



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΟΙΝΟΥ, ΑΜΠΕΛΟΥ ΚΑΙ ΠΟΤΩΝ**

Πτυχιακή Εργασία

**Μελέτη της Αντιοξειδωτικής Επίδρασης των Βοτάνων Βασιλικός –
Χαμομήλι στον Ροδίτη Αλεπού Οίνο**

Του Βασίλειου Καρανικόλα

ΑΜ 161040

Επιβλέπων Καθηγητής

Σεχάντε Αντνάν

ΑΘΗΝΑ 2022

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για την εκπόνηση της παρούσας έρευνας θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Αντνάν Σεχάντε για την ανάθεση της εργασίας συγκεκριμένα σε εμένα τους εκπαιδευτικούς του Τμήματος κ. Αλεξία Ευαγγέλου και κ. Σταυρούλα Αναστασοπούλου για την βοήθειά τους στο πειραματικό μέρος.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τον πατέρα μου για την στήριξή του.

Διασαφήσεις εξεταστικής επιτροπής

Οι υπογράφοντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη πτυχιακή εργασία με τίτλο «Μελέτη της αντιοξειδωτικής επίδρασης των Βοτάνων Βασιλικός – Χαμομήλι στον Ροδίτη Αλεπού Οίνο» που παρουσιάστηκε και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

Ψηφιακή Υπογραφή Επιβλέποντα Καθηγητή (1 ^ο Μέλους Επιτροπής)	Σεχάντε Αντνάν	
Ψηφιακή Υπογραφή Καθηγητή (2 ^ο Μέλους Επιτροπής)	Ευαγγέλου Αλεξάνδρα	
Ψηφιακή Υπογραφή Καθηγητή (3 ^ο Μέλους Επιτροπής)	Κεχαγιά Δέσποινα	

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΩΝ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

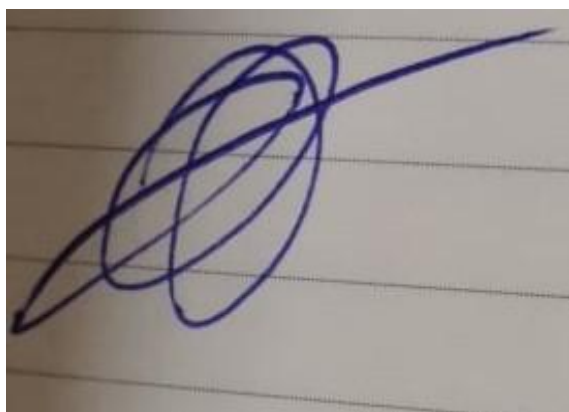
Ο κάτωθι υπογεγραμμένος Βασίλειος Καρανικόλας του Σταύρου και της Νικολέτας με αριθμό μητρώου 161040 και ,φοιτήτης του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστημών Οίνου, Αμπέλου και Ποτών, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Ονοματεπώνυμο & Υπογραφή Συγγραφέα Πτυχιακής Εργασίας

Καρανικόλας Βασίλειος

A photograph of a handwritten signature in blue ink on lined paper. The signature is highly stylized and cursive, consisting of several overlapping loops and a long horizontal stroke extending to the right.

Περιεχόμενα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	2
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ABSTRACT	8
Κεφάλαιο 1ο : Οίνος – στοιχεία και σύσταση	9
1.1 Ορισμός - Ιστορικά στοιχεία	9
1.2 Διαδικασία οινοποίησης	13
1.3 Σύσταση οίνου	14
1.3.1 Αλκοόλες	15
1.3.2 Υδατάνθρακες – σάκχαρα	15
1.3.3 Οξέα	16
1.3.4 Φαινολικές ενώσεις	16
1.3.5 Αζωτούχες ενώσεις	18
1.3.6 Αρωματικές ενώσεις	18
Κεφάλαιο 2ο : Οξείδωση οίνων	19
2.1 Τι είναι	20
2.2 Ενζυματική οξείδωση	21
2.3 Μη ενζυματική οξείδωση (ή χημική οξείδωση)	23
2.4 Οξειδωτική αμάρωση	28
2.5 Μηχανισμός κι ενώσεις υποστρώματα οξείδωσης	31
2.5.1 Φαινολικές ενώσεις	31
2.5.1.1 Μη φλαβανοειδής ενώσεις	32
2.5.1.2 Φλαβανοειδείς ενώσεις	34
2.5.2. Φλαβονόλες	35
2.5.2.1 Φλαβαν-3-όλες	36
2.5.2.2 Ανθοκυάνες	36

Κεφάλαιο 3ο : Αντιοξειδωτική προστασία οίνων	38
3.1 Χρήση θειώδους (SO ₂)	38
3.2 Χρήση ασκορβικού οξέος	40
3.3 Χρήση γλουταθειόνης (Glutathione, GLH)	41
Κεφάλαιο 4ο : Βασιλικός κ χαμομήλι	43
4.1 Βασιλικός (<i>Ocimum basilicum</i>)	43
4.1.1 Γενικά στοιχεία	43
4.1.2 Βοτανική ταξινόμηση	43
4.1.3 Χημική σύσταση	44
4.1.4 Φαρμακευτική χρήση	46
4.1.5 Αντιοξειδωτική δράση και χρήση	47
4.2 Χαμομήλι (<i>Matricaria recutita</i>)	48
4.2.1 Γενικά στοιχεία	48
4.2.2 Βοτανική ταξινόμηση	48
4.2.3 Χημική σύσταση	49
4.2.4 Φαρμακευτική χρήση	52
4.2.5 Αντιοξειδωτική δράση και χρήση	52
Κεφάλαιο 5ο: Φασματοσκοπία υπεριώδους - ορατού (UV-VIS)	53
5.1 Γενικά στοιχεία και χαρακτηριστικά	53
5.2 Νόμος Lambert – Beer	54
Κεφάλαιο 6ο : Πειραματική πορεία - αποτελέσματα	56
6.1 Πείραμα	56
6.2 Μέθοδος Follin- Ciocalteu	57
6.3 Πειραματική διαδικασία μελέτης δειγμάτων	60
6.4 Μέθοδος DPPH	62
6.4.1 Πειραματική διαδικασία δειγμάτων οίνου προζυμωτικά	67
6.4.2 Πειραματική διαδικασία δειγμάτων οίνου μεταζυμωτικά	69
Συμπεράσματα	71
Βιβλιογραφία	74

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι να μελετηθεί η πιθανή μεταβολή στα φαινορικά συστατικά και στην αντιοξειδωτική ικανότητα του «Ροδίτη αλεπού» οίνου, μετά την εκχύλιση των βοτάνων «Βασιλικός» και «Χαμομήλι» στο κρασί της συγκεκριμένης ποικιλίας.

Η εκχύλιση των βοτάνων πραγματοποιήθηκε πριν από την ζύμωση σε γλεύκος το οποίο μόλις είχε ξεκινήσει την ζύμωση καθώς και μετά την ολοκλήρωση της ζύμωσης.

Η εκχύλιση των βοτάνων ολοκληρώθηκε και διήρκησε είκοσι ημέρες. Σε όλες τις περιπτώσεις πραγματοποιήθηκε φιλτράρισμα των οίνων και ανάλυσή τους στο εργαστήριο.

Ο προσδιορισμός των φαινολικών συστατικών του οίνου έγινε με φασματοσκοπικές μεθόδους με την μέθοδο Folin-Ciocalteu ενώ η αντιοξειδωτική ικανότητα των οίνων προσδιορίστηκε με την βοήθεια της μεθόδου DPPH. Σαν τελικό βήμα πραγματοποιήθηκε σύγκριση των δειγμάτων μεταξύ τους καθώς και με το δείγμα μάρτυρας.

Τα αποτελέσματα δείχνουν πως τα εκχυλίσματα των παραπάνω βοτάνων διαθέτουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες προστατεύοντας τους οίνους από οξειδωτικές μεταβολές που υποβαθμίζουν την ποιότητά του.

ABSTRACT

The aim of this thesis is to study the possible changes in the phenolic components and antioxidant capacity of "Reditis fox" wine, after the extraction of the herbs "Basil" and "Chamomile" in the wine of this variety.

The extraction of the herbs was carried out before fermentation on must that had just started fermentation and after fermentation was completed.

The extraction of the herbs was completed and lasted twenty days. In all cases the wines were filtered and analysed in the laboratory.

The determination of the phenolic components of the wine was carried out by spectroscopic methods using the Folin-Ciocalteu method while the antioxidant capacity of the wines was determined using the DPPH method. As a final step, the samples were compared with each other as well as with the control sample.

The results show that the extracts of the above mentioned herbs possess antioxidant properties protecting the wines from oxidative changes that degrade its quality.

Κεφάλαιο 1ο

Οίνος – στοιχεία και σύσταση

1.1 Ορισμός - Ιστορικά στοιχεία

Σύμφωνα με τον ΟΙV : «Οίνος είναι το ποτό που προκύπτει αποκλειστικά από τη μερική ή πλήρη αλκοολική ζύμωση νωπών σταφυλιών, είτε συνθλίβονται ή όχι, ή του γλεύκους σταφυλιών. Η πραγματική περιεκτικότητά του σε αλκοόλη δεν πρέπει να είναι μικρότερη από 8,5% vol. Ωστόσο, λαμβανομένων υπόψη του κλίματος, του εδάφους, της ποικιλίας αμπέλου, ειδικών ποιοτικών παραγόντων ή παραδόσεων που χαρακτηρίζουν ορισμένους αμπελώνες, ο ελάχιστος συνολικός αλκοολικός τίτλος μπορεί να είναι δυνατόν να μειωθεί στο 7% vol. με νομοθεσία που ισχύει ειδικά για την περιοχή που ο οίνος παράγεται» (ΟΙV, 2018).

Η αμπελουργία εμφανίστηκε κατά τη νεολιθική περίοδο (10.000-4000 π.Χ.) στον Νότιο Καύκασο (McGovern et al., 2017) και στη συνέχεια εξαπλώθηκε σε ολόκληρη τη Μεσόγειο (McGovern et al., 2021). Στη νότια Αρμενία, η παλαιότερη γνωστή εγκατάσταση παραγωγής κρασιού στον κόσμο όταν ανακαλύφθηκε, που χρονολογείται πριν από 6100 χρόνια στην περιοχή Areni-1. Το Areni-1 περιγράφεται ως ένα μεγάλο σπήλαιο με τρεις θαλάμους που βρίσκεται στην αριστερή πλευρά της λεκάνης του ποταμού Ayr στο ανατολικό τμήμα του χωριού Areni στην επαρχία Vayots Dzor. Τα ευρήματα στο σπήλαιο περιλαμβάνουν δύο καλά διατηρημένους κυλινδρικούς φούρνους ψωμιού, σιτηρά, κρασί, αποθηκευτικά αγγεία, όστρακα εμποτισμένα με κρασί, κύπελλα πόσης, συναφή κεραμικά, θραύσματα γυαλιού, οργανικά κατάλοιπα και άλλα μικρά ευρήματα. Το σπήλαιο περιέχει αρχαιολογικά πολιτιστικά στρώματα που χρονολογούνται από τη νεολιθική έως την ύστερη μεσαιωνική περίοδο, με τα σημαντικότερα ευρήματα ανήκουν στη Χαλκολιθική (5500-3400 π.Χ.) (Areshian et al., 2012).

Μετά τη Χαλκολιθική, υπάρχουν σχετικά λίγα παραδείγματα συστηματικής παραγωγής κρασιού στην Εγγύς Ανατολή μέχρι την Ύστερη Εποχή του Χαλκού (Avrutis et al., 2015).

Η αμπελοκαλλιέργεια υπάρχει στην Ελλάδα από την ύστερη νεολιθική περίοδο, ενώ η οικιακή καλλιέργεια διαδόθηκε από τις αρχές της Εποχής του Χαλκού. Μέσω του

εμπορίου με την αρχαία Αίγυπτο, ο Μινωικός πολιτισμός στην Κρήτη γνώρισε τις αιγυπτιακές μεθόδους οινοποίησης, μια επιρροή που πιθανότατα μεταδόθηκε στη Μυκηναϊκή Ελλάδα (Robinson & Harding, 2015). Τα μινωικά ανάκτορα είχαν τους σχετικούς αμπελώνες τους, όπως έδειξε ο Σπυρίδων Μαρινάτος σε ανασκαφές ακριβώς νότια του χώρου του ανακτόρου στις Αρχάνες, και το μινωικό ισοδύναμο μιας *villa rustica* αφιερωμένης στην παραγωγή κρασιού αποκαλύφθηκε στην Κάτω Ζάκρο το 1961 (Kerenyi, 1976). Στον μινωικό πολιτισμό των μέσων της δεύτερης χιλιετίας π.Χ., το κρασί και ο ιερός ταύρος συνδέονταν με τη μορφή των ποτηριών σε σχήμα κέρατου που ονομάζονταν ρήτα.

Μαζί με τις ελιές και τα σιτηρά, τα σταφύλια ήταν μια σημαντική γεωργική καλλιέργεια ζωτικής σημασίας για τη συντήρηση και την ανάπτυξη της κοινότητας- το αρχαίο ελληνικό ημερολόγιο ακολουθούσε την πορεία του αμπελουργικού έτους.

Ένα από τα πρώτα γνωστά πατητήρια ανακαλύφθηκε στο Παλαίικαστρο της Κρήτης, από το οποίο νησί οι Μυκηναίοι πιστεύεται ότι διέδωσαν την αμπελουργία σε άλλα του Αιγαίου και πολύ πιθανόν στην ηπειρωτική Ελλάδα (Charters, 2006).

Κατά τη μυκηναϊκή περίοδο, το κρασί απέκτησε μεγαλύτερη πολιτιστική, θρησκευτική και οικονομική σημασία. Οι εγγραφές που αναγράφονται σε πινακίδες της Γραμμικής Β περιλαμβάνουν λεπτομέρειες για το κρασί, τους αμπελώνες και τους εμπόρους κρασιού, καθώς και μια πρώιμη αναφορά στον Διόνυσο, τον Έλληνα θεό του κρασιού. Οι Έλληνες ενσωμάτωσαν την άφιξη του πολιτισμού της οινοποιίας στις μυθολογίες του Διονύσου και του πολιτιστικού ήρωα Αρισταίου. Πρώιμα απομεινάρια αμφορέων δείχνουν ότι οι Μυκηναίοι εμπορεύονταν ενεργά κρασί σε όλο τον αρχαίο κόσμο σε μέρη όπως η Κύπρος, η Αίγυπτος, η Παλαιστίνη, η Σικελία και η νότια Ιταλία (Johnson, 1989).

Καθώς οι ελληνικές πόλεις-κράτη δημιουργούσαν αποικίες σε όλη τη Μεσόγειο, οι άποικοι έφεραν μαζί τους αμπέλια και καλλιεργούσαν ενεργά τα άγρια αμπέλια που συναντούσαν. Η Σικελία και η νότια Ιταλία αποτέλεσαν μερικές από τις πρώτες αποικίες, καθώς ήταν περιοχές που ήδη φιλοξενούσαν άφθονα αμπέλια. Οι Έλληνες αποκαλούσαν το νότιο τμήμα της ιταλικής χερσονήσου Οινότρια ("γη των αμπελιών").

Σύντομα ακολούθησαν οικισμοί στη Μασσαλία της νότιας Γαλλίας και κατά μήκος των ακτών της Μαύρης Θάλασσας, με την προσδοκία ότι η αποικιακή παραγωγή

κρασιού όχι μόνο θα κάλυπτε τις εγχώριες ανάγκες, αλλά θα δημιουργούσε και εμπορικές ευκαιρίες για να καλύψει τη ζήτηση των κοντινών πόλεων-κρατών (Charters, 2006).

Η ίδια η Αθήνα παρείχε μια μεγάλη και προσοδοφόρα αγορά για το κρασί, με σημαντικές αμπελουργικές εκτάσεις να σχηματίζονται στην περιοχή της Αττικής και στο νησί της Θάσου για να βοηθήσουν στην ικανοποίηση της ζήτησης. Θεωρείται πως οι Έλληνες πιθανώς να εισήγαγαν την αμπελουργία στην Ισπανία και την Πορτογαλία, αλλά ανταγωνιστικές θεωρίες υποστηρίζουν ότι οι Φοίνικες πιθανόν έφτασαν πρώτοι σε αυτές τις περιοχές.

Τα σταφύλια, τα αμπέλια και τα κύπελλα κρασιού που κοσμούν τα ελληνικά νομίσματα των κλασικών χρόνων μαρτυρούν τη σημασία του κρασιού για την αρχαία ελληνική οικονομία. Με κάθε σημαντικό εμπορικό εταίρο, από την Κριμαία, την Αίγυπτο, τη Σκυθία, την Ετρουρία και πέραν αυτής, οι Έλληνες αντάλλασσαν τις γνώσεις τους στην αμπελουργία και την οινοποίηση, καθώς και τους καρπούς της δικής τους παραγωγής (Charters, 2006).

Ο Έλληνας συγγραφέας του 4ου αιώνα π.Χ. Θεόφραστος άφησε μια λεπτομερή καταγραφή ορισμένων ελληνικών επιρροών και καινοτομιών στην αμπελουργία, μία από τις οποίες ήταν η μελέτη των εδαφών του αμπελώνα και η κατάλληλη αντιστοίχισή τους με συγκεκριμένα αμπέλια. Μια άλλη καινοτομία ήταν η ελαχιστοποίηση των αποδόσεων για πιο έντονη συγκέντρωση των γεύσεων και της ποιότητας, αντί για αυξημένη ποσότητα. Τα οικονομικά δεδομένα της εποχής ευνοούσαν τις υψηλές αποδόσεις για τις περισσότερες καλλιέργειες και ο σκόπιμος περιορισμός της γεωργικής παραγωγής ήταν εξαιρετικά ασυνήθιστος στον αρχαίο κόσμο. Ο Θεόφραστος περιέγραψε επίσης λεπτομερώς την πρακτική της χρήσης μοσχευμάτων και μοσχευμάτων φυτών για νέες φυτεύσεις αμπελώνων.

Στην αρχαία Ελλάδα εφαρμοζόταν μία πρώιμη μορφή του 'primeage' όταν τα στερεά μέρη των σταφυλιών ήταν έτοιμα για απομάκρυνση από τον μούστο με την βοήθεια καλάθιων τα οποία τοποθετούνταν εντός ξύλινων ή πήλινων δεξαμενών, όπου με την βοήθεια σχοινιών βοηθούσαν στην απομάκρυνση των στερεών. Μετά τη σύνθλιψη, τα σταφύλια τοποθετούνταν σε μεγάλα πιθάρια, βάζα όπου γινόταν η ζύμωση (Robinson, 2006).

Η ζύμωση χώρα σε διαδοχικά δοχεία και μπορούσε να διαρκέσει από αρκετές ημέρες έως μήνες. Σε αρκετές περιπτώσεις τα δοχεία ήταν τοποθετημένα εντός του εδάφους ώστε να διατηρείται σταθερά σε χαμηλά επίπεδα η θερμοκρασία ζύμωσης.

Ένα κρασί που παρασκευαζόταν στη Λέσβο, γνωστό ως πρωτόποντο, ήταν από τα πρώτα γνωστά που παρασκευάζονταν αποκλειστικά από "χυμό ελεύθερης ροής", που παραγόταν από σταφυλοδεμάτια τα οποία πίεζαν τα σταφύλια κάτω από το ίδιο τους το βάρος. Άλλες ελληνικές καινοτομίες περιλαμβάνουν τη συγκομιδή σκόπιμα άγουρων σταφυλιών για την παραγωγή ενός πιο όξινου κρασιού για ανάμειξη (Robinson , 2006).

Ο βρασμός του γλεύκους των σταφυλιών ανακαλύφθηκε ως ένα άλλο μέσο για την αύξηση της γλυκύτητας των οίνων. Ταυτόχρονα σε αρκετές περιπτώσεις τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των οίνων βελτιώνονταν με την προσθήκη ρητίνης, βοτάνων, μπαχαρικών, θαλασσινού νερού, άλμης, λαδιού και αρώματος. Η ρετσίνα, το ζεστό κρασί και το βερμούτ είναι μερικά σύγχρονα παραδείγματα αυτών των πρακτικών (Robinson , 2006).

Οι αρχαίες αμπελουργικές και οινολογικές πρακτικές περιγράφονται από τους πιο διάσημους Ρωμαίους συγγραφείς στις γεωργικές πραγματείες τους - ο Κάτωνας (περ. 234-149 π.Χ.), ο Βάρρος (περ. 116-27 π.Χ.), ο Πλίνιος ο Πρεσβύτερος (περ. 23/24-79 μ.Χ.), Columella (περ. 1ος αιώνας μ.Χ.), Palladius (τέλη 4ου/αρχές 5ου αιώνα μ.Χ.), και μια ανώνυμη πραγματεία (βασισμένη σε έργα αρχαίων συγγραφέων) του 10ου αιώνα μ.Χ.

Έκτοτε η καλλιέργεια της αμπέλου μεταδόθηκε με το εμπόριο σε όλες τις περιοχές του γνωστού τότε κόσμου. Οι Ρωμαίοι μετέφεραν την καλλιέργεια της αμπέλου στην Γαλλία όπου εκεί εξελίχθηκε αγγίζοντας τα σημερινά επίπεδα. Στην Ελλάδα η παραγωγή οίνου παρακωνίστηκε όμως διατηρήθηκε από τις εκάστοτε μονές και τους μοναχούς που την εξασκούσαν οδηγώντας στην παραγωγή οίνων και στην βελτίωση της ποιότητάς τους. Όλα αυτά έως τις τελευταίες δεκαετίες όπου η οινοποίηση αναβαθμίστηκε ποιοτικά λόγω της αύξησης των γνώσεων γύρω από το συγκεκριμένο τομέα και της λεπτομερούς φροντίδας των αμπελώνων και οινοποίησης.

1.2 Διαδικασία οινοποίησης

Η οινοποίηση περιλαμβάνει κυρίως τρεις κατηγορίες διεργασιών : προζυμωτικές διεργασίες, ζύμωση, μεταζυμωτικές διεργασίες (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

Το κόκκινο κρασί παρασκευάζεται από κόκκινα σταφύλια, τα οποία στην πραγματικότητα έχουν χρώμα πιο κοντά στο μαύρο. Υπάρχουν πολλοί διαφορετικοί τύποι κόκκινων κρασιών. Αυτό θεωρείται το πιο κλασικό στο βασίλειο των κρασιών, που συνδυάζει τα νόστιμα κόκκινα σταφύλια με ένα ευρύ φάσμα αρωμάτων, από βελανιδιά μέχρι ευκάλυπτο, σοκολάτα ή ακόμη και νύξεις μέντας.

