαλονίκη.

/

ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adams, D.O., 2006: Phenolics and ripening in grape berries. ASEV 2005 Phenolics Symposium. *American Journal of Enology and Viticulture* 57: 3: 249-256.
- Andrade, P.B., Mendes, G., Falco, V., Valentao, P. and Seabra, R.M. (2001), Preliminary study of flavonols in Port wine grape varieties, *Food Chemistry*,

Vol. 73, pp. 397-399.

- Amrani - Joutei, K. and Glories, Y., 1995: Tannins and anthocyanins of grape berries: Localization and extraction technique, *Rev. Fr. Oenol.*, 153:28–31
- Arozarena, I., Casp, A., Marin, R. and Navarro, M. (2000), Multivariate differentiation of Spanish red wines according to region and variety. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Vol. 80, pp. 1909-1917.
- Atanasova, V., Fulcrand, H., Cheynier, V. and Moutounet, M. (2002), Effect of oxygenation on polyphenol changes occurring In the course of wine-making, *Analytica Chimica Acta*, Vol. 458, pp. 15-27.
- Bautista-Ortin, A.B., Martinez-Gutillas, A., Ros-Garcia, J.M., Lopez-Roca J.M., & Gomez-Plaza, E. (2005). Improving colour extraction and stability in red wines: the use of maceration enzymes and enological tannins. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 40, 867-878.
- Bakker, J., Bellworthy, S. J., Reader, H. P. and Watkins, S. J. (1999), Effect of Enzymes During Vinification on Color and Sensory Properties of Port Wines, *American Journal of Enology and Viticulture*, Vol. 50, Issue 3, pp. 271-276.
- Boss, P.K. and Davies, C., 2001: Molecular biology of sugar and anthocyanin accumulation in grape berries. In: Roubelakis-Angelakis K.A(Eds) *Molecular Biology & Technology of the Grapevine*, Kluwer Academic Publishers,Dordrecht, The Netherlands, pp. 1-33.
- Boss, P.K., Davies, C. and Robinson, S.R., 1996: Anthocyanin composition and anthocyanin pathway gene expression in grapevine sports differing in berry color skin colour. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 2: 163-170.
- Boss, P.K., Davies, C. and Robinson, S.R., 1996: Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation. *Plant Physiology* 111: 1059-1066.
- Castañeda-Ovado, A., Pacheco-Hernandez, L., Paez-Hernandez, H., Rodriguez, J. and Galan-Vidal, C., 2009: Chemical studies of anthocyanins: A review, *Food Chemistry*, 113, 859-871.
- Castellarin, S.D., Pfeiffer, A., Sivilotti, P., Degan, M., Peterlunger, E. and Di Gaspero, G., 2007:Transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in ripening fruits of grapevine under seasonal waterdeficit. *Plant, Cell and Environment* 30: 1381-1399.
- Cheynier, V., Dueñas-Paton, M., Salas, E., Maury, C., Souquet, J.-M., Sarni-Manchado, P. and Fulcrand, H., 2006: Structure and properties of wine pigments and tannins. ASEV 2005 Phenolics Symposium. *American Journal of Enology and Viticulture* 57: 3: 298-305.

- Cheynier, V., Fulcrand, H., Brossaud, F., Asselin, C. and Moutounet, M., 1998: Phenolic Composition as Related to Red Wine Flavor, *Chemistry of Wine Flavor*, Chapter 10, American Chemical Society, ACS Symposium Series 714, Washington, pp. 124-141.
- Cheynier, V., Rigaud, J., Souquet, J-M., Duprat, F. and Moutounet, M., 1990: Must Browning in Relation to the Behavior of Phenolic Compounds During Oxidation, *American Journal of Enology and Viticulture*, Vol. 41, Issue 4, pp. 346-349.
- Coombe, B.G. and Dry, P.R., 1992: *Viticulture. Volume 2. Practices.* Winetitles. Adelaide.
- Del Laudy, M.C., Canals, R., Canals, J.M. and Zamora, F., 2008: Influence of ripening stage and maceration length on the contribution of grape skins, seeds and stems to phenolic composition and astringency in wine-simulated macerations, *Eur. Food Res. Technology*, Vol. 226:337-344.
- Eiro, M. J., & Heinonen, M. (2002). Anthocyanin color behavior and stability during storage: Effect of intermolecular copigmentation. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 7461-7166
- Langure L. These de Doctorat Oenologie- Ampelologie, Universite de Bordeaux II. 1994.
- Hagerman, A.E. and Butler, L.G., 1978: Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 26: 809-812.
- Hakansson, E., Pardon, K., Hayasaka, Y., de Sa, M., & Herderich, M. (2003). Structures and colour properties of new red wine pigments. *Tetrahedron Lett.*, 44, 4887-4891.
- Pérez-Magarifio, S., Gonzalez-San José, M.L. (2006), Polyphenols and colour variability of red wines made from grapes harvested at different ripeness grade, *Food Chemistry*, Vol. 96, pp. 197-208.
- Pereira, G.E., Gaudillère, J-P., Pieri, P., Hilbert, G., Maucourt, M., Deborde, C., Moing, A. and Rolin, D., 2006 : Microclimate influence on mineral and metabolic profiles of grape berries. *American Chemical Society* 54 :18 : 6765-6775.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu D., Doneche, B. and Lonvaud, Al., 1998: *Handbook of Enology, Volume 1, The Microbiology of Wine and Vinifications.*
- Ribéreau - Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A. and Dubourdieu, D. (2000), *Handbook of Enology, Vol. 2, The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments.*