Κατά την **ερυθρή οινοποίηση** τα σταφύλια υπόκεινται απορραγισμό, τοποθετούνται στις δεξαμενές ζύμωσης μαζί με τα στερεά μέρη των σταφυλιών όπου και παραμένουν για ένα ορισμένο χρονικό διάστημα που μπορεί να κυμαίνεται από μερικές ημέρες έως και μερικούς μήνες ώστε να εκχυλιστεί η κατάλληλη ποσότητα φαινολικών και χρωστικών συστατικών στους οίνους. Ο χυμός των πειρισσότερων ερυθρών σταφυλιών είναι πρασινωπός ενώ ο ερυθρός χρωματισμός των οίνων προέρχεται από τις ανθοκυάνες (φαινολικές ενώσεις) που εντοπίζονται στον φλοιό των σταφυλιών. Στη συνέχεια την κατάλληλη στιγμή ο μούστος διαχωρίζεται από τα στέμφυλα με την βοήθεια του πιεστηρίου και το παραγόμενο γλεύκος μεταφέρεται στην δεξαμενή για να αποζυμώσει (εάν δεν έχει τελειώσει η ζύμωση). Στις περισσότερες περιπτώσεις οι ερυθροί οίνοι υπόκεινται την διαδικασία της μηλογαλακτικής ζύμωσης, όπου το μηλικό οξύ μετατρέπεται σε γαλακτικό οξύ, ώστε να 'μαλακώσουν' οι οίνοι και να εξαλειφθούν τα έντονα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους σε συνδυασμό με την βιολογική σταθεροποίηση των οίνων. Τέλος οι ερυθροί οίνου μπορούν να εμφιαλωθούν και να καταναλωθούν φρέσκοι είτε να μεταφερθούν σε δρύινα βαρέλια όπου και θα παραμείνουν για ένα ορισμένο χρονικό διάστημα ώστε να παλαιώσουν (οξειδωτική παλαίωση).

Οι **λευκοί οίνοι** δεν είναι ακριβώς λευκοί αλλά έχουν έναν χρυσό ή αχυρένιο χρωματισμό. Ο λευκός οίνος μπορεί να παραχθεί με αλκοολική ζύμωση του μονόχρωμου πολτού πράσινων ή χρυσαφένιων σταφυλιών ή από επιλεγμένο χυμό κόκκινων σταφυλιών, που παράγεται στην Ευρώπη και σε πολλά άλλα μέρη όπως η Αυστραλία, η Καλιφόρνια, η Νέα Ζηλανδία, η Νότια Αφρική κ.λπ. Οι ράγες πιέζονται και ο χυμός διαχωρίζεται από τα στερεά μέρη του σταφυλιού. Στη συνέχεια το παραγόμενο γλεύκος μεταφέρεται σε δεξαμενές όπου και ζυμώνεται σε χαμηλές

θερμοκρασίες (13-18 °C). Μετά το τέλος της ζύμωσης συνήθως σταθεροποιούνται, εμφιαλώνονται και καταναλώνονται φρέσκοι ή υπόκεινται στην διαδικασία της μηλογαλακτικής ζύμωσης, σταθεροποιούνται κι εμφιαλώνονται ή σε πολύ σπάνιες περιπτώσεις μεταφέρονται σε βαρέλια όπου και παλαιώνουν για ένα χρονικό διάστημα πριν εμφιαλωθούν.

Οι **ροζέ οίνοι** είναι μία κατηγορία οίνων μεταξύ των λευκών κι ερυθρών οίνων. Οι ροζέ οίνοι έχουν ανοχτό ροζ χρώμα λόγω του γεγονότος πως παραμένουν με τον φλοιό των σταφυλιών για ένα μικρό χρονικό διάστημα μερικών ωρών έως και μερικών ημερών. Η διαδικασία της οινοποίησης στην συνέχεια είναι ίδια με εκείνη των λευκών οίνων αν και στο μεγαλύτερο μέρος των περιπτώσεων δεν υπόκεινται σε παλαίωση.

Η ζύμωση είναι η κοινή διαδικασία όλων των οίνων. Η ζύμωση περιλαμβάνει μια αντίδραση που μετατρέπει τα σάκχαρα του χυμού σε αλκοόλη και διοξείδιο του άνθρακα. Οι ζυμομύκητες χρησιμοποιούν τα σάκχαρα κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Η ζύμωση εξελίσσεται υπό αναερόβιες συνθήκες και μπορεί να ενισχυθεί με φωσφορικό δι-αμμώνιο (DAP) για τη συμπλήρωση του αζώτου που απαιτείται για την ανάπτυξη των ζυμών σε μη παραδοσιακή προσέγγιση της οινοποίησης.

1.3 Σύσταση οίνου

Το κρασί είναι ένα πολύπλοκο μείγμα πολλών εκατοντάδων ενώσεων, πολλές από τις οποίες βρίσκονται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, ωστόσο παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη και την ποιότητά του. Σε γενικές γραμμές, οι μέσες συγκεντρώσεις των κύριων συστατικών του κρασιού είναι: νερό, 86%, αιθανόλη, 12%, γλυκερόλη και πολυσακχαρίτες ή άλλα ιχνοστοιχεία, 1%, διάφοροι τύποι οξέων, 0,5%, και πτητικές ενώσεις, 0,5% (Sumbly et al., 2010).

Ένα τυπικό κρασί περιέχει αιθυλική αλκοόλη, σάκχαρα, οξέα, ανώτερες αλκοόλες, τανίνες, αλδεΐδες, εστέρες, αμινοξέα, μέταλλα, βιταμίνες, ανθοκυανίνες, δευτερεύοντα συστατικά όπως αρωματικές ενώσεις κ.λπ. (Amerine et al., 1980).

Η σύνθεση του οίνου εξαρτάται κυρίως από την ποικιλία σταφυλιών, ακολουθούμενη από τις τεχνικές οινοποίησης. Η περιεκτικότητα των σταφυλιών σε σάκχαρα, οξέα, τανίνες, ανθοκυανίνες, φαινολικές και αρωματικές ενώσεις και οι αλληλεπιδράσεις τους παίζουν βασικό ρόλο στη σύνθεση των οίνων. Οι οινολογικές πρακτικές στην

οινοποίηση μπορούν να επηρεάσουν την παραγωγή, τη σύνθεση και την ποιότητα του οίνου.

Ανάλογα με τα διάφορα χαρακτηριστικά, όπως η ποικιλία, το στάδιο ωρίμανσης των καρπών, η χημική σύνθεση του χυμού, η χρήση πρόσθετων στο γλεύκος, οι τεχνικές οινοποίησης και η παλαίωση του οίνου, η περιεκτικότητα σε αλκοόλη και σάκχαρα, οι οίνοι ταξινομούνται σε φυσικούς οίνους (9-14% αλκοόλ) και σε οίνους επιδόρπιων και ορεκτικών (15-21% αλκοόλ). Οι πιο διάσημοι τύποι κρασιών είναι τα κόκκινα και τα λευκά κρασιά, ακολουθούμενα από τα ροζέ και τα αφρώδη κρασιά όμως εντοπίζονται κι άλλα είδη οίνων όπως οι 'orange' οίνοι και τα Port wine.

1.3.1 Αλκοόλες

Η κύρια αλκοόλη των οίνων είναι η αιθανόλη ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) όπου αμέσως μετά το νερό αποτελεί το κύριο συστατικό του οίνου, αποτελώντας το 10-16% του όγκου του.

Οι περισσότερες αλκοόλες θεωρείται πως προσδίδουν ανεπιθύμητα αρώματα στους οίνους. Όμως σε συγκεντρώσεις έως 400-500mg/l προσδίδουν πολυπλοκότητα στον αρωματικό χαρακτήρα καθώς είναι αναγκαίες για την δημιουργία ενός σύνθετου αρωματικού χαρακτήρα (Κοντοκόστας, 2010).

Εκτός από την αιθανόλη άλλες αλκοόλες που αποδίδουν ευχάριστα αρώματα είναι η 2-φαινυλοαιθανόλη (20-180mg/l), η οποία αποδίδει ένα ευχάριστο άρωμα τριανταφύλλου, και η τυροσόλη (50-100mg/l), η οποία αποδίδει ένα ευχάριστο άρωμα μελιού (Κοντοκόστας, 2010).

1.3.2 Υδατάνθρακες – σάκχαρα

Οι υδατάνθρακες είναι μόρια του γενικού τύπου $\text{C}_x(\text{H}_2\text{O})_x$, και τα σάκχαρα είναι μια υποομάδα των υδατανθράκων. Αποτελούνται από έως και 10 "μονοσακχαρίτες" - υδατάνθρακες που δεν μπορούν να διασπαστούν σε δύο νέους υδατάνθρακες. Συνήθως δεν αποτελούνται από περισσότερους από επτά υδατάνθρακες. Τα σάκχαρα έχουν γλυκιά γεύση, είναι υδατοδιαλυτά και καλές πηγές ενέργειας (Κοντοκόστας, 2010).

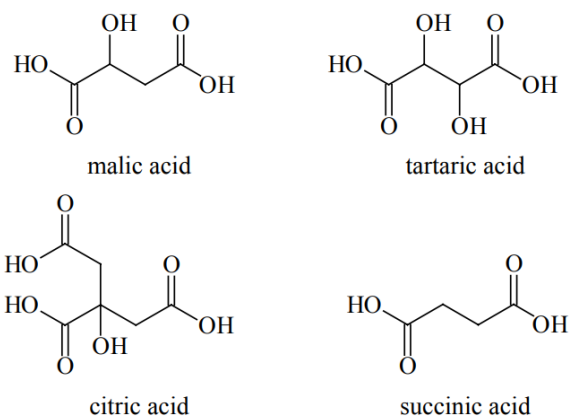
Τα πιο σημαντικά σάκχαρα στο χυμό σταφυλιών είναι τα δύο σάκχαρα με έξι άνθρακες, η γλυκόζη και η φρουκτόζη. Αυτά είναι τα σάκχαρα που κάνουν το χυμό γλυκό και ζυμώνονται σε αλκοόλη από τους ζυμομύκητες. Επιπλέον, μικρές ποσότητες πεντόζης (σάκχαρα πέντε ανθράκων) και πηκτίνης (πολυμερή γαλκατουρονικού οξέος). Οι

πηκτίνες δεν έχουν μεγάλη σημασία στον ίδιο το χυμό, αλλά αν δεν διασπαστούν, μπορούν να δημιουργήσουν θόλωμα στον οίνο (Κοντοκώστας, 2010).

1.3.3 Οξέα

Οργανικά οξέα

Στα σταφύλια απαντώνται τρία κύρια οργανικά οξέα: το μηλικό, το τρυγικό και το κιτρικό οξύ. Από αυτά, το τρυγικό οξύ είναι σπάνιο στα φρούτα, αλλά τα άλλα εμφανίζονται ευρέως. Ένα τέταρτο οξύ, το γλυκόξινο οξύ, σχηματίζεται από το μεταβολισμό της ζύμης και έτσι βρίσκεται στο κρασί αλλά όχι στα σταφύλια. Τα οξέα προσδίδουν στον χυμό την οξύτητά του και δρουν ως αποτελεσματικός ρυθμιστής για τη διατήρηση του pH γύρω στο 3,2 - 3,3. Συμβάλλουν επίσης σημαντικά στην ισορροπία της γεύσης του χυμού και του κρασιού, παρέχοντας την έντονη οξύτητα.



Εικόνα 1.3.3 : Τα κυριότερα οργανικά οξέα των οίνων

1.3.4 Φαινολικές ενώσεις

Η σάρκα, η φλούδα, τα σπόρια και τα στελέχη των σταφυλιών του γένους *Vitis* είναι σχετικά πλούσια σε μη φλαβονοειδείς ενώσεις. Οι πολυφαινόλες είναι οι κύριες φαινολικές ενώσεις που εξάγονται από τα σταφύλια κατά τη διαδικασία της οινοποίησης, οι οποίες λαμβάνονται αρχικά από τη σύνθλιψη του καρπού και ενισχύονται από τις διαδικασίες εκχύλισης και άντλησης κατά τη ζύμωση (Quideau et al., 2011).

Η συνολική ποσότητα πολυφαινολών στους ερυθρούς οίνους έχει εκτιμηθεί ότι κυμαίνεται από 2000 έως 6000 mg/L (Quideau et al., 2011). Οι κύριες βιοδραστικές πολυφαινόλες στους ερυθρούς οίνους είναι κυρίως οι φλαβανόλες, οι φλαβονόλες, οι ανθοκυανίνες και η ρεσβερατρόλη. Τα φλαβονοειδή, τα οποία αντιπροσωπεύουν πάνω

από το 85% των φαινολικών συστατικών του ερυθρού οίνου, περιλαμβάνουν διάφορες μοριακές οικογένειες, όπως οι φλαβονόλες [π.χ. μονομερείς (κατεχίνη, επικατεχίνη), ολιγομερείς και πολυμερείς ενώσεις (προανθοκυανιδίνες, που ονομάζονται επίσης συμπυκνωμένες ταννίνες)], οι φλαβόνες, οι ανθοκυανίνες, οι φλαβαν-3-όλες, οι κατεχίνες και οι επικατεχίνες. Η κατεχίνη και η επικατεχίνη είναι συνήθως οι πιο σημαντικές φλαβονόλες τόσο στους φλοιούς όσο και στα γίγαρτα των σταφυλιών και μπορεί να αντιπροσωπεύουν έως και το 60% των συνολικών φαινολικών ενώσεων που υπάρχουν στα γίγαρτα ενώ είναι υπεύθυνες για την πικράδα και δομή των οίνων (Mulero et al., 2015).

Οι ανθοκυανίνες είναι υπεύθυνες για το κόκκινο χρώμα των κρασιών και εξάγονται από τις φλούδες των σταφυλιών κατά τη διαδικασία οινοποίησης. Οι ταννίνες, μια άλλη υποομάδα φαινολών που βρίσκονται στους φλοιούς και στα γίγαρτα των οίνων και μπορούν να ταξινομηθούν ως μονομερείς, ολιγομερείς και πολυμερείς φλαβαν-3-όλες (συμπυκνωμένες ταννίνες). Οι ταννίνες παίζουν σημαντικό ρόλο στην ποιότητα του κρασιού, καθώς συμβάλλουν σε αισθητηριακές πτυχές όπως το χρώμα, η πικράδα και η στυφή γεύση και η δομή του κρασιού (Mulero et al., 2015).

Πίνακας 1.3.4 : Τα κυριότερα φαινολικά συστατικά στους ερυθρούς και λευκούς οίνους
Πηγή : Markoski et al., (2016)

Φαινολικά συστατικά	Ερυθροί οίνοι (mg γαλλικού οξέος/l)	Λευκοί οίνοι (mg γαλλικού οξέος/l)
Κατεχίνες	191	35
Επιγαλλοκατεχίνες	82	21
Γαλλικό οξύ	95	7
Λυανιδιν-3-γλυκοσίδη	3	0
Μαλβιδίν-3-γλυκοδίση	24	1
Ρουτινίνη	9	0
Κουερκετίνη	8	0
Μυρικετίνη	9	0
Καφεϊκό οξύ	7,1	2,8
Ρεσβερατρόλη	1,5	0
Σύνολο φαινολικών συστατικών	2567	239

1.3.5 Αζωτούχες ενώσεις

Υπάρχουν πολλές πηγές αζώτου στα σταφύλια (π.χ. DNA, ένζυμα, ανόργανο άζωτο κ.λπ.), αλλά η πιο κοινή (και πιο σημαντική) από αυτές είναι τα αμινοξέα. Ως ελεύθερα οξέα αποτελούν σημαντικά δομικά στοιχεία για τη ζύμη κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Επιπλέον, πολλά ένζυμα διατηρούν την καταλυτική τους δράση στο χυμό σταφυλιών. Δύο ομάδες ενζύμων που έχουν σημασία είναι οι πηκτινάσες ("πηκτινολυτικά" ένζυμα που υδρολύουν τις πηκτίνες, αποτρέποντας τη δημιουργία θολώματος στον οίνο) και οι φαινολοξειδάσες (οι οποίες προκαλούν αντιδράσεις καφετιάσματος του γλεύκους, εκτός εάν παρεμποδίζονται από το διαλυμένο SO₂) (Markoski et al., 2016).

1.3.6 Αρωματικές ενώσεις

Η βασική γεύση ενός κρασιού διαμορφώνεται από την ισορροπία των σακχάρων, των οξέων, των φαινολικών και της αιθανόλης, αλλά ο χαρακτήρας του κρασιού προσδίδεται από τις πτητικές αρωματικές ενώσεις. Πάνω από 1000 από αυτές τις πτητικές ενώσεις έχουν εντοπιστεί σε κρασιά από όλο τον κόσμο, όλες παρούσες σε χαμηλά επίπεδα, σχεδόν σε ίχνη. Τα πιο σημαντικά πτητικά συστατικά στο σταφύλι είναι τα μονοτερπένια, τα οποία υπάρχουν ακόμη και σε αρωματικές ποικιλίες όπως το Riesling σε συγκεντρώσεις που δεν υπερβαίνουν τα 4mg kg⁻¹. Αυτά δίνουν μια σειρά

από οσμές που κυμαίνονται από λουλουδένιες/φρουτώδεις έως ρητινώδεις/διαλυτικές. Τα μονοτερπένια υπάρχουν τόσο σε ελεύθερη πτητική μορφή όσο και ως συνδεδεμένοι γλυκοζίτες. Οι γλυκοζίτες δεν είναι πτητικοί και έτσι δεν συμβάλλουν στο άρωμα. Υδρολύονται αργά στα όξινα συμπυκνώματα του οίνου και συνεισφέρουν σε πτητικά συστατικά καθώς ο οίνος παλαιώνει. Κατά την επεξεργασία και την παλαίωση του οίνου αυτά τα μονοτερπένια μετατρέπονται επίσης σε άλλα πιο σύνθετα πτητικά συστατικά όπως το TDN και το βιτισπιράνιο (Quideau et al., 2011).

Τα τερπένια δεν είναι οι μόνοι παράγοντες που συμβάλλουν στο άρωμα του σταφυλιού. Για παράδειγμα, το γνωστό άρωμα "Sauvignon" του Carbernet Sauvignon και του Sauvignon Blanc οφείλεται στις μεθοξυπυραζίνες.

Οι ζύμες συνεισφέρουν επίσης στα αρωματικά συστατικά τόσο από τον δικό της μεταβολισμό όσο και από την τροποποίηση ενώσεων του χυμού σταφυλιού. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό των ελαίων φουζελίνης (αλκοόλες) όπως η 3-μεθυλοβουτανόλη και η 2,3-βουτανδιόλη (Markoski et al., 2016).

Άλλοι παράγοντες που συμβάλλουν στο άρωμα του κρασιού είναι εστέρες όπως ο οξικός αιθυλεστέρας και ο οξικός εξαυλεστέρας (που σχηματίζονται από αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αλκοολών και του οξικού οξέος), φουράνια όπως το φουρφουρύλ αλκοόλη (που σχηματίζεται από την αποσύνθεση των σακχάρων) και η βανιλίνη (που εκχυλίζεται από τα βαρέλια στους οίνους) (Markoski et al., 2016).

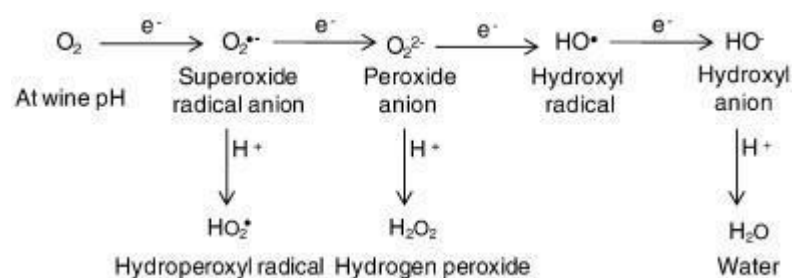
Κεφάλαιο 2ο

Οξείδωση οίνων

2.1 Τι είναι

Κατά την διαδικασία της οξείδωσης παράγονται ελεύθερες ρίζες. Οι ελεύθερες ρίζες εμφανίζονται σε διάφορες αντιδράσεις σε πολλά βιολογικά συστήματα και σε διαδικασίες που ευθύνονται για την αλλοίωση των τροφίμων. Τα αντιδραστικά είδη οξυγόνου (ROS) είναι ένας συλλογικός όρος που χρησιμοποιείται για την περιγραφή ριζών οξυγόνου, όπως το ανιόν υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) και οι συζυγείς όξινες ρίζες υδροπεροξυλίου (HO_2^{\cdot}), υδροξυλίου (HO^{\cdot}), υπεροξυλίου (ROO^{\cdot}), αλκοξυλίου (RO^{\cdot}), και ορισμένες άλλες μη ρίζες που είτε είναι δυνητικοί οξειδωτικοί παράγοντες είτε μετατρέπονται εύκολα σε ρίζες, όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2), το όζον (O_3), το υποχλωριώδες οξύ ($HOCl$), το μονήρες οξυγόνο ($1O_2$) και το υπεροξειδίο των λιπιδίων ($LOOH$) (Pourova et al. , 2010).

Στους οίνους οι ROS μπορούν να παραχθούν από ανηγμένα ιόντα μετάλλων μετάπτωσης [π.χ. $Fe(II)$] κατά τη σταδιακή προσθήκη ενός μόνο ηλεκτρονίου στο τριπλό οξυγόνο (O_2). Η αρχική μεταφορά ενός ηλεκτρονίου οδηγεί στο σχηματισμό ανιόντος ρίζας υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$), το οποίο στο pH του οίνου υπάρχει στην πρωτονιωμένη μορφή ρίζας υδροπεροξυλίου (HO_2^{\cdot}). Η μεταφορά ενός δεύτερου ηλεκτρονίου θα δημιουργήσει ανιόν υπεροξειδίου (O_2^{2-}), το οποίο στο pH του οίνου υπάρχει στην πρωτονιωμένη μορφή υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2). Το επόμενο βήμα αναγωγής δημιουργεί ένα ακόμη πιο δραστικό οξειδωτικό, τη ρίζα υδροξυλίου (HO^{\cdot}), η οποία μπορεί να αφαιρέσει ένα άτομο υδρογόνου από οργανικές ενώσεις για να παράγει νερό, το τελικό προϊόν αναγωγής του οξυγόνου (Waterhouse and Laurie, 2006).



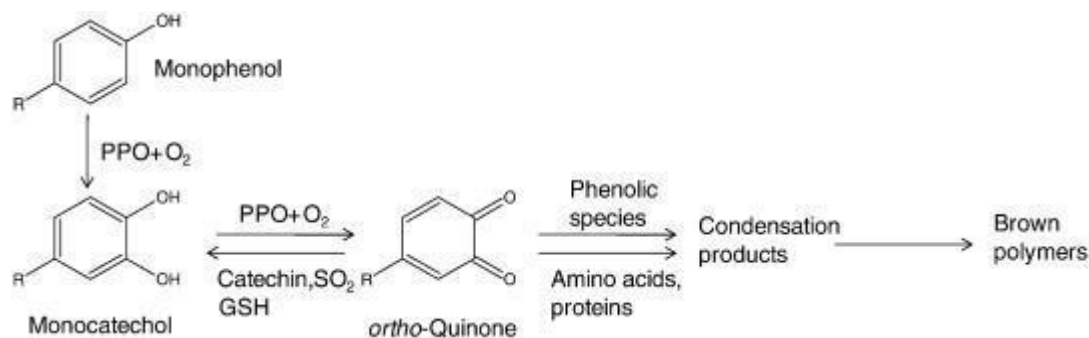
Εικόνα : Αναγωγή του οξυγόνου Πηγή : Oliveira et al., (2011)

Από οργανοληπτικής άποψης, η ελεγχόμενη οξείδωση θα μπορούσε να είναι ευεργετική για τον ερυθρό οίνο, ενισχύοντας και σταθεροποιώντας το χρώμα και μειώνοντας τη στυφή γεύση, ωστόσο, η ποιότητα του λευκού οίνου γενικά καταστρέφεται από την έκθεση στον αέρα.

2.2 Ενζυματική οξείδωση

Η ενζυματική οξείδωση, ή αλλιώς το καφέτιασμα των οίνων (φαινόμενο 'browning') εμφανίζεται σχεδόν εξ ολοκλήρου στο γλεύκος σταφυλιών. Ένας πιθανός μηχανισμός για την οξείδωση των φαινολικών ενώσεων περιλαμβάνει υδροξυλίωση στην ορθο-θέση δίπλα σε μια υπάρχουσα υδροξυλομάδα του φαινολικού υποστρώματος (δραστηριότητα μονοφαινολικής οξειδάσης) και οξείδωση των ορθο-διυδροξυβενζολίων σε ορθο-βενζοκινόνες (δραστηριότητα διφαινολικής οξειδάσης).

Διάφορες κατηγορίες ενζύμων μπορούν να καταλύσουν αυτές τις αντιδράσεις με τα ένζυμα αυτά να ανήκουν στην κατηγορία των οξειδωαναγωγασών. Οι τρεις κύριες κατηγορίες ενζύμων που καταλύουν την οξείδωση των φαινολικών ενώσεων είναι οι οξειδοαναγωγάσες που χρησιμοποιούν το οξυγόνο ως δέκτη ηλεκτρονίων (E.C.1.10.3), η μονοφαινολική μονοοξυγενάση (E.C. 1.14.18.1) και οι υπεροξειδάσες (E.C. 1.11.1).



Εικόνα : Η διεργασία της ενζυματικής οξείδωσης των οίνων Πηγή : Li et al., (2008)

Η υποκατηγορία E.C. 1.10.3 περιλαμβάνει ένζυμα που χρησιμοποιούν κατεχόλες ή συναφείς ενώσεις ως δότες ηλεκτρονίων και οξυγόνο ως δέκτη ηλεκτρονίων, οδηγώντας στον οξειδωμένο δότη και στο νερό. Τα μέλη της περιλαμβάνουν την οξειδάση της κατεχόλης (E.C. 1.10.3.1), τη λακκάση (E.C. 1.10.3.2) και την οξειδάση της ορθο-αμινοφαινόλης (E.C. 1.10.3.4). Η οξειδάση της κατεχόλης είναι επίσης γνωστή ως διφαινολοξειδάση, φαινολοξειδάση, πολυφαινολοξειδάση, ορθο-διφαινολάση, φαινολάση και τυροσινάση, ενώ η λακκάση είναι επίσης γνωστή ως

παρα-διαφαινολοξειδάση. Πολλές από αυτές τις ονομασίες χρησιμοποιούνται επίσης σε σχέση με ένα διαφορετικό ένζυμο, τη μονοφαινολική μονοοξυγενάση (E.C. 1.14.18.1). E.K. 1.14 Οι κατηγορίες μονοοξυγενάσες περιέχουν ένζυμα που δρουν σε ζευγαρωμένους δότες, με την ενσωμάτωση ή την αναγωγή μοριακού οξυγόνου. Η μονοφαινολική μονοοξυγενάση (E.C. 1.14.18.1) καταλύει τις ίδιες αντιδράσεις με την οξειδάση της κατεχόλης (E.C. 1.10.3.1), εάν είναι διαθέσιμες ως υπόστρωμα μόνο κατεχόλης.

Το ένζυμο **τυροσινάση** που οξειδώνει τις φαινόλες έχει δύο τύπους δραστηριότητας: (i) τη δραστηριότητα της ορθο-υδροξυλάσης της φαινόλης (κρεζολάση), με την οποία μια μονοφαινόλη μετατρέπεται σε κατεχόλη μέσω της ενσωμάτωσης οξυγόνου, και (ii) τη δραστηριότητα της κατεχολάσης, με την οποία η κατεχόλη οξειδώνεται προς την καστανή χρωστική ουσία.

Η **λακκάση** καταλύει την οξείδωση των παρα-υδροκινονών σε παρα-βενζοκινόνες.

Η υποκατηγορία E.C. 1.11.1 περιλαμβάνει τις υπεροξειδάσες, οι οποίες χρησιμοποιούν το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) ως δέκτη ηλεκτρονίων για να οξειδώσουν τον δότη, σχηματίζοντας έτσι τον οξειδωμένο δότη και νερό. Στα μέλη της περιλαμβάνονται η υπεροξειδάση του χρένου (E.C. 1.11.1.7), γνωστή επίσης ως υπεροξειδάση της γουαϊακόλης και υπεροξειδάση της σκοπολετίνης, η υπεροξειδάση του μαγγανίου (E.C. 1.11.1.13) και η υπεροξειδάση του διαρυλπροπανίου (E.C. 1.11.1.14).

Και οι τρεις κατηγορίες είναι αιμοπρωτεΐνες. Μηχανιστικά, το υπεροξείδιο του υδρογόνου οξειδώνει το ενεργό κέντρο του ενζύμου της υπεροξειδάσης και μετά τη δέσμευση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο, το υπόστρωμα οξειδώνεται και το ένζυμο επιστρέφει στην ανηγμένη του κατάσταση. Οι υπεροξειδάσες κωδικοποιούνται από μια μεγάλη πολυγονιδιακή οικογένεια, γεγονός που έχει περιπλέξει τη μελέτη των επιμέρους ενζύμων υπεροξειδάσης (Wilfred & Ralph, 2006).

Οι σημαντικότερες οξειδοαναγωγάσες που ευθύνονται για το μαύρισμα κατά την επεξεργασία των σταφυλιών είναι οι πολυφαινολοξειδάσες (PPO), δηλαδή η οξειδάση της κατεχόλης ή τυροσινάση (E.C. 1.10.3.1) και η λακκάση (E.C. 1.10.3.2), και οι υπεροξειδάσες (Peroxidase, PDO), δηλαδή η υπεροξειδάση του χρένου (E.C. 1.11.1.7) (Li et al., 2008). Η PPO είναι ένα ένζυμο που περιέχει Cu, ενώ η POD είναι ένα ένζυμο

που περιέχει Fe. Η τυροσινάση, παράγεται φυσικά στα μούρα του σταφυλιού και μπορεί να καταλύσει την οξείδωση των μονοφαινολών και των κατεχολών. Η λακκάση παράγεται από μούχλες και είναι ικανή να οξειδώνει μεγάλο αριθμό υποστρωμάτων, ιδίως 1,2- και 1,4-διυδροξυβενζόλια. Επιπλέον, το μαύρισμα που προκαλείται από την POD φαίνεται ασήμαντο στους καρπούς, αν και ορισμένοι ερευνητές διαπίστωσαν ότι αυξάνει την αποικοδόμηση των φαινολών όταν συνυπάρχει με την PPO.

Στο γλεύκος σταφυλιών, το ενζυμικό μαύρισμα συσχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με την περιεκτικότητα σε υδροξυκιναμωμικά όπως το καφεοϊλταρταρικό οξύ (καφαρικό οξύ) και το παρα-κουμαροϊλταρτικό οξύ (κουταρικό οξύ) και προωθείται από τις φλαβαν-3-όλες.

Όταν τα σταφύλια συνθλίβονται, απελευθερώνονται πολυφαινολοξειδάσες (PPO), οι οποίες οξειδώνουν ταχέως τα υδροξυκιναμικά σε βενζοκινόνες. Εν τω μεταξύ, οι βενζοκινόνες που παράγονται από την ενζυματική οξείδωση θα υποστούν περαιτέρω αντιδράσεις, ανάλογα με τις οξειδοαναγωγικές τους ιδιότητες και τις ηλεκτρονιακές τους συγγένειες. Όντας οξειδωτικά, οι κινόνες μπορούν να οξειδώσουν ουσίες που έχουν χαμηλότερο δυναμικό, όπως οι πολυφαινόλες και το ασκορβικό οξύ, καθώς και το SO₂. Η κίνηση στη συνέχεια ανάγεται πίσω στην αρχική της κατεχόλη. Ως ηλεκτρόφιλα, μπορούν επίσης να αντιδράσουν με πυρηνόφιλα όπως αμινοπαράγωγα.

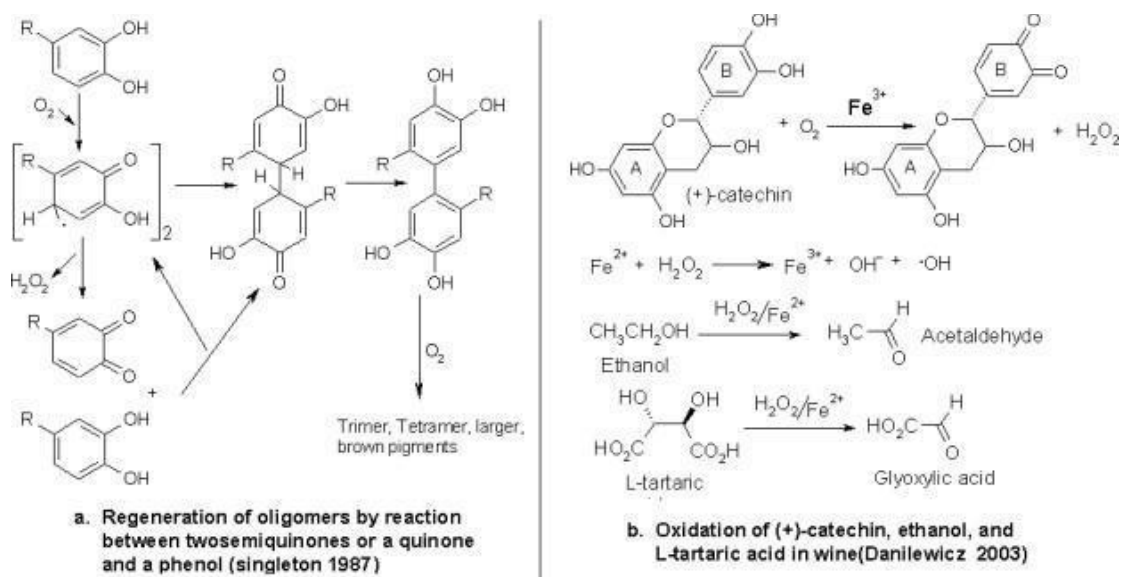
Γενικά, δεν είναι όλες οι ενζυματικές οξειδώσεις που συμβαίνουν στο γλεύκος λευκών σταφυλιών επιβλαβείς. Η υπεροξυγόνωση του λευκού γλεύκους μειώνει το δυναμικό καφετιάσματος του οίνου με δύο τρόπους: με την εξαφάνιση της τυροσινάσης και με την εξάντληση των οξειδώσιμων πολυφαινολών κατά τη διάρκεια των αντιδράσεων οξείδωσης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οίνους με χαμηλές συγκεντρώσεις πολυφαινολών και υψηλή περιεκτικότητα σε GRP, οι οποίοι είναι πιο σταθεροί από εκείνους που παρασκευάζονται από μη οξειδωμένο χυμό, στους οποίους διατηρείται υψηλή περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες με υψηλό δυναμικό μαυρίσματος (Li et al., 2008). Ωστόσο, κατά την επεξεργασία του ερυθρού οίνου η επίδραση της ενζυματικής οξείδωσης είναι περιορισμένη (Cheynier, Fulcrand, & Moutounet, 2000).

2.3 Μη ενζυματική οξείδωση (ή χημική οξείδωση)

Κατά τη διάρκεια της μη ενζυμικής οξείδωσης, που ονομάζεται επίσης χημική οξείδωση του οίνου, οι οξειδωτικές διεργασίες ευνοούνται από την οξείδωση των

πολυφαινολών που περιέχουν ένα τμήμα ορθο-διυδροξυβενζολίου (δακτύλιο κατεχόλης) ή ένα 1, 2,3-τριυδροξυβενζολικό τμήμα (μια ομάδα γαλλοϋλίου), όπως η (+)-κατεχίνη/(-)-επικατεχίνη, η γαλλοκατεχίνη, το γαλλικό οξύ και οι εστέρες του και το καφεϊκό οξύ, τα οποία είναι τα πιο εύκολα οξειδώσιμα συστατικά του οίνου (Li, et al., 2008). Αυτά τα υποστρώματα οξειδώνονται διαδοχικά σε ρίζες ημικινόνης και βενζοκινόνες, ενώ το οξυγόνο ανάγεται σε υπεροξείδιο του υδρογόνου και η όλη διαδικασία διαμεσολαβείται από τον οξειδοαναγωγικό κύκλο Fe^{3+}/Fe^{2+} και Cu^{2+}/Cu^{+} (Danilewicz, Seccombe, & Whelan, 2008). Περαιτέρω ενώσεις με πιο απομονωμένες φαινολικές ομάδες, όπως η μαλβιδίνη, η κύρια έγχρωμη ανθοκυανίνη στους ερυθρούς οίνους, το παρακουμαρικό οξύ και η ρεσβερατρόλη, οξειδώνονται σε υψηλότερα δυναμικά (Kilmartin et al., 2001).

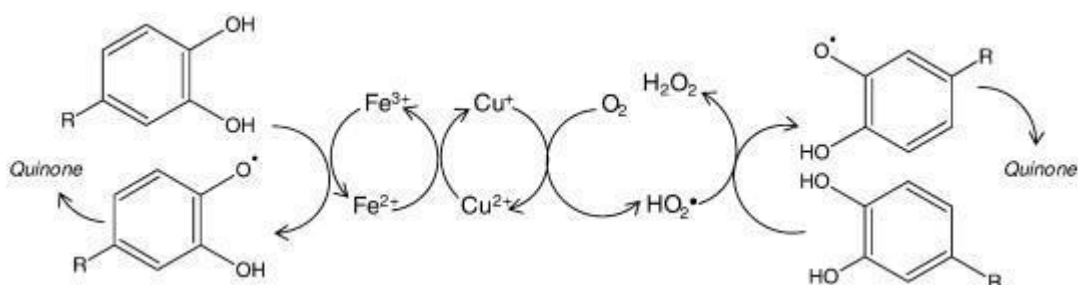
Αναλυτικότερα, κατά τη διαδικασία της μη ενζυμικής οξείδωσης του οίνου, οι ο-διφαινόλες οξειδώνονται σε ο-κινόνες και μπορεί να παραχθούν ελεύθερες ρίζες ημικινόνης, ενώ το οξυγόνο ανάγεται σε H_2O_2 . Οι κινόνες που σχηματίζονται κατά τη διαδικασία ως πρωτογενή προϊόντα είναι ασταθείς και μπορούν να υποστούν περαιτέρω αντιδράσεις. Οι αντιδράσεις αυτές, οι οποίες μπορεί να προκαλέσουν το σχηματισμό χρωστικών ουσιών, είναι παρόμοιες με εκείνες που λαμβάνουν χώρα κατά το ενζυμικό καστανό χρώμα παρά τις κινόνες από ενζυμική ή μη ενζυμική οξείδωση, για παράδειγμα αντιδράσεις συμπύκνωσης για το σχηματισμό έγχρωμων προϊόντων με υψηλό μοριακό βάρος ή αντιδράσεις αναγωγής για τη δημιουργία αρχικών φαινολών μέσω της παγίδευσης ατόμων υδρογόνου από άλλες ενώσεις



Εικόνα : Μη ενζυμική οξείδωση στο κρασί Πηγή : Danilewicz et al., (2008)

Οι κινόνες μπορούν αυθόρμητα να συνδυαστούν με πυρηνόφιλες ενώσεις (συμπεριλαμβανομένων ορισμένων φαινόλων, σουλφυδρυλικών ενώσεων και αμινών) λόγω της υψηλής ηλεκτρονικής τους συγγένειας και κατά τη διαδικασία αυτή τα παραγόμενα διμερή ή πολυμερή μπορούν να αναδιατάξουν τη δομή τους μέσω μιας αντίδρασης μετατροπής που μοιάζει με ενόλη και να σχηματίσουν νέες διφαινόλες (Zhai et al., 2001). Για παράδειγμα, ένα διμερές κινόνης-φαινόλης μπορεί να μετατραπεί σε ένα νέο διμερές διφαινόλης. Επιπλέον, τα παραγόμενα διμερή ή πολυμερή στη συζευγμένη οξείδωση έχουν χαμηλότερα δυναμικά οξειδοαναγωγής από τις αρχικές τους φαινόλες και είναι πολύ πιο εύκολα οξειδώσιμα. Αυτές οι αναγεννημένες ο-διφαινόλες θα οξειδώνονται ανανεώσιμα, επιταχύνοντας τελικά τις αντιδράσεις πολυμερισμού των φαινόλων.

Εν τω μεταξύ, παράγεται περισσότερο H_2O_2 και οξειδώνεται περισσότερη αιθανόλη σε ακεταλδεΐδη παρουσία μεταβατικών μετάλλων, και ορισμένες φαινόλες που δεν είναι εύκολο να οξειδωθούν αρχικά, φαίνονται ευαίσθητες στην οξείδωση μέσω της παραπάνω αναδιάταξης της δομής. Ωστόσο, οι Oszmianski κ.ά. (1996) θεώρησαν ότι η αναδιάταξη του κατεχινικού οξέος μπορεί να παρεμποδιστεί από ορισμένα πρόσθετα, όπως το διοξειδίο του πυριτίου, το βορικό οξύ, το τριχλωριούχο αργίλιο και ο οξικός ψευδάργυρος (II), και δεν μπορεί να συμβεί σε τιμές pH κάτω του 8. Η μη ενζυμική οξείδωση των φαινόλων συμβαίνει πολύ γρήγορα υπό αλκαλικές συνθήκες, αλλά πραγματοποιείται επίσης αργά σε όξινα μέσα όπως το κρασί σε κοινή πίεση και θερμοκρασία, ιδίως εάν υπάρχουν μεταλλικά ιόντα.



Εικόνα : Καταλυτική δράση των ιόντων σιδήρου και χαλκού στην οξείδωση των κατεχολών για την παραγωγή κινόνων και υπεροξειδίου του υδρογόνου Πηγή : Danilewicz et al., (2008)

Ο Danilewicz (2003) και στη συνέχεια οι Waterhouse και Laurie (2006) εξέτασαν τους προτεινόμενους μηχανισμούς με τους οποίους το οξυγόνο και τα ενδιάμεσα αναγωγικά προϊόντα του αντιδρούν με τα συστατικά του οίνου, καθώς και τη συμμετοχή των ιόντων μεταβατικών μετάλλων σε αυτές τις αντιδράσεις. Οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το οξυγόνο δεν αντιδρά άμεσα με τις φαινολικές ενώσεις χωρίς την παρουσία ιόντων μεταβατικών μετάλλων. Επιπλέον, είχε ήδη παρατηρηθεί παρέμβαση των ιόντων σιδήρου, χαλκού και μαγγανίου στην οξείδωση του οίνου (Cacho, Castells, Esteban, Laguna, & Sagristá, 1995).

Οι κινόνες που σχηματίζονται από την οξείδωση των πολυφαινολών, ως πρωτογενή προϊόντα, είναι ασταθείς και μπορούν να υποστούν περαιτέρω αντιδράσεις. Οι κινόνες μπορούν να συνδυαστούν αυθόρμητα με πυρηνόφιλες ενώσεις (συμπεριλαμβανομένων ορισμένων φαινολών, θειολών και αμινών) λόγω του υψηλού ηλεκτρόφιλου χαρακτήρα τους. Επιπλέον, τα παραγόμενα διμερή ή πολυμερή μπορούν να αναδιατάξουν τη δομή τους μέσω μιας αντίδρασης μετατροπής που μοιάζει με ενόλη και να σχηματίσουν νέα τμήματα διυδροξυβενζολίου (Li et al., 2008). Επιπλέον, αυτά τα διμερή ή πολυμερή σε συζευγμένες αντιδράσεις οξείδωσης έχουν χαμηλότερα δυναμικά οξειδοαναγωγής από τις αρχικές τους φαινόλες και οξειδώνονται πολύ πιο εύκολα (Li et al., 2008). Κατά συνέπεια, προτείνεται ότι η οξείδωση αυτών των προϊόντων έχει ως αποτέλεσμα την επιτάχυνση της διαδικασίας πολυμερισμού.