- Pissara, J., Lourenco, S., Gonzalez- Paramas, A.M., Mateus, N., Santos-Bucuga, C., Silva, A.M.S., & de Freitas, V.A.P. (2004). Structural, characterization of new malvidin-3-glucoside-catechin aryl/ alkyl pigments, *J. Agric, Food Chem*, 52, 5519-5526.
- Zoecklein, B.W., Fugelsang, K.C., Gump, B.H. and Nury, F.S. (1995), *Wine analysis and production*, The Chapman and Hall Enology Library, New York.
- Jackson, D.I. and Lombard, P.B. 1993: Environmental and management practices affecting grape composition and wine quality. A review. *American Journal of Enology and Viticulture* 44: 409-430
- Jackson, R.S. (1994), *Wine Science, Principles, Practice, Perception*, 2nd Edition, Academic Press, San Diego, California.
- Jackson, R.S., 2008: *Wine Science, Principles and Applications*, 3^d Edition, Academic Press, San Diego, California.
- Kallithraka, S., Mohdaly, A.A.-A., Makris, D.P. and Kefalas, P., 2005: Determination of major anthocyanin pigments in Hellenic native grape varieties (*Vitis vinifera* sp.): association with antiradical activity. *Journal of Food Composition and Analysis* 18: 375-386.
- Kallithraka S., Tsoutsouras E., Tzourou E., Lanaridis P. (2005). *Principal phenolic compounds in Greek red wines*. Athens wine institute (NAGREF), Athens. pp. 785-786.
- Katalini V., Milos M., Modun D., Musi I., Boban M. (2004). *Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+)-catechin*, *Food chemistry* 86.
- Koundouras, S., Bakratsa, G., Zioziou, E., Nikolaou, N. and Tsialtas, I.T., 2006: Influence of irrigation and rootstock cultivar on gas exchange, growth and ripening of Cabernet sauvignon (*Vitis vinifera* L.) under the semi-arid conditions of central Crece. 2nd International Conference Ampelos 2006, Santorini Island, Greece. pp. 29-34.
- Koundouras, S., Marinos, V., Gkoulioti, A., Kotseridis, Y. and Leeuwen, C.V. (2006), Influence of Vineyard Location and Vine Water Status on Fruit Maturation of Nonirrigated Cv. Agiorgitiko (*Vitis vinifera* L.), Effects on Wine Phenolic and Aroma Components, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 54, pp. 5077-5086.
- Roggero, J.P., Coen, S. and Ragonnet, B., 1986: High performance liquid chromatography survey on changes in pigment content in ripening grapes of Syrah. *American Journal of Enology and Viticulture* 37: 1: 77–83.

- Revilla, I., & Gonzalez-San Jose, M.L. (2001). Evolution during the storage of red wines treated with pectolytic enzymes: New anthocyanin pigment formation. *J. Win Res.* 12, 183-197.
- Van Leeuwen, K., 2003 : Le régime hydrique de la vigne. Conference de Van Leeuwen, K, Château de la Dauphine, 22/5/2003.
- Van Leeuwen, C., Trégoat, O., Choné, X., Jaeck, M.-E., Rabusseau, S. and Gaudillère, J.-P., 2003: Régime hydrique, *Bulletin de l' O.I.V.*, 76 : 867-868 : 367-378.
- Vivar- Quintana, A.M., Santos- Buelga, C. & Rivas- Gonzalo, J.C. (2002). Anthocyanin-derived pigments and colour of red wines. *Anal. Chim. Acta* 458, 147-155.
- Vivas N., Glories Y. (1993b). *System for seasoning of oakwood to cooperage. Vitivinicultura*, 5-6, 47-50.
- Vivas N., Glories Y. (1996). *Study and optimization of phenomena involved in natural seasoning of oakwood.* *Rev. Fr. oenol.*, 158, 28-35.
- Vidal, S. Francis, L. Noble A., Kwiatkowski, M., Cheynier, V., & Waters, E. (2004). Taste and mouth-feel properties of different types of tannin-like polyphenolic compounds and anthocyanins in wine. *Anal. Chim. Acta*, 513, 57-65.
- Yokotsuka, K., Nagao, A., Nakazawa, K., and Sato, M., 1999: Changes in anthocyanins in berry skins of Merlot and Cabernet sauvignon grapes grown in two soils modified with limestone or oyster shell versus a native soil over two years. *American Journal of Enology and Viticulture* 50:1: 1-12.
- Salas, E., Atanasova, V., Poncet- Legrand, C., Meudee, E., Mazauric J.P., & Cheynier, V. (2004). Demonstration of the occurrence of flavanol-anthocyanin adducts in wine and in model solutions, *Anal. Chim. Acta.* 513, 325-332.