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε συνδυασμό με ιόντα σιδήρου παράγει ρίζες υδροξυλίου (HO^\cdot), η οποία είναι γνωστή ως αντίδραση Fenton. Η ρίζα υδροξυλίου είναι ένα αναγωγικό προϊόν του οξυγόνου και αναγνωρίζεται ότι οξειδώνει σχεδόν κάθε οργανικό μόριο που βρίσκεται στο κρασί (Waterhouse & Laurie 2006). Επιπλέον, λόγω της μη εκλεκτικότητας της θα αντιδράσει με τα πρώτα είδη που θα συναντήσει, ανάλογα με τη συγκέντρωσή τους όπως η αιθανόλη, το τρυγικό οξύ, η γλυκερόλη, τα σάκχαρα και τα οργανικά οξέα (Waterhouse & Laurie, 2006). Η οξείδωση κατά Fenton της αιθανόλης και του τρυγικού οξέος παράγει, αντίστοιχα, ακεταλδεΐδη και γλυοξυλικό οξύ ωστόσο, η οξείδωση του τρυγικού οξέος από ρίζες υδροξυλίου περιγράφηκε να παράγει διυδροξυφουμαρικό οξύ.

Αυτή η οξειδωτική οδός αποικοδόμησης επιβεβαιώθηκε από τον Clark (2008), όπου το διυδροξυφουμαρικό οξύ αντέδρασε το ίδιο με την (+)-κατεχίνη σε διάλυμα που μοιάζει με κρασί και οι κίτρινες χρωστικές που σχηματίστηκαν ταυτοποιήθηκαν ως κατιόντα

ξανθύλιου. Επιπλέον, η συγκέντρωση αυτών των χρωστικών αυξήθηκε εάν το οινικό σύστημα περιείχε επίσης 0,6 mg/L Cu²⁺. Τα αποτελέσματα καταδεικνύουν σαφώς μια σχέση μεταξύ της παραγωγής των κίτρινων χρωστικών κατιόντων ξανθυλίου από την (+)-κατεχίνη και της αποικοδόμησης του τρυγικού οξέος από ρίζες υδροξυλίου (Clark, 2008). Επιπλέον, η βουτάνιο-2,3-διόλη οξειδώνεται σε βουτάνιο-2-όνη, 3-υδροξυβουτάνιο-2-όνη και βουτάνιο-2,3-διόνη υπό συνθήκες Fenton. Τα α-υδροξυοξέα του οίνου αποτελούν επίσης υποστρώματα, το L(-)-γαλακτικό και το L(-)-μηλικό οξύ οξειδώνονται σε πυρουβικό και 2-οξοβουτανοδιοϊκό οξύ, αντίστοιχα.



Εικόνα : Αντίδραση Fenton Πηγή : Oliveira et al., (2011)

Οι δακτύλιοι του ορθο-διυδροξυβενζολίου οξειδώνονται σε κινόνες με διαδοχική μεταφορά δύο ατόμων υδρογόνου. Υπό κανονικές συνθήκες οίνου υπάρχει αργός ρυθμός των αντιδράσεων οξείδωσης των φαινολών. Από την άλλη πλευρά, τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται γρήγορα από τις φαινόλες στις ημικινόνες σε pH 7 και σε αλκαλικές συνθήκες ο οίνος αντιδρά πολύ πιο γρήγορα με το οξυγόνο (Singleton, Trousdale, & Zaya, 1979).

Ο ρυθμός αντίδρασης των φαινολικών ενώσεων με ROS εξαρτάται από την ικανότητά τους να σχηματίζουν μια σταθερή ρίζα προϊόντος. Όπως είδαμε προηγουμένως, οι πολυφαινόλες που περιέχουν τμήματα 1,2-διυδροξυβενζολίου ή 1,2,3-τριυδροξυβενζολίου οξειδώνονται εύκολα, επειδή η προκύπτουσα ρίζα φαινοξυλημικινόνης μπορεί να σταθεροποιηθεί από ένα δεύτερο άτομο οξυγόνου. Επιπλέον, σχεδόν όλες οι φαινολικές ενώσεις του οίνου είναι πολύ δραστικές προς τη ρίζα υδροπεροξυλίου. Οι μονοφαινόλες και οι ισοδύναμοι δακτύλιοι μεταδιυδροξυβενζολίου και οι υποκατεστημένες φαινόλες (ιδίως τα μεθοξυπαράγωγα) δεν οξειδώνονται τόσο εύκολα, επειδή δεν παράγουν σταθεροποιημένες ρίζες ημικινόνης. Με τον ίδιο τρόπο, η μαλβιδίνη-3-γλυκοσίδη, η κύρια ανθοκυανίνη που υπάρχει στο κόκκινο κρασί, δεν οξειδώνεται εύκολα. Οι ολιγομερείς και πολυμερείς φαινολικές ενώσεις (προκυανιδίνες και συμπυκνωμένες ταννίνες) αντιδρούν παρόμοια με τις ROS όπως τα μονομερή παράγωγα κατεχόλης (Waterhouse & Laurie, 2006).

Η παρουσία φαινολικών ριζών στο κόκκινο κρασί έχει υποστηριχθεί από μελέτες φασματοσκοπίας συντονισμού σθένους ηλεκτρονίων (ESR). Οι ερευνητές ανίχνευσαν

σταθερές ελεύθερες ρίζες σε κόκκινους και λευκούς οίνους (Troup & Hunter, 2002). Πρόσφατες μελέτες με παγίδες σπιν ανίχνευσαν ρίζα 1-υδροξυλαιθυλίου που φαίνεται να προκύπτει από την οξειδωση της αιθανόλης μέσω της ρίζας υδροξυλίου, παρέχοντας έτσι την πρώτη άμεση απόδειξη της αντίδρασης Fenton στον οίνο (Elias, Andersen, Skibsted, & Waterhouse, 2009).

Επιπλέον, η προσθήκη σιδήρου, χαλκού ή συνδυασμού σιδήρου και χαλκού σε ένα κόκκινο κρασί είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση του σχηματισμού προσθετικών προϊόντων σθένους. Η προσθήκη κατεχίνης σε λευκό κρασί που περιείχε περίσσεια διοξειδίου του θείου δεν είχε καμία επίδραση στον αρχικό ρυθμό σχηματισμού ριζών, αλλά ήταν προοξειδωτική στα τελευταία στάδια του πειράματος. Τέλος, αποδείχθηκε ότι το διοξείδιο του θείου αναστέλλει το σχηματισμό ριζών με τρόπο που εξαρτάται από τη συγκέντρωση (Elias, Andersen, Skibsted, & Waterhouse, 2009). Πιο πρόσφατα, η καταλυόμενη από μέταλλα αναγωγή του H_2O_2 , μέσω της αντίδρασης Fenton, επιβεβαιώθηκε ότι αποτελεί βασικό βήμα στη μη ενζυμική οξειδωση του οίνου, αποδίδοντας σε ρίζες υδροξυλίου ικανές να οξειδώσουν την αιθανόλη σε ακεταλδεΐδη σε ένα πρότυπο σύστημα οίνου (Elias, Andersen, & Waterhouse, 2010).

2.4 Οξειδωτική αμαύρωση

Οι φαινόλες, ιδίως οι ο-διφαινόλες, είναι υπεύθυνες για το οξειδωτικό καφέ χρώμα του οίνου. Το καφέτιασμα (ή αλλιώς η αμαύρωση) του οίνου μπορεί να ταξινομηθεί σε ενζυμικό καφέτιασμα και μη ενζυμικό καφέτιασμα από την άποψη του μηχανισμού έναρξης της διαδικασίας. Το ενζυματικό καφέτιασμα συμβαίνει σχεδόν εξ ολοκλήρου στο γλεύκος σταφυλιών- το δεύτερο μπορεί να συμβεί τόσο στο γλεύκος σταφυλιών όσο και στον οίνο, ενώ ως αποτέλεσμα της ζύμωσης και ορισμένων επεμβάσεων επικρατεί στον οίνο.

Η **ενζυμική οξείδωση** των φαινολών, ιδίως παρουσία ατμοσφαιρικού οξυγόνου και πολυφαινολοξειδάσης (PPO), λαμβάνει χώρα στα πρώτα στάδια της επεξεργασίας και είναι γνωστό ότι αποτελεί αιτία μαυρίσματος των τροφίμων. Στα άθικτα κύτταρα των νωπών ιστών φρούτων ή λαχανικών, οι φαινόλες που βρίσκονται κυρίως στο κενό και οι οξειδοαναγωγάσες που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα δεν μπορούν να συναντηθούν λόγω των διαφορετικών συστημάτων κυτταρικών μεμβρανών, ενώ το

ενζυμικό μαύρισμα θα προκύψει μόλις τα κύτταρα υποστούν μώλωπες ή τραυματιστούν στον αέρα.

Οι κύριες οξειδοαναγωγάσες που είναι υπεύθυνες για το μαύρισμα κατά την επεξεργασία των σταφυλιών είναι η PPO και η υπεροξειδάση (POD) (Li et al., 2005). Η PPO είναι ένα ένζυμο που περιέχει χαλκό και είναι ικανή να οξειδώνει υποστρώματα χαρακτηριστικά για την τυροσινάση και τη λακκάση. Η τυροσινάση, που ονομάζεται επίσης κατεχολάση, παράγεται φυσικά στα μούρα των σταφυλιών και μπορεί να καταλύσει την οξείδωση των μονοφαινολών και των ο-διφαινολών. Ωστόσο, η λακκάση (E.C. 1.10.3.2) παράγεται από μούχλες και είναι ικανή να οξειδώνει πολλά υποστρώματα, ιδίως 1,2- και 1,4-διυδροξυφαινένιο.

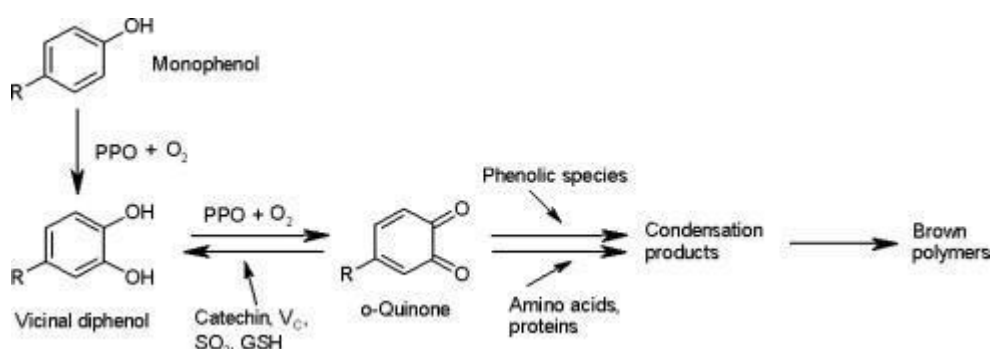
Η PDO είναι ένα ένζυμο που περιέχει Fe και η δραστηριότητά του εξαρτάται από το διαθέσιμο υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) στο μέσο. Ωστόσο, το μαύρισμα που προκαλείται από την POD φαίνεται ασήμαντο στα φρούτα με λίγες εξαιρέσεις, όπως το λίτσι και ο ανανάς και ορισμένοι ερευνητές διαπίστωσαν ότι ενισχύει την αποικοδόμηση των φαινολών όταν συνυπάρχει με την PPO (Robards et al., 1999).

Στο γλεύκος των σταφυλιών, το ενζυμικό μαύρισμα συσχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με την περιεκτικότητα σε υδροξυλοκινναμάτες, όπως το καφεοϊλταρταρικό οξύ (καφταρικό οξύ) και το p-κουμαροϊλταρταρικό οξύ (κουταρικό οξύ), και προάγεται από τις φλαβανόλες. Το καφταρικό οξύ ή το p-κουμαρικό οξύ οξειδώνεται από την PPO για την παραγωγή καφεοϊλταρταρικών ο-κινονών (CTAQ), οι οποίες είναι ισχυρά οξειδωτικά και ικανά να οξειδώσουν άλλες ενώσεις στον οίνο προκαλώντας μεγάλες αλλαγές στον τόνο και την ένταση του χρώματος του οίνου ανάλογα με τις φαινόλες και τις αντιδραστικές καταστάσεις.

Εν τω μεταξύ, οι ο-κινόνες που παράγονται κατά την ενζυμική οξείδωση θα προχωρήσουν σε περαιτέρω αντιδράσεις ανάλογα με τις οξειδοαναγωγικές τους ιδιότητες και τις ηλεκτρονικές τους συγγένειες: (1) Πρώτον, η υδροξυλίωση των μονοφαινολών σε ο-διφαινόλες και των διφαινολών σε ο-κινόνες λαμβάνει χώρα με ταχείες συζευγμένες οξειδώσεις των κινονών με άλλο μόριο φαινόλης που οδηγούν στο σχηματισμό διμερών ή στην αναγέννηση των αρχικών φαινολών, η οποία καταλύεται από οξύ. (2) Οι παραγόμενες κινόνες μπορούν επίσης να πολυμεριστούν και να συμπυκνωθούν με πολλές άλλες ενώσεις (συμπεριλαμβανομένων φαινολικών και μη

φαινολικών ειδών) και τελικά σχηματίζουν καφέ χρωστικές, η οποία επιταχύνεται από υψηλότερο pH.

Όντας οξειδωτικά, οι ο-κινόνες μπορούν σχεδόν να οξειδώσουν οποιοδήποτε υπόστρωμα με χαμηλότερο δυναμικό, όπως άλλες φαινόλες, ασκορβικό οξύ και SO₂, και τέτοιες κινόνες ανάγονται στις αρχικές τους φαινόλες κατά τη διαδικασία- ως ηλεκτρόφιλες, μπορούν να αντιδράσουν με αμινοπαράγωγα και νερό- από την άλλη πλευρά, οι ο-κινόνες μπορούν να αντιδράσουν με κατάλληλες υδροκινόνες, πιθανώς υποβάλλοντας αντιδράσεις συμπύκνωσης και πολυμερισμού αργά, και οδηγούν στην παραγωγή καστανών χρωστικών.



Εικόνα 2.4 : Ενζυματική αμαύρωση του μούστου Πηγή : Li et al., (2008)

Γενικά, δεν είναι όλες οι ενζυμικές οξειδώσεις που συμβαίνουν στο γλεύκος λευκών σταφυλιών κακές για το τελικό προϊόν. Για παράδειγμα, η υπεροξυγόνωση του λευκού γλεύκους μειώνει το δυναμικό μαυρίσματος του οίνου με δύο τρόπους: την εξαφάνιση της τυροσινάσης και την εξάντληση των οξειδώσιμων φαινολικών υποστρωμάτων κατά τη διάρκεια των αντιδράσεων οξείδωσης (Ribéreau-Gayon, Dubourdieu, et al., 2006)- το σχηματισμό γλουταθειονυλοκαφταρικών οξέων (GRP) που είναι ανθεκτικό σε περαιτέρω μαυρίσματος (Main, 1992). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οίνους με χαμηλή περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες και υψηλή περιεκτικότητα σε GRP και οι οίνοι αυτοί είναι πιο σταθεροί από τους οίνους που παρασκευάζονται από μη οξειδωμένο χυμό, στους οποίους διατηρούνται υψηλές πολυφαινόλες με υψηλό δυναμικό μαυρίσματος. Ωστόσο, κατά την επεξεργασία των ερυθρών οίνων η επίδραση της ενδογενούς ενζυμικής οξείδωσης είναι περιορισμένη, αλλά από την άλλη πλευρά η χημική οξείδωση (μη ενζυμική οξείδωση) επηρεάζει έντονα τη διαδικασία ωρίμανσης του οίνου (Cheynier, Fulcrand, & Moutounet, 2000).

Η μη ενζυμική οξείδωση, που ονομάζεται επίσης χημική οξείδωση, επικρατεί στο κρασί με τα χαρακτηριστικά της αναγέννησης και της αυτοκατάλυσης, ενώ μπορεί επίσης να συμβεί μέσω της άμεσης αντίδρασης με το φως (Main, 1992). Οι ο-διφαινόλες, που περιλαμβάνουν κυρίως το καφεϊκό οξύ και τους εστέρες του, την κατεχίνη, την επικατεχίνη, τις ανθοκυανίνες και τα παράγωγά τους και το γαλλικό οξύ, θεωρούνται οι πιο ευαίσθητες στην οξείδωση κατά τη μη ενζυμική διαδικασία μαυρίσματος και τα επίπεδα των φλαβαν-3-ολών συσχετίζονται πιο σημαντικά με το βαθμό μαυρίσματος των περισσότερων λευκών οίνων.

Το μη ενζυμική καφέτιασμα των οίνων μπορεί να προκύψει μέσω διαφόρων μονοπατιών που σχετίζονται με τις φαινόλες, και ένα από αυτά είναι η οξείδωση των φαινολών και ο επακόλουθος πολυμερισμός των οξειδωμένων προϊόντων, η πρώτη διαδικασία καταλύεται από χαλκό και σίδηρο. Άλλες οδοί περιλαμβάνουν αντιδράσεις πολυμερισμού μεταξύ φαινολών και άλλων ενώσεων που υπάρχουν στον οίνο, συμπεριλαμβανομένης της συμπύκνωσης με ακεταλδεΐδη ή γλυοξυλικό οξύ (που προέρχεται από την οξείδωση του τρυγικού οξέος). Ορισμένοι ερευνητές δηλώνουν ότι η συμπύκνωση με την ακεταλδεΐδη είναι μια μοναδική αντίδραση, που υπάρχει γενικά στους οίνους sherry, διότι η συνολική συγκέντρωση ακεταλδεΐδης που παράγεται από τις ζύμες flor μπορεί να φτάσει τα 300 mg/L κατά τη διάρκεια της παλαίωσης (Merida et al., 2005). Ωστόσο, η οξείδωση της αιθανόλης καταλύομενη από μεταβατικά μέταλλα ή μέσω συζευγμένης οξείδωσης φαινολών μπορεί επίσης να παράγει κάποια ακεταλδεΐδη στον οίνο

2.5 Μηχανισμός κι ενώσεις υποστρώματα οξείδωσης

2.5.1 Φαινολικές ενώσεις

Τα συστατικά τόσο των ερυθρών όσο και των λευκών οίνων είναι ικανά να αντιδράσουν με σημαντικές ποσότητες οξυγόνου, με τις πολυφαινόλες να συγκαταλέγονται μεταξύ των πιο εύκολα οξειδώσιμων συστατικών του οίνου.

Οι πολυφαινολικές ουσίες του οίνου συνήθως υποδιαιρούνται σε δύο ομάδες: τα φλαβονοειδή και τις μη φλαβονοειδείς ενώσεις.

Οι ερυθροί οίνοι περιέχουν πολυφαινόλες σε υψηλότερη συγκέντρωση (1 έως 5 g/L) από ό,τι οι λευκοί οίνοι (0,2 έως 0,5 g/L), ιδιαίτερα πολύ υψηλότερα επίπεδα φλαβαν-3-ολών και προκυανιδινών. Ορισμένες από τις διαπιστωμένες επιδράσεις της

προσθήκης O₂ στον ερυθρό οίνο περιλαμβάνουν μείωση των φαινολικών ενώσεων, όπως η (+)-κατεχίνη, η (-)-επικατεχίνη, η κερκετίνη, το καφεϊκό οξύ και οι ανθοκυανίνες, και αύξηση των ερυθρών πολυμερών χρωστικών που βελτιώνουν την πυκνότητα του χρώματος του οίνου.

Επιπλέον, έχει διαπιστωθεί ότι η οξυγόνωση θα μπορούσε να βελτιώσει την εξέλιξη των ερυθρών οίνων κατά τη διάρκεια της παλαίωσης, αλλά και να μειώσει την ποσότητα ορισμένων μονομερών και ολιγομερών φαινολικών ενώσεων που σχετίζονται με οφέλη για την υγεία (Castellari et al., 2000).

Ομοίως, αρκετές πρόσφατες αναφορές σχετικά με τις επιπτώσεις της μικρο-οξυγόνωσης σε ερυθρούς οίνους έχουν επιβεβαιώσει την απώλεια μονομερών ανθοκυανών και άλλων πολυφαινολών, μαζί με το σχηματισμό πολυμερών χρωστικών ουσιών, ανθεκτικών στη λεύκανση με διοξείδιο του θείου (SO₂), συχνά με αύξηση της πυκνότητας του χρώματος του οίνου (De Beer et al., 2008).

Πρόσθετες αλλαγές στις χρωστικές ουσίες του ερυθρού οίνου περιλαμβάνουν το σχηματισμό ενώσεων μεθυλομεθίνης-ανθοκυανίνης-κατεχίνης και ενώσεων πυρανοανθοκυανίνης-κατεχίνης με τη μεσολάβηση της ακεταλδεΐδης που απελευθερώνεται κατά τις διαδικασίες οξείδωσης του οίνου (οξείδωση της αιθανόλης).

Οι λευκοί οίνοι περιέχουν χαμηλότερα επίπεδα πολυφαινολών, κυρίως υδροξυκιναμωμικών οξέων αλλά αυτές παραμένουν πολύ σημαντικές για θέματα που σχετίζονται με την οξείδωση, το καφέ χρώμα του οίνου και τις απώλειες του ποικιλιακού αρώματος. Οι χαμηλές συγκεντρώσεις φλαβονοειδών, όπως οι γλυκοζίτες κατεχίνης και κερκετίνης, παραμένουν σημαντικές ιδιαίτερα για το καφέτιασμα του οίνου και είναι περισσότερο διαδεδομένες σε γλεύκη που εκτίθενται σε μεγαλύτερους χρόνους επαφής με το δέρμα και σε σκληρότερες συνθήκες έκθλιψης.

2.5.1.1 Μη φλαβονοειδής ενώσεις

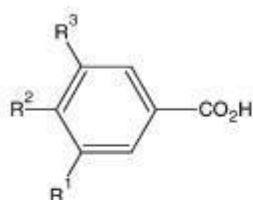
Οι μη φλαβονοειδείς ενώσεις είναι κυρίως παράγωγα του βενζοϊκού οξέος και του κινναμωμικού οξέος.

Μια άλλη κατηγορία μη φλαβονοειδών στα σταφύλια περιλαμβάνει τα στυλβένια και τους γλυκοζίτες στυλβένιου, με την trans-ρεσβερατρόλη να αποτελεί το πιο γνωστό παράδειγμα. Μια διαφορετική κατηγορία μη φλαβονοειδών είναι οι υδρολύσιμες τανίνες.

Στο κρασί, οι ενώσεις αυτές προέρχονται από τη δρυ και τα επίπεδά τους είναι κοντά στα 100 mg/L για λευκά κρασιά που παλαιώνουν για περίπου 6 μήνες σε βαρέλι, ενώ τα ερυθρά κρασιά θα έχουν επίπεδα της τάξης των 250 mg/L, μετά από παλαίωση δύο ή περισσότερων ετών.

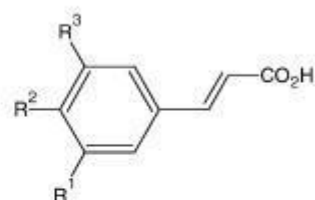
(b) Non - Flavonoids

Derivates of benzoic and cinnamic acid



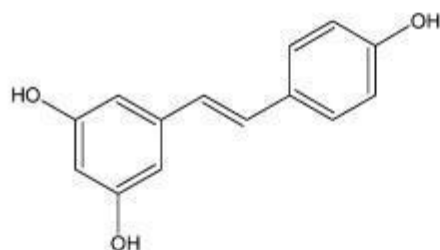
Benzoic acid
p-Hydroxybenzoic acid
 Protocatechuic acid
 Vanillic acid
 Gallic acid
 Syringic acid

R ¹	R ²	R ³
H	H	H
H	OH	H
OH	OH	H
OCH ₃	OH	H
OH	OH	OH
OCH ₃	OH	OCH ₃



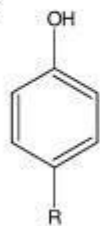
Cinnamic acid
p-Coumaric acid
 Caffeic acid
 Ferulic acid
 Sinapic acid

Stilbenes

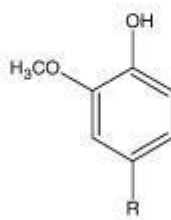


trans-Resveratrol

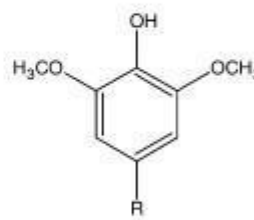
Volatile Phenols



Ethylphenol (*R*=CH₂CH₃)
 Vinylphenol (*R*=CHCH₂)



Guaiacol (*R*=H)
 Methylguaiacol (*R*=CH₃)
 Ethylguaiacol (*R*=CH₂CH₃)
 Vinylguaiacol (*R*=CHCH₂)



Syringol (*R*=H)
 Methylsyringol (*R*=CH₃)

Εικόνα 2.5.1.1 : Κατηγορίες μη φλαβονοειδών ενώσεων Πηγή : Oliveira et al., (2011)

➤ Ταννίνες

Τα επίπεδα των προανθοκυανιδινών ή συμπυκνωμένων τανινών κυμαίνονται μεταξύ 1 g/L και 4 g/L στους ερυθρούς οίνους ενώ στους λευκούς οίνους τα επίπεδα κυμαίνονται

μεταξύ 100 mg/L και εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τις τεχνικές έκθλιψης (Glories et al., 2000).Όσον αφορά τις οργανοληπτικές ιδιότητες αυτών των ενώσεων, οι μονομερείς κατεχίνες είναι πικρές, ενώ τα πολυμερή είναι ουσιαστικά στυπτικές.

Οι υδρολύσιμες ταννίνες είναι εστέρες του γαλλικού οξέος (γαλλοταννίνες) και του ελλαγικού οξέος (ελλαγιταννίνες) με γλυκόζη ή συναφή σάκχαρα.

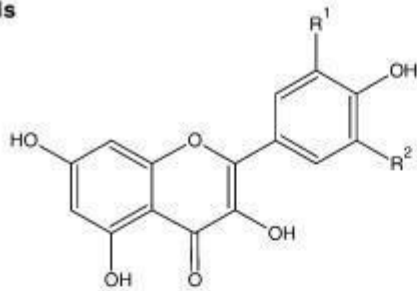
2.5.1.2 Φλαβονοειδείς ενώσεις

Αντίθετα από τις μη φλαβονοειδείς ενώσεις, οι φλαβονοειδής ενώσεις έχουν έναν κοινό πυρήνα, τον φλαβανικό πυρήνα, ο οποίος αποτελείται από δύο δακτυλίους βενζολίου (A και B) που συνδέονται με έναν πυρανικό δακτύλιο (C) που περιέχει οξυγόνο (C6C3C6). Οι διαφορές στο βαθμό οξειδωσης του ετεροκυκλικού δακτυλίου (C) και της υδροξυλίωσης/μεθοξυλίωσης των τριών δακτυλίων έχουν ως αποτέλεσμα μια μεγάλη οικογένεια δομών με ουσιαστικές διαφορές στις φυσικοχημικές ιδιότητες και τη σταθερότητα.

. Οι πιο κοινές φλαβονοειδείς ενώσεις του οίνου είναι οι φλαβονόλες (καεμφερόλη, κερκετίνη και μυρικετίνη), οι φλαβαν-3-όλες (κατεχίνη, επικατεχίνη και τανίνες) και οι ανθοκυανίνες (κυανιδίνη-3-γλυκοσίδη, πεονιδίνη-3-γλυκοσίδη, δελφινιδίνη-3-γλυκοσίδη, πετουνιδίνη-3-γλυκοσίδη και μαλβιδίνη-3-γλυκοσίδη).

(a) Flavonoids

Flavonols

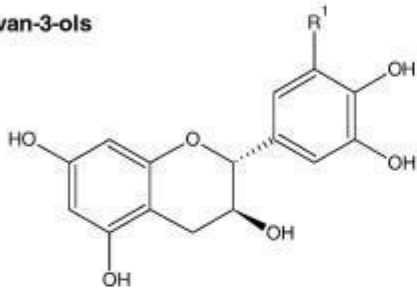


Kaempferol ($R^1=R^2=H$)

Quercetin ($R^1=OH, R^2=H$)

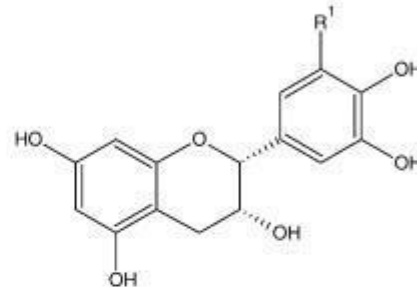
Myricetin ($R^1=R^2=OH$)

Flavan-3-ols



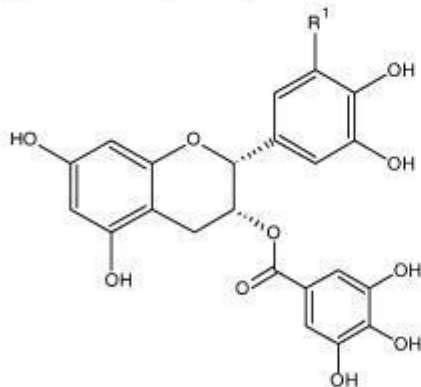
(+)-Catechin ($R^1=H$)

(+)-Gallocatechin ($R^1=OH$)



(-)-Epicatechin ($R^1=H$)

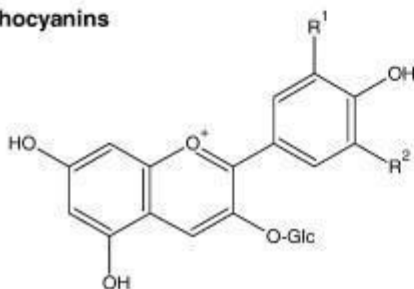
(-)-Epigallocatechin ($R^1=OH$)



(-)-Epicatechin gallate ($R^1=H$)

(-)-Epigallocatechin gallate ($R^1=OH$)

Anthocyanins



Cyanidin 3-glucoside ($R^1=OH, R^2=H$)

Peonidin 3-glucoside ($R^1=OCH_3, R^2=H$)

Delphinidin 3-glucoside ($R^1=R^2=OH$)

Petunidin 3-glucoside ($R^1=OH, R^2=OCH_3$)

Malvidin 3-glucoside ($R^1=R^2=OCH_3$)

Εικόνα 2.5.1.2 : Κατηγορίες φλαβονοειδών ενώσεων Πηγή : Oliveira et al., (2011)

2.5.2. Φλαβονόλες

Η συγκέντρωση των φλαβονοειδών στον οίνο επηρεάζεται έντονα από τις πρακτικές οινοποίησης, όπως η έκθλιψη και η εκχύλιση, οι οποίες επηρεάζουν τον βαθμό

εκχύλισης από τα φλούδια και ιδιαίτερα από τους σπόρους που είναι πλούσιοι σε μονάδες φλαβαν-3-όλης.

2.5.2.1 Φλαβαν-3-όλες

Οι φλαβαν-3-όλες βρίσκονται στα στερεά μέρη του μούρου (σπόρος, φλούδα και μίσχος) σε μονομερείς, ολιγομερείς ή πολυμερείς μορφές. Οι δύο τελευταίες μορφές είναι επίσης γνωστές ως προανθοκυανιδίνες ή συμπυκνωμένες τανίνες.

Ενώ οι ταννίνες των γιγάρτων είναι ολιγομερή και πολυμερή που αποτελούνται από τις μονομερείς φλαβαν-3-όλες (+)-κατεχίνη, (-)-επικατεχίνη και (-)-επικατεχίνη γαλλική, οι ταννίνες του φλοιού περιέχουν επίσης (-)-επιγαλλοκατεχίνη και ίχνη (+)-γαλλοκατεχίνης και (-)-γαλλικής επιγαλλοκατεχίνης.

Τα γίγαρτα περιέχουν υψηλότερες συγκεντρώσεις μονομερών, ολιγομερών και πολυμερών φλαβαν-3-ολών από ό,τι οι φλοιοί.

2.5.2.2 Ανθοκυάνες

Οι ανθοκυάνες είναι οι φυσικές χρωστικές που εντοπίζονται στους οίνους και αποτελούν μερικά από τα σημαντικότερα συστατικά του. Αυτές οι χημικές ουσίες βρίσκονται κυρίως στους φλοιούς των κόκκινων σταφυλιών κατά την ωρίμανση, αν και βρίσκονται επίσης στη σάρκα των ποικιλιών "teinturier". Πολλές μεταβλητές μπορούν να επηρεάσουν την παραγωγή ανθοκυανών στα σταφύλια, συμπεριλαμβανομένης της προέλευσης και του τύπου της αμπέλου, του βαθμού ωριμότητας και των περιβαλλοντικών συνθηκών, όπως η θερμοκρασία, η διαθεσιμότητα νερού και η έκθεση και ένταση του φωτός (Guidoni et al., 2008).

Οι ανθοκυάνες βρίσκονται ενωμένες με μόρια γλυκόζης (δηλαδή σε γλυκοζυλιωμένη μορφή). Οι 3-O-(6''-p-κουμαροϋλο)-γλυκοζίτες, οι 3-O-(6''-ακετυλο)-γλυκοζίτες και οι 3-O-(6-καφεοϋλο)-γλυκοζίτες της δελφινιδίνης, της πετουνιδίνης, της πεονιδίνης και της μαλβιδίνης είναι οι πιο συχνές ακυλιωμένες ανθοκυανίνες στο σταφύλι *V. vinifera*. Επιπλέον, έχουν ανακαλυφθεί διμερή ανθοκυανίνης (διμερές μαλβιδίνης-3-O-γλυκοζίτη και μαλβιδίνης-3-O-γλυκοζίτη-πεονιδίνης-3-O-γλυκοζίτη) σε φλούδες σταφυλιών. Η ύπαρξη αυτών των ακετυλιωμένων μορφών είναι κρίσιμη για το χρώμα και την ένταση των οίνων (Yonekura-Sakakibara et al., 2008). Η ένταση του χρώματος αυξάνεται όσο αυξάνεται ο αριθμός των υποκατεστημένων ομάδων στον δακτύλιο B (οι δι-οξυγονωμένες μορφές είναι πιο κόκκινες, ενώ οι τρι-οξυγονωμένες μορφές είναι

πιο μωβ) και όταν οι υδροξυλομάδες αντικαθίστανται από μεθοξυλομάδες (π.χ. η μαλβιδίνη έχει το πιο σκούρο χρώμα). Επιπλέον, οι μεθοξυλιωμένες ανθοκυανίνες (μαλβιδίνη και πεονιδίνη) είναι πιο ανθεκτικές στις περιβαλλοντικές και αμπελουργικές επιδράσεις από τις υδροξυλιωμένες ανθοκυανίνες. Οι ανθοκυανίνες μπορούν επίσης να βρεθούν ως 3,5-O-διγλυκοσίδες ή ακυλιωμένες 3,5-O-διγλυκοσίδες (Nygaard et al., 2003).

Κεφάλαιο 3ο

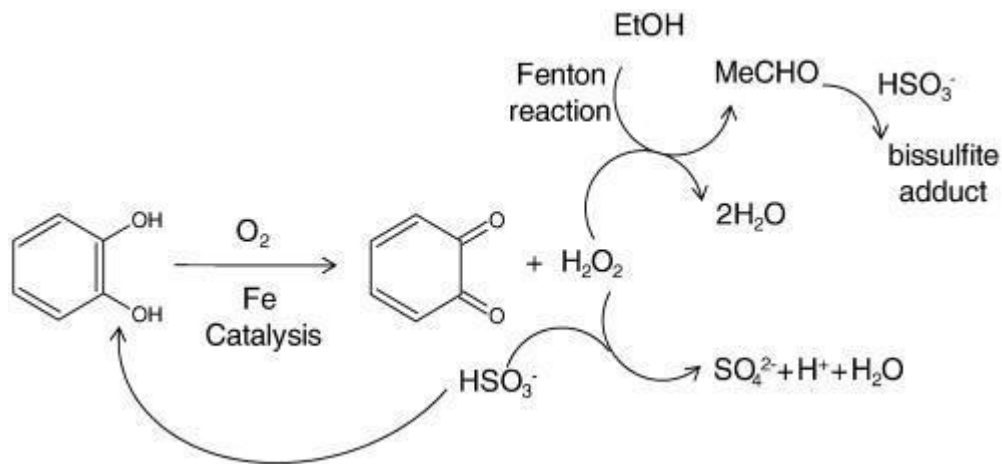
Αντιοξειδωτική προστασία οίνων

3.1 Χρήση θειώδους (SO₂)

Το διοξείδιο του θείου (SO₂) χρησιμοποιείται ευρέως από την έκθλιψη έως την εμφιάλωση, ιδίως στους λευκούς οίνους, για την προστασία του γλεύκους και των οίνων. Οι αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές δραστηριότητες είναι οι δύο σημαντικότερες ιδιότητες του SO₂. Προστατεύει τον οίνο από το καφέτιασμα και ρυθμίζει την ανάπτυξη επιβλαβών ζυμομυκήτων και βακτηρίων στον οίνο. Το SO₂ έχει επίσης την ικανότητα να συμμετέχει σε αντιδράσεις προσθήκης με καρβονυλικές ενώσεις για να σχηματίσει μη πτητικά δισουλφιτικά προσδέματα και έτσι να αποτρέψει δυσάρεστες οργανοληπτικές ιδιότητες.

Οι συγκεντρώσεις του προστιθέμενου SO₂ στον οίνο κυμαίνονται γενικά από 50 έως 200 mg/L. Στον οίνο υπάρχει ισορροπία μεταξύ μοριακών και ιοντικών μορφών διοξειδίου του θείου. Στο pH του οίνου, το 94 έως 99% υπάρχει στην ιοντική μορφή ως δισουλφιτικό ιόν HSO³⁻ και έτσι μόνο ένα μικρό ποσοστό είναι παρόν ως ελεύθερο SO₂. Μόλις βρεθεί στο διάλυμα του οίνου, το διοξείδιο του θείου μπορεί να συνδεθεί με διάφορα μόρια, όπως η ακεταλδεΰδη, οι ανθοκυανίνες, το πυρουβικό οξύ, το γλουταρικό οξύ, η γλυκόζη ή οι φαινολικές ενώσεις, ιδίως το καφεϊκό οξύ και το παρακουμαρικό οξύ. Συνήθως υπάρχουν δύο κλάσματα SO₂ στον οίνο, το "ελεύθερο SO₂", που αναφέρεται σε HSO³⁻ και SO₂, και το "δεσμευμένο SO₂", που υποδηλώνει το διοξείδιο του θείου που είναι κυρίως συνδεδεμένο με ακόρεστες ενώσεις.

Το διοξείδιο του θείου δεν αντιδρά άμεσα με το οξυγόνο, αλλά με την ανάγνη μορφή του οξυγόνου, το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Με αυτόν τον τρόπο, το SO₂ μπορεί να εμποδίσει τον σχηματισμό αλδεϋδών ανταγωνιζόμενο το υπεροξείδιο του υδρογόνου (Elias et al., 2010). Το SO₂ παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στην αναγωγή των κινόνων που σχηματίζονται κατά τη διαδικασία οξείδωσης πίσω στη φαινολική τους μορφή (Danilewicz et al., 2008).



Εικόνα 3.1 : Η αλληλεπίδραση του SO_2 με το υπεροξείδιο του υδρογόνου και τις κινόνες μετά την οξείδωση της κατεχόλης, αποτρέποντας έτσι την οξείδωση της αιθανόλης με την αντίδραση Fenton. Πηγή : Oliveira et al., (2011)

Σε ένα σύστημα μοντέλου κρασιού με 4-μεθυλοκατεχόλη (4-MeC) σε συγκέντρωση που προσομοιάζει την αναγωγική ικανότητα του κόκκινου κρασιού, δεν παρατηρείται σημαντική οξείδωση του SO_2 χωρίς την προσθήκη ιόντων σιδήρου και χαλκού. Εάν η κατεχόλη είχε οξειδωθεί, θα είχε παραχθεί υπεροξείδιο του υδρογόνου και θα είχε αντιδράσει με το SO_2 .

Παρουσία και των δύο ιόντων μετάλλων ο ρυθμός οξείδωσης του SO_2 αυξάνεται σημαντικά και εξαρτάται από τη συγκέντρωση της κατεχόλης. Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν την καθοριστική σημασία των ιόντων μετάλλων που επιτρέπουν την οξείδωση των πολυφαινολών και ότι ο ρυθμός κατανάλωσης SO_2 εξαρτάται από τον ρυθμό οξείδωσης της κατεχόλης. Προσθέτοντας ιόντα σιδήρου και χαλκού ξεχωριστά, παρατηρείται μόνο μια μέτρια αύξηση του ρυθμού οξείδωσης της κατεχόλης. Ωστόσο, όταν συνδυάζονται, παρατηρείται έντονος συνεργισμός και ο ρυθμός γίνεται τότε πολύ ευαίσθητος στη συγκέντρωση χαλκού. Προτείνεται ότι ο χαλκός, αλληλεπιδρώντας με το οξυγόνο, διευκολύνει τον οξειδοαναγωγικό κύκλο του σιδήρου. Η έκθεση ερυθρών οίνων στις παραπάνω συνθήκες έδωσε παρόμοια αποτελέσματα όσον αφορά την οξείδωση του SO_2 (Danilewicz, 2007). Η μοριακή αναλογία αντίδρασης οξυγόνου και SO_2 είναι 1:2, η οποία συνάδει με ένα μοριακό ισοδύναμο SO_2 που αντιδρά με υπεροξείδιο του υδρογόνου και ένα δεύτερο με την κινόνη. Επιπλέον, η μοριακή αναλογία αντίδρασης οξυγόνου/ SO_2 που βρέθηκε στους ερυθρούς οίνους ήταν 1:~1,7, γεγονός που υποδηλώνει ότι ορισμένες πυρηνόφιλες ουσίες μπορεί να ανταγωνίζονται

με το δισουλφίτη για τις κινόνες. Ο ρυθμός αντίδρασης του οξυγόνου με τα συστατικά του οίνου επιταχύνεται επίσης από το SO₂ στον κόκκινο οίνο.

Το SO₂ αναστέλλει την τυροσινάση και εμποδίζει την παραγωγή γλουταθειονυλοκαφταρικών οξέων (2-S-gluthathionyl caftaric acids, GRP), η οποία θα διατηρήσει ένα υψηλό επίπεδο ελεύθερων υδροξυκιναμικών με υψηλό δυναμικό μαυρίσματος. Επιπλέον, σε αντίθεση με την τυροσινάση, η λακκάση οξειδώνει εύκολα την GRP. Αποδείχθηκε ότι η GRP οξειδώνεται από τη λακκάση του *Botrytis cinerea* στην αντίστοιχη ορθο-κινόνη με αντικατάσταση της τελευταίας από γλουταθειόνη. Όταν δεν υπάρχει διαθέσιμη γλουταθειόνη, ο πολυμερισμός των κινόνων οδηγεί σε καφέτιασμα του μούστου. Έτσι είναι αποδεκτό ότι η τυροσινάση είναι πιο ευαίσθητη στο SO₂, ενώ η λακκάση είναι πιο ανθεκτική στο SO₂ και έχει ευρύτερο φάσμα υποστρωμάτων οξείδωσης.

3.2 Χρήση ασκορβικού οξέος

Το ασκορβικό οξύ υπάρχει φυσικά στα σταφύλια, αλλά συνήθως καταναλώνεται γρήγορα μετά τη σύνθλιψη, συνήθως λόγω της απορρόφησης του οξυγόνου ή της αναγωγής των παραγώγων ορθοκινόνης που σχηματίζονται από την ενζυματική οξείδωση των φαινολικών ενώσεων. Το ασκορβικό οξύ που υπάρχει στον λευκό οίνο οφείλεται κυρίως σε εξωγενείς προσθήκες, συχνά λίγο πριν από την εμφιάλωση, αν και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε διάφορα στάδια της διαδικασίας παραγωγής οίνου. Τα επίπεδα του προστιθέμενου ασκορβικού οξέος μπορεί να ποικίλλουν σημαντικά, αλλά συνήθως προστίθεται σε ποσοστά που κυμαίνονται από 50 έως 150 mg/L (Barril et al., 2009). Το ασκορβικό οξύ προστίθεται στο λευκό κρασί λόγω της ικανότητάς του να απομακρύνει αποτελεσματικά το μοριακό οξυγόνο, αλλά κατά τη διαδικασία αυτή μετατρέπεται αρχικά σε δεϋδροασκορβικό οξύ και υπεροξειδίο του υδρογόνου. Το δεϋδροασκορβικό οξύ στη συνέχεια υφίσταται ταχεία αποικοδόμηση σε μια ποικιλία ειδών, συμπεριλαμβανομένων πολυάριθμων καρβοξυλικών οξέων, κετονών και αλδεϋδών. Στην πραγματικότητα, το ασκορβικό οξύ είναι ιδιαίτερα αναγωγικό, καθώς το δυναμικό αναγωγής του υπολογίζεται σε ~ 210 mV (Ag/AgCl) σε pH 3,6 με κυκλική βολταμμετρία, πολύ χαμηλότερο από τις κοινές πολυφαινόλες (Kilmartin et al., 2001). Για το λόγο αυτό, και όταν προστίθεται ασκορβικό οξύ, είναι σημαντικό να υπάρχει επαρκής ποσότητα SO₂, για την απομάκρυνση του υπεροξειδίου του υδρογόνου και

την αντίδραση με τις διάφορες καρβονυλικές ενώσεις που προκύπτουν από την οξειδωση του ασκορβικού οξέος.

Η προσθήκη ασκορβικού οξέος στους οίνους Riesling και Chardonnay κατά την εμφιάλωση απέδειξε την επίδρασή της στο χρώμα του οίνου, καθώς η αξιολόγηση μεταξύ δύο εβδομάδων και δύο ετών μετά την εμφιάλωση έδειξε ότι οι οίνοι χωρίς προσθήκη ήταν πιο μελανοί και είχαν μεγαλύτερη συνολική ένταση χρώματος (Skouroumounis et al., 2005).

Αντίθετα, πρόσφατες μελέτες έδειξαν την αυξημένη παραγωγή φαινολικών χρωστικών ουσιών σε πρότυπα συστήματα οίνου από ασκορβικό οξύ και (+)-κατεχίνη και κατέδειξαν ότι ένα προϊόν αποικοδόμησης που προέρχεται από το ασκορβικό οξύ ήταν ικανό να αντιδράσει με την (+)-κατεχίνη και να σχηματίσει έγχρωμα κατιόντα ξανθιλίου (Barril et al., 2009).

Επιπλέον, μελετήθηκε η στερεοχημική επίδραση του ασκορβικού οξέος και του ερυθροβικού οξέος στις διαδικασίες οξειδωσης σε ένα πρότυπο σύστημα οίνου και οι χρωστικές του κατιόντος ξανθιλίου αναγνωρίστηκαν ως ο κύριος συντελεστής της ανάπτυξης χρώματος. Επίσης, επιβεβαιώθηκε η παραγωγή πρόδρομων χρωστικών ουσιών, που είχαν προηγουμένως ταυτοποιηθεί ως φουρανονοϋποκατεστημένες φλαβανόλες, και οι αντίστοιχες χρωστικές ουσίες κατιόντων ξανθιλίου ήταν χαμηλότερες παρουσία ερυθροβικού οξέος από ό,τι ασκορβικού οξέος (Clark et al., 2010).

3.3 Χρήση γλουταθειόνης (Glutathione, GLH)

Στην οξειδωση του μούστου, η αρχική πρόσληψη οξυγόνου από τα ορθοδιυδροξυβενζόλια επιβραδύνεται με την προσθήκη θειολών όπως η κυστεΐνη (Cys) ή η γλουταθειόνη (GSH). Όταν το καφταρικό οξύ οξειδώνεται στην αντίστοιχη κινόνη του από την τυροσινάση, η GSH αντιδρά γρήγορα με την κινόνη σχηματίζοντας ένα άχρωμο προϊόν που ονομάζεται προϊόν αντίδρασης σταφυλιού (GRP- 2-S-γλουταθειονυλοκαφταρικό οξύ), το οποίο δεν αποτελεί πλέον υπόστρωμα για περαιτέρω οξειδωση από την τυροσινάση. Επομένως, ο σχηματισμός της GRP πιστεύεται ότι περιορίζει το καφέ χρώμα του μούστου και εξαρτάται από τις σχετικές ποσότητες GSH. Η ανάλυση παλαιωμένων εμφιαλωμένων οίνων δείχνει ότι η GRP υδρολύεται αργά προς το παράγωγο GSH-καφεϊκό οξύ (ο τρυγικός εστέρας

υδρολύεται). Τα συγκεκριμένα καφέ προϊόντα δεν έχουν χαρακτηριστεί καλά, αλλά φαίνεται ότι οι υδροξυκιναμωμένες κινόνες αντιδρούν με τις φλαβαν-3-όλες και σχηματίζουν έγχρωμα προϊόντα.

Κεφάλαιο 4ο

Βασιλικός κ χαμομήλι

4.1 Βασιλικός (*Ocimum basilicum*)

4.1.1 Γενικά στοιχεία

Ο βασιλικός αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα βότανα σε παγκόσμιο επίπεδο που χρησιμοποιείται σε τρόφιμα καθώς και στην κουζίνα. Ο βασιλικός ευδοκimeί στις περιοχές από την Κεντρική Αφρική έως και την Νοτιο Ανατολική Ασία ενώ στα εύκρατα κλίματα ο βασιλικός είναι ετήσιο φυτό ενώ μπορεί να καλλιεργηθεί και σαν βραχύβιο πολυετές ή διετές φυτό σε πιο θερμές περιοχές.

Τα φύλλα του βασιλικού χρησιμοποιούνται ευρέως για αρωματικούς σκοπούς (Niir Board, 2005) σε σούπες, κρέας πίτες, πιάτα ψαριών, ορισμένα τυριά, σαλάτες ντομάτας, μαγειρεμένα αγγούρια, μαγειρεμένα μπιζέλια, κολοκύθια και φασολάκια, καθώς και σε ξύδια και έλαια. Ο ψιλοκομμένος βασιλικός μπορεί να πασπαλιστεί πάνω από τα παϊδάκια αρνιού πριν από το μαγείρεμα. Ο βασιλικός αποτελεί σημαντικό καρύκευμα για την τομάτα. και χρησιμοποιείται συχνά μαζί ή ως υποκατάστατο της ρίγανης στην πίτσα. γαρνιτούρες, σάλτσες σπαγγέτι, κεφτεδάκια ή σε μακαρόνια και τυρί.

4.1.2 Βοτανική ταξινόμηση

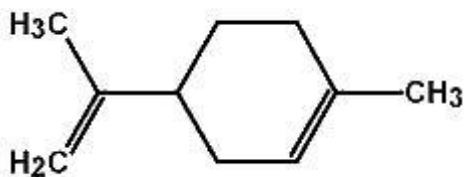
Το γένος *Ocimum* καλύπτει πάνω από 150 είδη βοτάνων και θάμνων (Lachowicz et al., 1997). Χρησιμοποιείται ευρέως στις βιομηχανίες τροφίμων, φαρμακευτικών προϊόντων, καλλυντικών, αρωματοθεραπείας και αρωματοποιίας και χρησιμοποιείται σε όλο τον κόσμο λόγω της αίσθησης της γεύσης του, ιδίως στη μεσογειακή κουζίνα (Tohti et al., 2006).

Βασίλειο	Φυτά (Plantae)
Φύλλο	Mangolliophyta
Κλάση	Magnoliopsida
Τάξη	Lamiales
Οικογένεια	Lamiaceae
Γένος	Ocimum
Είδος	basilicum

4.1.3 Χημική σύσταση

Το αιθέριο έλαιο του *O. basilicum* που λαμβάνεται με απόσταξη χρησιμοποιείται σε πολλά τρόφιμα ως αρωματικός παράγοντας και χρησιμοποιείται επίσης στην αρωματοποιία χάρη στα αρωματικά χαρακτηριστικά του. Περιέχει κινεόλη, πινένιο, μεθυλοχαβικόλη, δ-καμφορά και οκιμένιο.

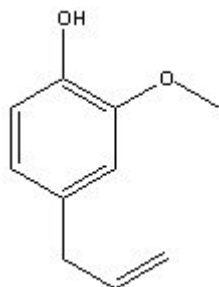
Το *O. basilicum* περιέχει κυρίως περίπου 20 ενώσεις, όπως λιναλοόλη, εστραγόλη, μεθυλική ευγενόλη, 1, 8-σινεόλη κ.λπ., οι οποίες έχουν ταυτοποιηθεί. Τα κυριότερα αρωματικά συστατικά του βασιλικού είναι η 3,7-διμεθυλο-1,6-οκταδιεν-3-όλη (λιναλοόλη- 3,94 mg/g), το 1-αλλυλ-4μεθοξυβενζόλιο (εστραγκόλη- 2,03 mg/g), το μεθυλοκινναμικό (1,28 mg/g), η 4-αλλυλ-2-μεθοξυφαινόλη (ευγενόλη- 0,896 mg/g) και η 1,8-σινεόλη (0,288 mg/g).



Εικόνα 4.1.2.1 : Συντακτικός τύπος της καμφοράς Πηγή : <http://www.food-info.net/images/limonene.jpg>

Οι καμφορά, λιμονένιο, θυμόλη, κινεόλη, α-λιναλοόλη, β-λιναλοόλη, εστραγόλη, είναι τα μονοτερπένια του *O. basilicum*. Η μεθυλική ευγενόλη είναι η δραστική ένωση του

Ocimum basilicum. Το κιχωρικό οξύ βρέθηκε στα φρέσκα φύλλα βασιλικού (Lee et al., 2009).



Εικόνα 4.1.2.2 : Συντακτικός τύπος της ευγενόλης Πηγή : <http://www.food-info.net/images/eugenol.jpg>

Τα φαινολικά οξέα και οι γλυκοζίτες φλαβονόλης είναι τα κύρια φαινολικά συστατικά του βασιλικού. Η κύρια σύνθεση λιπαρών οξέων των ειδών βασιλικού είναι το στεατικό οξύ, το ελαϊκό οξύ, το παλμιτικό οξύ, το λινολεϊκό οξύ, το μυριστικό οξύ, το αλινολενικό οξύ, το καρπικό οξύ, το λαυρικό οξύ και το αραχιδονικό οξύ. Οι υψηλότερες συνθήκες φωτός και θερμοκρασίας έχουν επιρροή στην αντιοξειδωτική ικανότητα. Οι σημαντικότερες αντιοξειδωτικές ενώσεις του βασιλικού είναι το καφεϊκό, το βανιλικό, το ροσμαρινικό οξύ, η κερκετίνη, η ρουτίνη, η απιγενίνη, το χλωρογενικό και το p-υδροξυβενζοϊκό. Τα αιθέρια έλαια του βασιλικού είναι το α-πινένιο, το β-πινένιο, η μεθυλοχαβικόλη, η 1,8-σινεόλη, η λιναλοόλη, το οκιμένιο, η βορνεόλη, η γερανιόλη, η β-καρυφυλλόνη, η ν-Cinnamate και Ευγενόλη. Το σημαντικότερο αιθέριο έλαιο του βασιλικού είναι η ευγενόλη, χαβικολανικά τερπενοειδή (Shahrajabian et al., 2020).

Το ακατέργαστο εκχύλισμα διαφόρων μορφολογικών μερών του *Ocimum* είναι πλούσιο σε φαινόλες. Η έντονα πορφυρή χρωστική ουσία του ωού οφείλεται στην παρουσία ανθοκυανινών³². Η λιναλοόλη (52,42%), η μεθυλική ευγενόλη (18,74%), η 1,8-σινεόλη (5,61%) είναι οι κύριες ενώσεις του *O. Basilicum* (Shahrajabian et al., 2020).

Το μυρτσένιο, η βορνεόλη και η νεράλη είναι οι δευτερεύουσες ενώσεις που είναι παρούσες σε ποσοστό 5%, 9%, 8% κ.β. αντίστοιχα. Δεκατέσσερις διαφορετικές ανθοκυανίνες έχουν απομονωθεί με τη μέθοδο HPLC, εκ των οποίων οι 11 έχουν χρωστικές με βάση την κυανιδίνη και οι 3 έχουν χρωστικές με βάση την πεονιδίνη (Phippen & Simon, 1998).

4.1.4 Φαρμακευτική χρήση

Ο βασιλικός χρησιμοποιείται κυρίως για τη θεραπεία του άγχους, του κρυολογήματος, του πυρετού, των ημικρανιών, του διαβήτη, των εμμηνορροϊκών κραμπών, της ιγμορίτιδας, των καρδιαγγειακών παθήσεων, των νευρικών πόνων, των τσιμπημάτων εντόμων και του πονοκεφάλου . Επιπλέον, δρα επίσης ως αντισπασμωδικό , αντιυπερλιπιδαιμικό , αντιφλεγμονώδες , αντιοξειδωτικό , με αντιαιμοπεταλιακή ιδιότητα, αντιθρομβωτική, αντιμικροβιακή , εντομοκτόνο, ανοσοτροποποιητική και κυτταροτοξική δράση. Δρα επίσης κατά των νευροεκφυλιστικών διαταραχών και των πεπτικών διαταραχών. Χρησιμοποιείται επίσης ως καρδιοτονωτικό και ανακουφιστικό του κοιλιακού πόνου.

Τα εκχυλίσματα που λαμβάνονται από το *Ocimum basilicum* αποτελούν πλούσια πηγή αρωματικών ενώσεων και πτητικών ελαίων που περιέχουν ποικιλία ενώσεων και οι ενώσεις αυτές έχουν αντιμικροβιακή δράση (Yamasaki et al., 1998). Το αιθέριο έλαιο από το *O. basilicum* έχει αποδειχθεί ότι έχει ανασταλτική επίδραση στον *Aspergillus ochraceus* (Basillico & Basillico, 1999).

Το εκχύλισμα των φύλλων παρασκευάζεται σε σκόνη και εμποτίζεται με 95% αιθανόλη και διατηρείται απαλλαγμένο από το έλαιο που λαμβάνεται από αυτό το φυτό παρουσιάζει επίσης αντιμικροβιακή δράση από αιθανοϊκά εκχυλίσματα από τα φύλλα του, τα οποία παρατηρήθηκαν κατά του *E. coli* και του *Staphylococcus aureus* με το επίπεδο αναστολής του (Khalil, 2013).

Το υδατικό εκχύλισμα *O. basilicum* μείωσε σημαντικά τόσο τα τριγλυκερίδια (TG) όσο και τη χοληστερόλη του πλάσματος σε οξεία υπερλιπιδαιμία που προκλήθηκε από Triton WR-1339 σε πειραματόζωα (Amrani et al., 2009).

Το υδραποσταγμένο υδατικό εκχύλισμα των φύλλων του βασιλικού έχει ισχυρή αντισπασμωδική δράση κυρίως λόγω της ευγενόλης που υπάρχει σε αυτό (Freire et al., 2006).

Η εκχύλιση με διαλύτη μεθανολικού εκχυλίσματος των εναέριων μερών του *Ocimum basilicum* έχει ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση έναντι μακροφάγων (RAW264.7), ανθρώπινων κυτταρικών σειρών χονδροσάρκωματος (SW1353) και ανθρώπινων πρωτογενών χονδροκυττάρων (Raina et al., 2016).

Το υδατικό εκχύλισμα των εναέριων μερών του *Ocimum basilicum* συμπυκνώθηκε σε περιστροφικό εξάτμιστήρα υπό κενό στους 65°C και μελετήθηκε ως προς την αντιαιμοπεταλιακή του δράση χρησιμοποιώντας ως αγωνιστές θρομβίνη (0,5 U/ml) και ADP (5μM). Αναστέλλει τη συσσώρευση αιμοπεταλίων που προκαλείται από ADP κατά 13%, 28,2%, 30,5%, 44,7% και 53% σε δόση 1, 2, 3, 4 και 5 g/l, αντίστοιχα (Amrani et al., 2009).

4.1.5 Αντιοξειδωτική δράση και χρήση

Το *Ocimum basilicum* περιέχει αρκετές ενεργές αντιοξειδωτικές ενώσεις. Το έλαιο που λαμβάνεται από αυτό το φυτό παρουσιάζει επίσης αντιοξειδωτικές ιδιότητες για την υποβοήθηση των παραμέτρων του σπέρματος και την ενίσχυση της ποιότητας του σπέρματος σε αρουραίους για την αύξηση της σπερματογένεσης. Η αντιοξειδωτική ιδιότητα οφείλεται στο πολυφαινοειδές ροσμαρινικό οξύ που είναι παράγωγο του κινναμικού οξέος (Phippen & Simon, 1998).

Οι *in vitro* δοκιμές των εκχυλισμάτων βασιλικού δείχνουν πως τα εκχυλίσματα των φυτών έχουν αποτελεσματικότερη δραστηριότητα χηλίωσης Fe²⁺ και υψηλότερες δραστηριότητες απορρόφησης για τις ρίζες ανιόντων υπεροξειδίου, ριζών υδροξυλίου, υπεροξειδίου του υδρογόνου και ριζών DPPH (Hakkim et al., 2007).

Η κύρια συνεισφορά στην παρατηρούμενη αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων από τα καλέσματα θα μπορούσε να εξηγηθεί από την άφθονη παρουσία φαινολικών με μία ή περισσότερες ομάδες υδροξυλίου. Τα εκχυλίσματα βασιλικού μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συντηρητικά στα τρόφιμα κατά της οξειδωτικής φθοράς, αλλά και ότι η κατανάλωση των εκχυλισμάτων αυτών μπορεί να ρυθμίσει θετικά την ανθρώπινη βιολογία υπό συνθήκες υπερβολικού οξειδωτικού στρες (Hakkim et al., 2007).

Οι Suppakul et al. (2003) ανέφεραν ότι τα αιθέρια έλαια βασιλικού παρουσίασαν καλή αντιμικροβιακή δράση έναντι ενός ευρέος φάσματος φάσμα μικροοργανισμών. Οι Wannissorn et al. (2005) ανέφεραν ότι το αιθέριο έλαιο *O. basilicum* παρουσίασε μέτρια αντιβακτηριακή δράση. Οι Bozin et al. (2006) και Sokovic και Van Griensven (2006) ανέφεραν επίσης την αντιμυκητιασική δράση αιθέριων ελαίων από το *O. basilicum* και το κύριο συστατικό του, τη λιναλοόλη. Οι αντιμικροβιακές δραστηριότητες των αιθέριων ελαίων από *O. basilicum* μπορεί να οφείλονται εν μέρει

στην παρουσία υψηλής περιεκτικότητας σε λιναλοόλη (Koutsoudaki, Krsek, & Rodger, 2005 ; Hussain et al., 2008).

4.2 Χαμομήλι (*Matricaria recutita*)

4.2.1 Γενικά στοιχεία

Το χαμομήλι αναπτύσσεται κυρίως αυτοφυώς στην Ευρώπη, τη ΒΔ. Ασία, Β. Αφρική, και καλλιεργείται στη Β. Αμερική και σε πολλά μέρη του κόσμου (Grunwald et al., 1998). Το βότανο αυτό χρησιμοποιείται ως φυτικό φάρμακο εδώ και χιλιάδες χρόνια. Το βότανο αυτό θεωρήθηκε από τους Αγγλοσάξονες ως ένα από τα εννέα ιερά βότανα που δόθηκαν στους ανθρώπους (Crellin et al., 1990). Ένα από τα πιο συχνά καταναλισκόμενα τσάγια βοτάνων με ένα μόνο συστατικό είναι το χαμομήλι, που παρασκευάζεται με αποξηραμένα άνθη από το *Matricaria recutita* L. Το σύνθετο λουλούδι έχει λευκό χρώμα με κιτρινωπό πορτοκαλί κέντρο. Τα αφεψήματα και τα αιθέρια έλαια από φρέσκα ή αποξηραμένα κεφάλια λουλουδιών έχουν αρωματικές, γευστικές και χρωστικές ιδιότητες. Και τα δύο χρησιμοποιούνται σε πολλά εμπορικά προϊόντα, όπως σαπούνια, απορρυπαντικά, αρώματα, λοσιόν, αλοιφές, προϊόντα για τα μαλλιά, αρτοσκευάσματα, γλυκίσματα, αλκοολούχα ποτά και τσάι από βότανα.

Το χαμομήλι (*Matricaria recutita*, *Chamaemelum nobile*) είναι ένα βότανο που θεωρείται ότι βοηθά στη χαλάρωση και ενισχύει την καταστολή. Συνήθως χρησιμοποιείται ως "τσάι για τον ύπνο" και οι επιδράσεις του μπορεί να είναι παρόμοιες με τις βενζοδιαζεπίνες. Έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι οι ηρεμιστικές επιδράσεις του χαμομηλιού μπορεί να συμβάλλουν στη μείωση της διέγερσης ή του άγχους κατά τη διάρκεια της νύχτας ή να προάγουν την υπνηλία. Ωστόσο, καμία μελέτη δεν έχει προσδιορίσει τον μηχανισμό δράσης και καμία κλινική μελέτη δεν έχει καταδείξει σημαντικά οφέλη για τη χαλάρωση ή τον ύπνο.

4.2.2 Βοτανική ταξινόμηση

Η *Matricaria chamomilla* (συνώνυμο: *Matricaria recutita*), κοινώς γνωστή ως χαμομήλι. Αποτελεί ένα ετήσιο αρωματικό άγριο βότανο της σύνθετης οικογένειας Asteraceae.

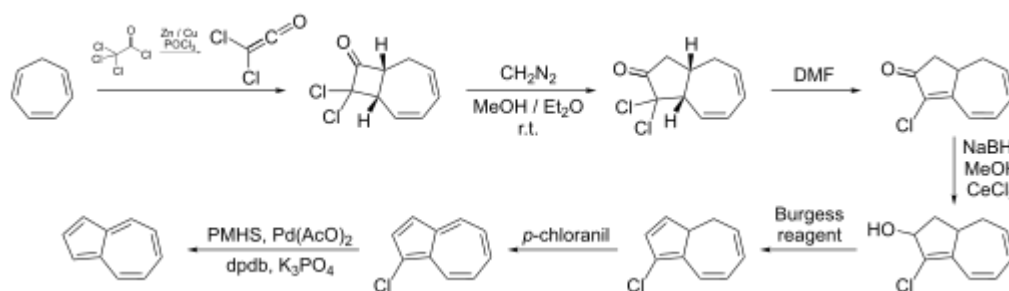
Το αληθινό χαμομήλι είναι ετήσιο φυτό με λεπτές ατρακτοειδείς ρίζες που εισχωρούν μόνο επίπεδα στο έδαφος. Ο διακλαδισμένος βλαστός είναι όρθιος, έντονα διακλαδισμένος και φτάνει σε ύψος 10-80 cm. Τα μακριά και στενά φύλλα είναι διπλά

έως τρίφυλλα. Οι ανθοκεφαλές τοποθετούνται χωριστά, έχουν διάμετρο 10-30 mm, είναι ποδίσκοι και ετερόγαμοι. Τα χρυσοκίτρινα σωληνοειδή άνθη με 5 δόντια έχουν μήκος 1,5-2,5 mm και καταλήγουν πάντα σε αδενικό σωλήνα. Τα 11-27 λευκά φυτικά άνθη έχουν μήκος 6-11 mm, πλάτος 3,5 mm και είναι τοποθετημένα ομόκεντρα. Ο υποδοχέας έχει πλάτος 6-8 mm, είναι επίπεδος στην αρχή και κωνικός, κωνοειδής αργότερα, κούφιος -το τελευταίο είναι ένα πολύ σημαντικό διακριτικό χαρακτηριστικό της *Matricaria*- και χωρίς χείλη.

4.2.3 Χημική σύσταση

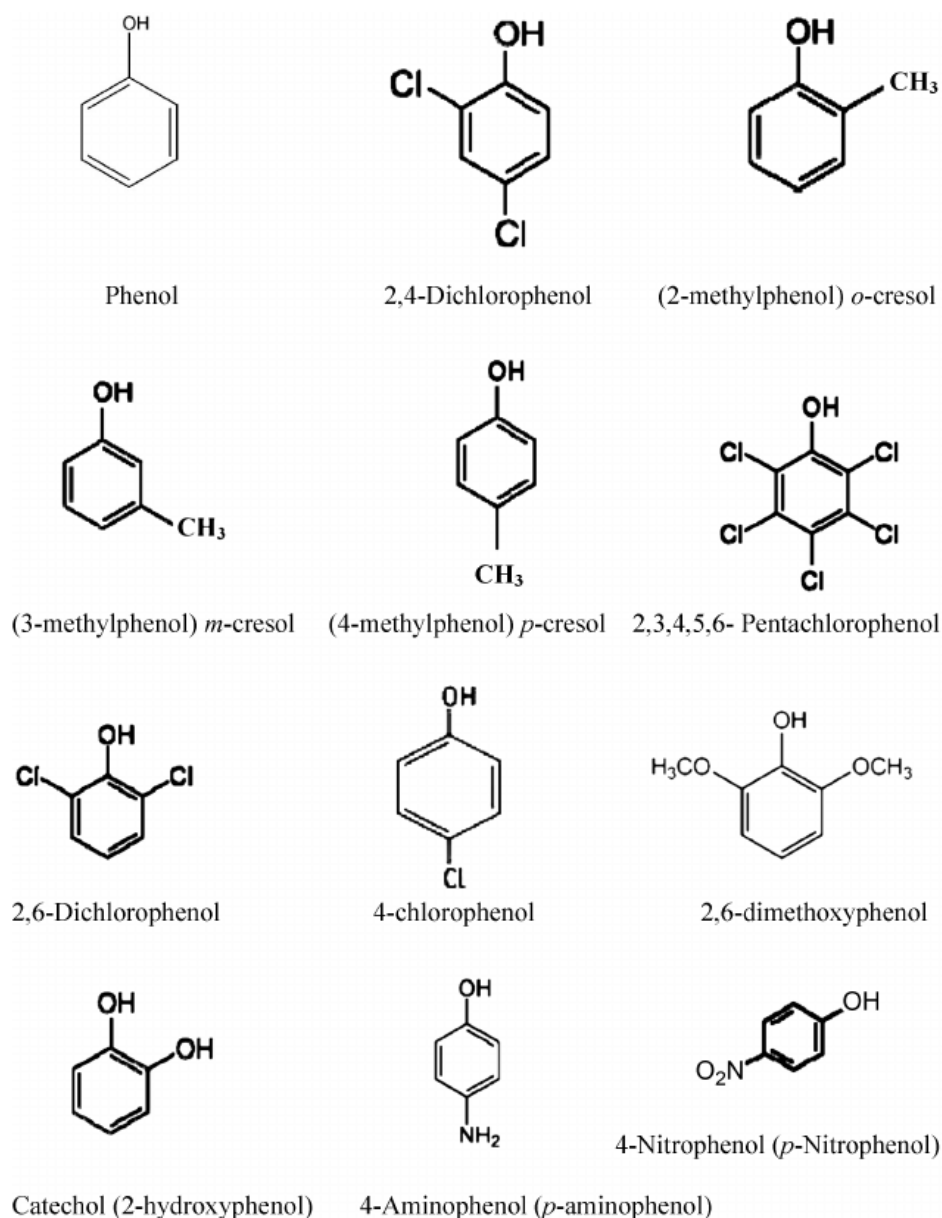
Πάνω από 120 συστατικά έχουν εντοπιστεί στα άνθη του χαμομηλιού. Τα κύρια συστατικά του ελαίου περιλαμβάνουν τα τερπενοειδή α-βισαβολόλη και τα οξειδιά της ($\leq 78\%$) και αζουλένια, συμπεριλαμβανομένου του χαμαζουλενίου (1-15%) (Pino et al., 2002).

Το χαμαζουλένιο καρβοξυλικό οξύ και τα προαζουλένια εντοπίζονται στο χαμομήλι (Ramadan et al., 2006). Έντεκα βιοδραστικές φαινολικές ενώσεις (κουμαρίνες: ρνιαρίνη, ομβελλιφερόνη- φαινυλοπροπανοειδή: γλωρογενικό οξύ, καφεϊκό οξύ- φλαβόνες: απιγενίνη, απιγενίνη-7-O-γλυκοσίδη, λουτεολίνη, λουτεολίνη-7-O-γλυκοσίδη- φλαβονόλες: κερκετίνη, ρουτίνη και φλαβανόνη: ναρινγενίνη) βρίσκονται στο εκχύλισμα χαμομηλιού.



Εικόνα 4.2.3.1 : Αντιδρασεις παραγωγής αζουλενίου Πηγή : https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/5/50/Azulene_synthesis.svg/512px-Azulene_synthesis.svg.png

Τα κύρια συστατικά των ανθέων περιλαμβάνουν διάφορες φαινολικές ενώσεις, κυρίως τα φλαβονοειδή απιγενίνη, κερκετίνη, πατουλετίνη, λουτεολίνη και τα γλυκοζίτες τους. Κουμαρίνες και δικυκλοαιθέρες εμφανίζονται επίσης στα άνθη. Τα κύρια συστατικά του αιθέριου ελαίου που εξάγεται από τα άνθη είναι τα τερπενοειδή α-βισαβολόλη και τα οξειδιά της και τα αζουλένια, συμπεριλαμβανομένου του χαμαζουλενίου.

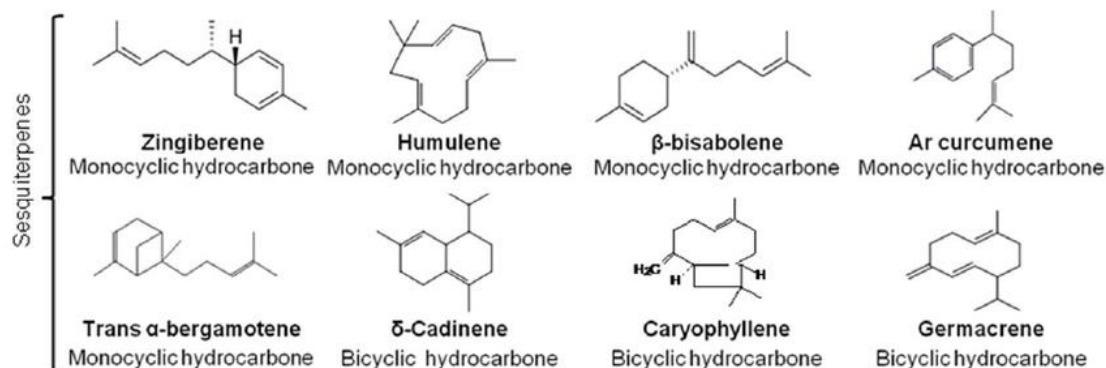


Εικόνα 4.2.3.2 : Συντακτικός τύπος φαινολικών συστατικών Πηγή : <https://www.researchgate.net/profile/Muftah-El-Naas/publication/234137696/figure/fig1/AS:299978938437633@1448531960091/Chemical-structure-of-common-phenolic-compounds.png>

Το χαμομήλι (*Matricaria chamomilla*) στα υπέργεια όργανα συνθέτει και συσσωρεύει (Z)- και (E)-2-β-D: -γλυκοπυρανοσυλοξυ-4-μεθοξυκινναμωμικά οξέα (GMCA), τις πρόδρομες ουσίες της φυτοαντιζινικής ερνικαρίνης (7-μεθοξυκουμαρίνη) (McKay & Blumberg, 2006).

Η μεγαλύτερη ομάδα ιατρικά σημαντικών ενώσεων που σχηματίζουν τα αιθέρια έλαια είναι κυρίως το χαμαζουλένιο, η (-)-άλφα-βισαβολόλη, τα δισαβολοξειδία, το

δισαβολουξείδιο Α, το trans-β-φαρνεσένιο, το α-φαρνεσένιο, η σπαθουλενόλη και οι cis/trans-εν-σε-δικυκλοαιθέρες. Φλαβονοειδή, κουμαρίνες, βλενωδείς ουσίες, μονο- και ολιγοσακχαρίτες έχουν επίσης φαρμακολογικές επιδράσεις (Maday et al., 1999).



Εικόνα 4.2.3.3 : Συντακτικός τύπος σεσκιτερπενίων Πηγή : <https://www.researchgate.net/profile/Jacques-Simpore/publication/280571645/figure/fig2/AS:324034966376449@1454267364137/Examples-of-some-sesquiterpenes-compounds-found-in-essential-oils-of-plants.png>

Είναι αξιοσημείωτο ότι το χαμομήλι αποτελείται κυρίως από σεσκιτερπενικά παράγωγα (75-90%), αλλά μόνο ίχνη μονοτερπενίων. Το έλαιο περιέχει έως και 20% πολυίνες. Τα κύρια συστατικά του αιθέριου ελαίου που εξάγεται από τα άνθη είναι το (E)-β-φαρνεσένιο (4,9-8,1%), η αλκοόλη τερπενίων (φαρνεσόλη), το χαμαζουλένιο (2,3-10,9%), η α-β-ισαβολόλη (4,8-11,3%), και οξείδια α-βισαβολόλης Α (25,5-28,7%) και οξείδια α-βισαβολόλης Β (12,2-30,9%) τα οποία είναι γνωστά για τις αντιφλεγμονώδεις, αντισηπικές και σπασμολυτικές ιδιότητες. Μεταξύ των διαφόρων κύριων συστατικών, η α-βισαβολόλη και το χαμαζουλένιο έχουν αναφερθεί ότι είναι πιο χρήσιμα από άλλα. Το χαμαζουλένιο είναι ένα τεχνούργημα που σχηματίζεται από τη μητρικήνη, η οποία υπάρχει φυσικά στα άνθη κατά την υδροαπόσταξη ή την απόσταξη με ατμό. Το χρώμα του ελαίου καθορίζει την ποιότητά του. Το μπλε χρώμα του ελαίου οφείλεται στο σεσκιτερπένιο. Η περιεκτικότητα σε χαμαζουλένιο των διαφόρων χαμομηλιών εξαρτάται από την προέλευση και την ηλικία του υλικού. Μειώνεται κατά την αποθήκευση των ανθέων (Singh et al., 2011).

4.2.4 Φαρμακευτική χρήση

Το βότανο αυτό χρησιμοποιείται ως φυτική θεραπεία εδώ και χιλιάδες χρόνια. Το βότανο αυτό θεωρήθηκε από τους Αγγλοσάξονες ως ένα από τα εννέα ιερά βότανα που δόθηκαν στους ανθρώπους από τον άρχοντα. Τα άνθη χαμομηλιού περιέχουν 0,24-έως 2,0 τοις εκατό πτητικό έλαιο που έχει μπλε χρώμα (Gruenwald et al., 1998).

Τα ψυχρά αποξηραμένα εκχυλίσματα του χαμομηλιού (*Matricaria chamomilla* L.) και βρέθηκε ότι καταστέλλουν τόσο το φλεγμονώδες αποτέλεσμα όσο και τη διήθηση των λευκοκυττάρων. Το *Matricaria chamomilla* αξιολογήθηκε για την αντιφλεγμονώδη δράση του σε άθικτους αρουραίους μετρώντας την καταστολή του επαγόμενου από कारागनानη οιδήματος των ποδιών που προκλήθηκε από το 1/10 της ενδοπεριτοναϊκής δόσης LD50 για το εκχύλισμα αιθανόλης 80%. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το φυτό διαθέτει καλή αντιφλεγμονώδη δράση (Al-Hindawi et al., 1989).

Η ενδογαστρική και παρεντερική χορήγηση ετεροπολυσακχαριτών της *Matricaria chamomilla* L. βρέθηκε ότι ομαλοποιεί την ανάπτυξη της ανοσολογικής απόκρισης κατά την ψύξη στον αέρα και ενισχύει (αλλά δεν ομαλοποιεί) τη διαδικασία αυτή κατά την ψύξη με εμβάπτιση. Η ανοσοτροποποιητική δράση των ετεροπολυσακχαριτών κατά την ψύξη αποδίδεται στην έναρξη των ανοσοδιεγερτικών ιδιοτήτων των βαρέων ερυθροκυττάρων (μακροκυττάρων), στην ενεργοποίηση των κυττάρων ανοσορρύθμισης του περιφερικού αίματος και στην αυξημένη ευαισθησία των κυττάρων-εκτελεστών στα βοηθητικά σήματα.

Το υδατικό εκχύλισμα του *M. recutita* (120 mg/kg/ημέρα) έδειξε αυξημένο ρυθμό συστολής του τραύματος, μαζί με την αυξημένη αντοχή στο σπάσιμο του τραύματος, την περιεκτικότητα σε υδροξυπρολίνη. Το εκχύλισμα χαμομηλιού σε μορφή ελαίου εντριβής είχε καλές δυνατότητες για την επιτάχυνση της επούλωσης τραυμάτων από εγκαύματα σε αρουραίους. Το εκχύλισμα του *M. chamomilla* που χορηγείται τοπικά έχει δυνατότητα επούλωσης τραυμάτων σε μοντέλο γραμμικού τραύματος τομής σε αρουραίους. Τα ζώα που έλαβαν θεραπεία με χαμομήλι παρουσίασαν σημαντικά ταχύτερη επούλωση των τραυμάτων σε σύγκριση με εκείνα που έλαβαν θεραπεία με κορτικοστεροειδή (Shivananda et al., 2007).

4.2.5 Αντιοξειδωτική δράση και χρήση

Οι ενώσεις που περιέχονται στα φυτά έχουν διερευνηθεί σαν αντιοξειδωτικά ώστε να χρησιμοποιηθούν στην βιομηχανία παραγωγής τροφίμων και στην βιομηχανία

παραγωγής οίνων. Στην περίπτωση του βασιλικού και του χαμομηλιού οι παρακάτω ενώσεις παρουσιάζουν το μεγαλύτερο ενδιαφέρον σαν αντιοξειδωτικοί παράγοντες.

Η **λιναλοόλη** που περιέχεται στο βασιλικό και στο χαμομήλι παρουσιάζει μεγαλύτερη δραστηριότητα έναντι βακτηριακών στελεχών από ό,τι το έναντι αντιμυκητιασικών στελεχών. Συνολικά το αιθέριο έλαιο και η λιναλοόλη διέθεταν ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση έναντι των θετικών κατά Gram βακτηρίων παρά έναντι των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων (Hussain et al., 2008).

Η **γερανιόλη** του *M. Chamomilla* παρουσιάζει μία ισχυρή δράση επαγωγής απόπτωσης μεταξύ των τερπενοειδών (Izumi et al., 1999). Από τα τερπενοειδή επίσης το α-πινένιο που περιέχεται στο αιθέριο έλαιο του βασιλικού και χαμομηλιού έχει επίσης αντιοξειδωτικές ιδιότητες και συγκεκριμένα τις υψηλότερες αντιοξειδωτικές ιδιότητες από το κλάσμα των τερπενοειδών ταυρόχρονα με αντιμικροβιακές και αντιβακτηριδιακές ιδιότητες (Wang et al, 2019).

Τα **φαινολικά συστατικά** που περιέχονται στον βασιλικό και το χαμομήλι μπορούν να εξαλείψουν τις ελεύθερες ρίζες που εντοπίζονται στους οίνους καθώς και να οξειδωθούν στην θέση άλλων ευοξειδωτων συστατικών (όπως π.χ. αρωματικά συστατικά). Ταυτόχρονα οι ενώσεις αυτές μπορούν να προσφέρουν σημαντικά οφέλη για την υγεία. Ακόμα τα φαινολικά συστατικά προστατεύουν τα λιπίδια που βρίσκονται στις μεμβρανών των ζυμομυκήτων από οξείδωσης προστατεύντάς τους κατά συνέπεια από οξειδωτικές βλάβες. Ταυτοχρόνως το υψηλό οξειδωσασαγωγικό δυναμικό των φαινολικών ενώσεων τις κάνουν να δρουν σαν αναγωγικοί παράγοντες δίνοντας ένα υδρογόνο για να αποσβέσουν τις οξειδώσεις (Chandra & Arora, 2017).

Κεφάλαιο 5ο: Φασματοσκοπία υπεριώδους - ορατού (UV-VIS)

5.1 Γενικά στοιχεία και χαρακτηριστικά

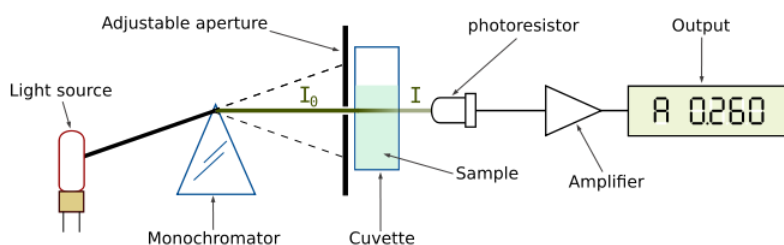
Φασματοσκοπία είναι η μελέτη των ιδιοτήτων της ύλης μέσω της αλληλεπίδρασής της με διάφορους τύπους ακτινοβολίας (κυρίως ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία) του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος.

Οι φασματομετρικές τεχνικές είναι μια μεγάλη ομάδα αναλυτικών μεθόδων που βασίζονται στην ατομική και μοριακή φασματοσκοπία. Η φασματομετρία και οι φασματομετρικές μέθοδοι αναφέρονται στη μέτρηση της έντασης της ακτινοβολίας με

έναν φωτοηλεκτρικό μετατροπέα ή άλλους τύπους ηλεκτρονικών διατάξεων. Η φασματομετρία UV-VIS είναι μια από τις παλαιότερες ενόργανες τεχνικές ανάλυσης και αποτελεί τη βάση για μια σειρά ιδανικών μεθόδων για τον προσδιορισμό μικρο- και ημίμετρων ποσοτήτων αναλυτών σε ένα δείγμα. Αφορά τη μέτρηση των συνεπειών της αλληλεπίδρασης ηλεκτρομαγνητικών ακτινοβολιών στην υπεριώδη ή/και ορατή περιοχή με τα απορροφητικά είδη, όπως άτομα, μόρια ή ιόντα.

Η φασματοσκοπία απορρόφησης υπεριώδους και ορατού (UV-Vis) είναι η μέτρηση της εξασθένησης μιας δέσμης φωτός μετά τη διέλευσή της από ένα δείγμα ή μετά την ανάκλαση από την επιφάνεια του δείγματος.

Το φάσμα UV-VIS προκύπτει από την αλληλεπίδραση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στην περιοχή του υπεριώδους-ορατού με μόρια, ιόντα ή σύμπλοκα. Αποτελεί τη βάση της ανάλυσης διαφόρων ουσιών, όπως ανόργανων, οργανικών και βιομορίων. Οι προσδιορισμοί αυτοί βρίσκουν εφαρμογές στην έρευνα, τη βιομηχανία, τα κλινικά εργαστήρια και τη χημική ανάλυση περιβαλλοντικών δειγμάτων. Επομένως, είναι σημαντικό να γνωρίσουμε την προέλευση του φάσματος UV-VIS και τα χαρακτηριστικά του.



Εικόνα 6.1 : Φασματοφωτόμετρο υπεριώδους ορατού

5.2 Νόμος Lambert – Beer

Πολλές ενώσεις απορροφούν υπεριώδεις (UV) ή ορατό (Vis.) φως.

Ο νόμος απορρόφησης Lambert-Beer εκφράζεται από την εξής εξίσωση :

$$A = -\log T = -\log(I/I_0) = \epsilon l C = a l C$$

Όπου

A: η απορρόφηση (καθαρός αριθμός)

T: η διαπερατότητα του δείγματος που εκφράζει το κλάσμα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας που εξέρχεται από το δείγμα I/I_0 .

I_0 : η ισχύς της μονοχρωματικής ακτινοβολίας που προσπίπτει στο δείγμα

I: η ισχύς της ακτινοβολίας που εξέρχεται από το δείγμα

l: το μήκος της διαδρομής της ακτινοβολίας στο δείγμα (cm)

C: Η συγκέντρωση της ουσίας που αναλύεται (mol/L ή g/L)

ϵ : Η μοριακή απορροφητικότητα της ουσίας όταν η c εκφράζεται σε mol/L

a: Η απορροφητικότητα της ουσίας όταν η c εκφράζεται σε g/L.

Ο νόμος ισχύει στην περίπτωση :

- Μονοχρωματικής ακτινοβολίας
 - Που η ύλη και ακτινοβολία αλληλοεπιδρούν μόνο με απορρόφηση
 - Κάθε σωματίδιο απορροφά ανεξάρτητα και δεν αλληλοεπιδρά με άλλα σωματίδια
 - Η σχέση μεταξύ απορρόφησης A και συγκέντρωσης C ισχύει για αραιά διαλύματα με την C να είναι μικρότερη ή ίση με 0,01M
-

Κεφάλαιο 6ο

Πειραματική πορεία - αποτελέσματα

6.1 Πείραμα

Για την παρασκευή των κρασιών με βότανα (Βασιλικό και Χαμομήλι) χρησιμοποιήθηκε μούστος από το Οινοποιείο Καρανικόλα. ποικιλίας **Ροδίτη Αλεπού**

Σε γυάλινες φιάλες των 4 lit τοποθετήθηκαν 3 lit από τον παραπάνω μούστο, ο οποίος είδη περιείχε θρεπτικά και προσθέσαμε και αποξηραμένα βότανα σε ποσότητες 18 gr ή 30 gr ή 45 gr, ώστε να παρασκευαστούν τρεις σειρές διαλυμάτων για το κάθε βότανο.

Βοτανο	Διαλυμα 1	Διαλυμα 2	Διαλυμα 3
Βασιλικος	18gr/3L	30gr/3L	45gr/3L
Χαμομηλι	18gr/3L	30gr/3L	45gr/3L
	6gr/L	10gr/L	15gr/L

Η ζύμωση πραγματοποιήθηκε σε ελεγχόμενες συνθήκες στους 18° C, σε κατάλληλα διαμορφωμένο ψυγείο. Η διάρκεια της ζύμωσης ήταν 16 μέρες. Στο τέλος της ζύμωσης οι φιάλες πωματίστηκαν προσωρινά, έτσι ώστε να παραμείνουν τα βότανα στο κρασί για 5 επιπλέον μέρες. Με αυτό τον τρόπο πετύχαμε την μέγιστη δυνατή εκχύλιση των συστατικών των βοτάνων. Πρέπει να τονίσουμε πως γινόταν ανάδευση των φιαλών, τρεις φορές την μέρα, καθ' όλη την διάρκεια των είκοσι αυτών ημερών. Ακολούθησε η απομάκρυνση των βοτάνων με διήθηση των οίνων, με διηθητικό χαρτί και τέλος έγινε η εμφιάλωση. Μετά από διάστημα τριών μηνών και αφού είχε γίνει η διαύγαση των οίνων με ψύξη στους 7° C πραγματοποιήθηκε ανάλυση του φαινολικού περιεχομένου των κρασιών με την μέθοδο Follin-Ciocalteu καθώς και προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας των κρασιών με την μέθοδο DPPH.

Επιπλέον η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε και σε κρασί έτοιμο, από την ίδια δεξαμενή, μετά την ολοκλήρωση της ζύμωσης.

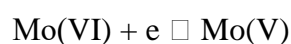
6.2 Μέθοδος Folin- Ciocalteu

Οι φαινολικές ενώσεις είναι σημαντικά συστατικά του κρασιού, και ειδικότερα του κόκκινου, καθώς και των αφεψημάτων των βοτάνων όπως είδαμε και παραπάνω.

Διάφορες μέθοδοι χρησιμοποιούνται για την ανάλυση του φαινολικού περιεχομένου τόσο σε κρασιά όσο και σε αφεψήματα βοτάνων όπως χρωματογραφία, ηλεκτροδιαχωρισμός και ειδικές οπτικές μέθοδοι¹. Η πιο διαδεδομένη και πιο εύκολη μέθοδος για τον προσδιορισμό των συνολικών φαινολικών είναι η φασματοφωτομετρική μέθοδος με την χρήση του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu (F-C) η οποία προτάθηκε από τους Folin και Denis (1912) και αργότερα τροποποιήθηκε από τους Folin και Ciocalteu (1927).

Η μέθοδος αυτή έχει καλή επαναληψιμότητα και χρησιμοποιείται για την μέτρηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου, χωρίς να γίνεται διάκριση μεταξύ μονομερών, διμερών ή μεγαλύτερων φαινολικών συστατικών.

Το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu, χρώματος κίτρινο, είναι διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφοβολφραμικό οξύ ($H_3P W_{12}O_{40}$) και φωσφομολυβδαινικό οξύ ($H_3P Mo_{12}O_{40}$). Τα ετεροπολυμερή αυτά οξέα οξειδώνουν τα φαινολικά συστατικά και ανάγονται σε μείγμα κυανών οξειδίων του βολφραμίου (W_8O_{23}) και του μολυβδαινίου (Mo_8O_{23}) σε αλκαλικό περιβάλλον. Πιθανότατα σχηματίζεται $(P Mo W_{11} O_{40})^{-4}$ χαρακτηριστικού κυανού χρώματος και θεωρείτε πως η μεταφορά ηλεκτρονίου² γίνεται στο Mo σύμφωνα με την αντίδραση:



Το σχηματιζόμενο κυανό σύμπλεγμα μολυβδαινίου-βολφραμίου (Mo-W), παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στη περιοχή 750 nm, ανάλογη με την συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων.

Η αλκαλικότητα ρυθμίζεται με κορεσμένο διάλυμα Na_2CO_3 , που αποτελεί προϋπόθεση για την παρουσία των φαινολικών ιόντων και δεν διαταράσσει τη σταθερότητα του αντιδραστηρίου F-C και του προϊόντος της αντίδρασης. Οι φαινολικές ουσίες που προσδιορίζονται με τον δείκτη Folin-Ciocalteu εκφράζονται πολύ συχνά σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος.

¹

Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται από την μέθοδο, μπορεί να επηρεάζονται και από άλλα μη φαινολικά μόρια όπως σάκχαρα, αρωματικές αμίνες, διοξείδιο του θείου³, ασκορβικό οξύ, οργανικά οξέα και γι' αυτό πρέπει να γίνονται οι κατάλληλες διορθώσεις

Υλικά και αντιδραστήρια

- Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu
- Ανθρακικό νάτριο (Na_2CO_3) 20%(W/V)
- Απεσταγμένο νερό
- Δείγματα οίνων

Όργανα μεθόδου

- Πιπέτες και σιφόνια
- Ογκομετρικές φιάλες των 25 ml
- Φασματοφωτόμετρο UV-Vis
- Γυάλινες κυψελίδες (b=1,00)

Πειραματική διαδικασία κατασκευής προτύπου καμπύλης μεθόδου Folin-Ciocalteu

Αρχικά παρασκευάστηκε, πρότυπο διάλυμα γαλλικού οξέος 50 mgr/100ml σε ογκομετρική φιάλη των 250 ml με τον εξής τρόπο. Σε αναλυτικό ζυγό ζυγίστηκαν 0,125gr γαλλικού οξέος σε ποτήρι ζέσεως, διαλύθηκαν με νερό και μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 250 ml και αραιώθηκαν μέχρι την χαραγή. Από αυτό το πρότυπο διάλυμα γαλλικού οξέος, και με συνεχείς αραιώσεις, παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα γαλλικού οξέος με συγκεντρώσεις 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 mgr/100ml, και ακολούθησε η παρακάτω πειραματική πορεία.

Σε ογκομετρική φιάλη των 25 ml προστίθενται με την ακόλουθη σειρά τα εξής :

0,25 ml προτύπου διαλύματος γαλλικού οξέος

12,5 ml απεσταγμένου ύδατος

1,25 ml αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu

και μετά από διάστημα 3 λεπτών

5 ml διαλύματος Na_2CO_3 20% W/V

Το διάλυμα συμπληρώθηκε μέχρι την χαραγή με απεσταγμένο νερό. Ακολούθησε ανάδευση, ώστε το διάλυμα να γίνει ομοιόμορφο και αφέθηκε σε ηρεμία στο σκοτάδι

για 30 λεπτά, για να αναπτυχθεί και να σταθεροποιηθεί το χρώμα της αντίδρασης. Στο τέλος του χρόνου, ακολούθησε φωτομέτρηση στα 750 nm.

Για τον μηδενισμό του οργάνου χρησιμοποιήθηκε απεσταγμένο νερό.

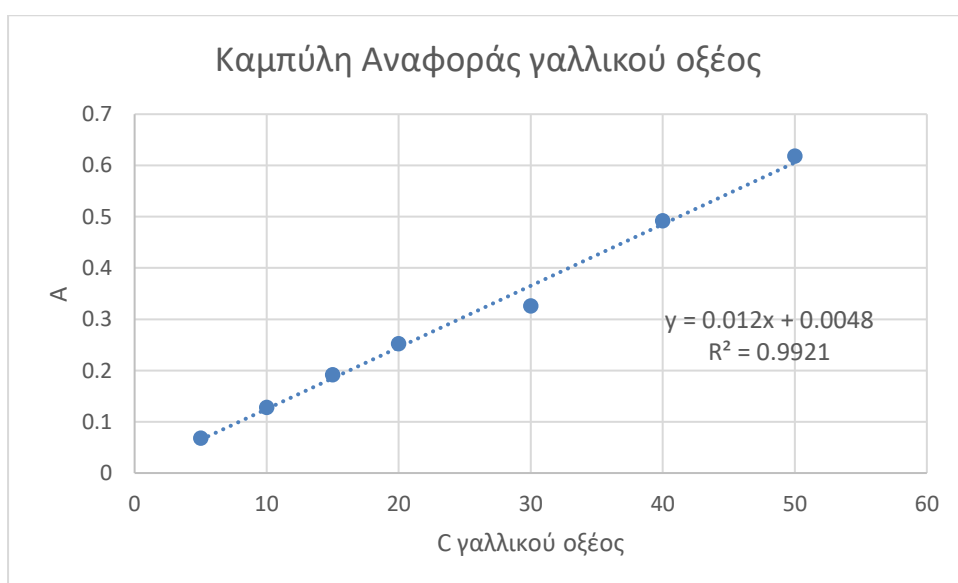
Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε 3 φορές για κάθε πρότυπο και ως απορρόφηση λήφθηκε ο μέσος όρος των τριών τιμών απορροφήσεων.

Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε για όλες τις συγκεντρώσεις των προτύπων διαλυμάτων του γαλλικού οξέος και προέκυψε ο παρακάτω πίνακας:

Πρότυπα διαλύματα γαλλικού οξέος

Συγκέντρωση προτύπου διαλύματος γαλλικού(mg/100ml)	Απορρόφηση A (750nm)
5	0,068 ± 0,00115
10	0,138 ± 0,00058
15	0,192 ± 0,00058
20	0,252 ± 0,002
30	0,326 ± 0,00208
40	0,492 ± 0,00208
50	0,618 ± 0,00462

Η γραφική παράσταση παράσταση και η εξίσωση ευθείας που προκύπτει από την Επεξεργασία των παραπάνω δεδομένων φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.



6.3 Πειραματική διαδικασία μελέτης δειγμάτων

Σε ογκομετρική φιάλη των 25 ml μεταφέρθηκαν με την ακόλουθη σειρά τα εξής :

0,25 ml οίνου με βότανα

12,5 ml απεσταγμένου ύδατος

1,25 ml αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu,

και μετά από 3 min

5 ml διαλύματος Na_2CO_3 20% W/V.

Έγινε αραίωση των δειγμάτων με βότανα 1/4 ώστε οι απορροφήσεις που προέκυψαν να εμπεριέχονται στα όρια της πρότυπης καμπύλης.

Το διάλυμα συμπληρώθηκε μέχρι την χαραγή με απεσταγμένο νερό. Ακολούθησε ανάδευση ώστε να έχουμε ομοιογενές διάλυμα και μετά το πέρας της επώασης στο σκοτάδι για 30 λεπτά έγινε φωτομέτρηση. Ο μηδενισμός του οργάνου έγινε με νερό όπως και πιο πάνω και για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν 3 μετρήσεις και ως απορρόφηση λήφθηκε ο μέσος όρος των τριών τιμών.

Η συγκέντρωση σε ολικές πολυφαινόλες υπολογίστηκε από την καμπύλη βαθμονόμησης χρησιμοποιώντας την πρότυπη καμπύλη του γαλλικού οξέος ενώ τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως mgr gal/L οίνου/gr βοτάνου.

Εξίσωση Καμπύλης αναφοράς: $y = 0,012x + 0,0048$ άρα

$$x = (y - 0,0048) / 0,012 \text{ δηλ. } x = (A + 0,0048) / 0,012$$

Πίνακας 1 : Προ ζυμωτικές εκχυλίσσεις

Ποσότητες δειγμάτων	A 1/4	Πολυφαινόλες Αραιωμένων δειγ. σε mg γαλ/100ml	Πολυφαινόλες δειγμάτων σε mg γαλ/L X_i	$X_i - X_M$ (mg/L)	mg γαλ/g βοταν/L	Μέγιστη εκχιλ/ότητα g βοτάνου/L
B 6gr/L	0,117± 0,0037	9,35	374	283	47.17	6
B10gr/L	0,129 ± 0,0042	10,35	414	323	23.3	6,84
B 15gr/L	0,149 ±0,0052	12,01	480,4	389,4	25.96	8,26
X 6gr/L	0,102± 0,0025	8,1	324	233	38.83	6
X 10gr/L	0,146 ±0,0038	11,76	470,4	379	37.9	9,76
X 15gr/L	0,156 ±0,0046	12,6	504	413	27.53	10,64
Μάρτυρας	0,114 ± 0,0014	9,1	91 (X_M)			

Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε κρασί από την ίδια δεξαμενή, αλλά μετά την ολοκλήρωση της ζύμωσης και, όπως παρατηρούμε, οι πολυφαινόλες του έτοιμου κρασιού χωρίς βότανα κυμαίνονται σε χαμηλότερα επίπεδα.

Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία όπως και πιο πάνω, με τα κρασιά στα οποία προστέθηκαν τα βότανα μετα ζυμωτικά.

Πίνακας 2 : Μετα ζυμωτικές μετρήσεις

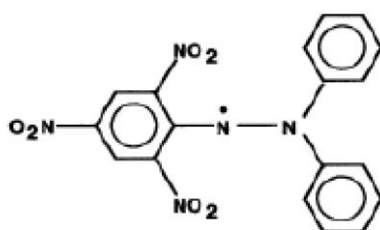
Ποσότητες δειγμάτων	A 1/4	Πολυφαινόλες Αραιωμένων δειγ. σε mg γαλ/100ml	Πολυφαινόλες δειγμάτων σε mg γαλ/L X_i	$X_i - X_M$ (mg/L)	mg γαλ/g βοταν/L	Μέγιστη εκχυλι/ότητα g βοτάνου/L
B 6gr/L	0,160±0,0023	12,93	517,2	426,2	71.03	6
B10gr/L	0,181 ±0,0021	14,68	587,2	496,2	49.62	6,99
B 15gr/L	0,194±0,0019	15,76	630,4	539,4	35.96	7,59
X 6gr/L	0,119±0,0024	9,51	380,4	289,4	48.23	6
X 10gr/L	0,157±0,0017	12,68	507,2	416,2	41.62	8,63
X 15gr/L	0,188±0,0025	15,26	610,4	519,4	34.63	10,77
Μάρτυρας	0,114±0,0026	9,1	91			

6.4 Μέθοδος DPPH

Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, μέσω της δέσμευσης της σταθερής ρίζας DPPH.

Η μέθοδος εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω της δέσμευσης της σταθερής ρίζας DPPH πραγματοποιήθηκε πρώτη φορά το 1995 από τους Brand-Williams.

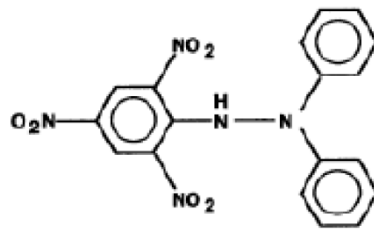
Βασίζεται στην αλληλεπίδραση των εξεταζόμενων μορίων με την σταθερή ρίζα DPPH (1,1-διφαινυλ-2-πικρυλδραζύλιο).



Ρίζα DPPH χρώματος μωβ

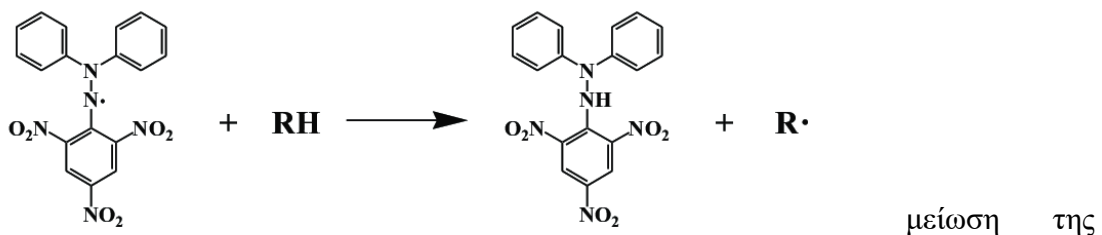
Η DPPH είναι μια σταθερή ρίζα. Το μόριο της περιέχει συζυγιακούς διπλούς δεσμούς, που εντοπίζονται στους αρωματικούς δακτυλίους, καθώς και νιτροομάδες οι οποίες

έλκουν ηλεκτρόνια. Έτσι το μονήρες ηλεκτρόνιο απεντοπίζεται σε όλο το μόριο. Παρουσιάζονται πολλές δομές συντονισμού που καθιστούν την ρίζα σταθερή στη μονομερή της μορφή, χωρίς να διμερίζεται. Η ρίζα έχει ένα βαθύ βιολετί χρώμα σε διάλυμα μεθανόλης και μία ισχυρή ζώνη απορρόφησης με κέντρο περίπου στα 520 nm. Όταν στο διάλυμα της ρίζας προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση, τότε η ρίζα 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο ανάγεται με την προσθήκη ενός ατόμου υδρογόνου (ή ενός ηλεκτρονίου) σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH-H) η οποία έχει χρώμα κίτρινο, με αποτέλεσμα η οπτική απορρόφηση να ελαττώνεται⁴.



Ανηγμένη μορφή DPPH-H κίτρινου χρώματος

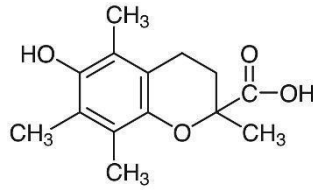
Τα αντιοξειδωτικά συστατικά του κρασιού δεσμεύουν την ελεύθερη ρίζα DPPH και η μείωση της ελέγχεται με τη



απορροφήσεως στα 515 nm.

Αντίδραση DPPH με αντιοξειδωτικά

Μια ικανοποιητική προσέγγιση για την ποσοτικοποίηση των αντιοξειδωτικών του κρασιού είναι να τα εκφράσουμε σε ισοδύναμα Trolox, κάτι αντίστοιχο με την χρήση του γαλλικού οξέος στη μέθοδο F-C.



Trolox

Trolox: 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid

Σε αυτή την περίπτωση όμως προσδιορίζουμε την απόσβεση της ρίζας DPPH από τα αντιοξειδωτικά, είτε αναφερόμαστε στο διάλυμα Trolox είτε αναφερόμαστε στις αντιοξειδωτικές ενώσεις που υπάρχουν στα δείγματα του οίνου.

Το ποσοστό αναστολής της αρχικής συγκέντρωσης της ρίζας DPPH (δηλαδή η εξουδετέρωση της) υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\% \Delta A(515 \text{ nm}) = [(A_{\text{control}(t=0)} - A_{\text{δείγματος}(t=30)}) / A_{\text{control}(t=0)}] * 100$$

και εκφράζει ποσοστιαία μείωση του DPPH σε συνάρτηση τα nmol Trolox όταν πρόκειται για την καμπύλη αναφοράς, ή εκφράζει ποσοστιαία μείωση του DPPH σε συνάρτηση με την ποσότητα των αντιοξειδωτικών του δείγματος εκφρασμένα σε nmol Trolox, όταν πρόκειται για τα δείγματα.

Υλικά και αντιδραστήρια για την μέθοδο DPPH

Υλικά και αντιδραστήρια

- Διάλυμα Trolox 0,2mM
- Διάλυμα DPPH 60μM
- Μεθανόλη
- Δείγματα κρασιών με βότανα

Όργανα μεθόδου DPPH

- Φασματοφωτόμετρο UV-Vis
- Αυτόματες πιπέτες 10-100μL και 100-1000 μL
- Πλαστικές κυψελίδες οπτικής (b=1,00cm).
- Αναδευτήρας Vortex
- Αναλυτικός ζυγός
- Γυάλινη ράβδος
- Ποτήρια ζέσεως
- Ογκομετρικές φιάλες 25ml, 100ml, 250ml.

➤ **Πειραματική διαδικασία για την κατασκευή προτύπου καμπύλης για τη μέθοδο DPPH**

Παρασκευή διαλύματος DPPH/ CH₃OH 60μM

Σε αναλυτικό ζυγό ζυγίστηκαν 0,0059 gr DPPH σε ποτήρι ζέσεως, διαλύθηκαν σε μεθανόλη και ακολούθως το περιεχόμενο του ποτηριού μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 250 ml και πραγματοποιήθηκε αραιώση μέχρι την χαραγή με διαλύτη μεθανόλη.

Παρασκευή προτύπου διάλυμα Trolox συγκέντρωσης 0,2mM.

Σε αναλυτικό ζυγό ζυγίστηκαν 0,0125gr Trolox σε ποτήρι ζέσεως, διαλύθηκαν σε μεθανόλη και ακολούθως το περιεχόμενο του ποτηριού μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 25 ml και πραγματοποιήθηκε αραιώση μέχρι την χαραγή (2,0 mM). Κατόπιν σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml προστέθηκαν 10 ml από το παραπάνω διάλυμα Trolox και αραιώθηκαν μέχρι την χαραγή με διαλύτη μεθανόλη (0,2 mM). Οι όγκοι επιλέχθηκαν έτσι ώστε το χρώμα του διαλύματος DPPH/ CH₃OH να παραμένει μωβ, σαφώς πιο εξασθενημένο του αρχικού, αλλά μην μετατρέπεται σε κίτρινο καθώς δεν καταναλίσκεται πλήρως το DPPH.

Έπειτα κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς με πρότυπα Trolox και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε ισοδύναμα Trolox.

Σε πλαστικές κυψελίδες προστίθενται με την εξής σειρά τα παρακάτω:

3000μL του διαλύματος 60μM DPPH/CH₃OH και στην συνέχεια οι όγκοι μεθανόλης και Trolox όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα ανά 2 min. Ακολούθησε ανάδευση και τα περιεχόμενα των φιαλιδίων παρέμειναν στο σκοτάδι για 30 min ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίδραση. Κατόπιν το περιεχόμενο κάθε φιαλιδίου μεταφέρθηκε σε γυάλινη κυψελίδα και φασματοσκοπήθηκε στα 515nm.

Το control περιέχει 3000 μL διαλύματος 60μM DPPH/CH₃OH και 100 μL CH₃OH.

Ο μηδενισμός του οργάνου πραγματοποιήθηκε με μεθανόλη και για κάθε ποσότητα nmol Trolox που προστέθηκαν, έγινε επανάληψη του πειράματος 3 φορές και ως τιμή της απορρόφησης λάβαμε τον μέσο όρο των τριών μετρήσεων.

Θυμίζουμε πως το ΔΑ% ορίζεται ως:

$$\Delta A\% (515 \text{ nm}) = [(A_{\text{control}(t=0)} - A_{\text{δείγματος}(t=30)}) / A_{\text{control}(t=0)}] * 100$$

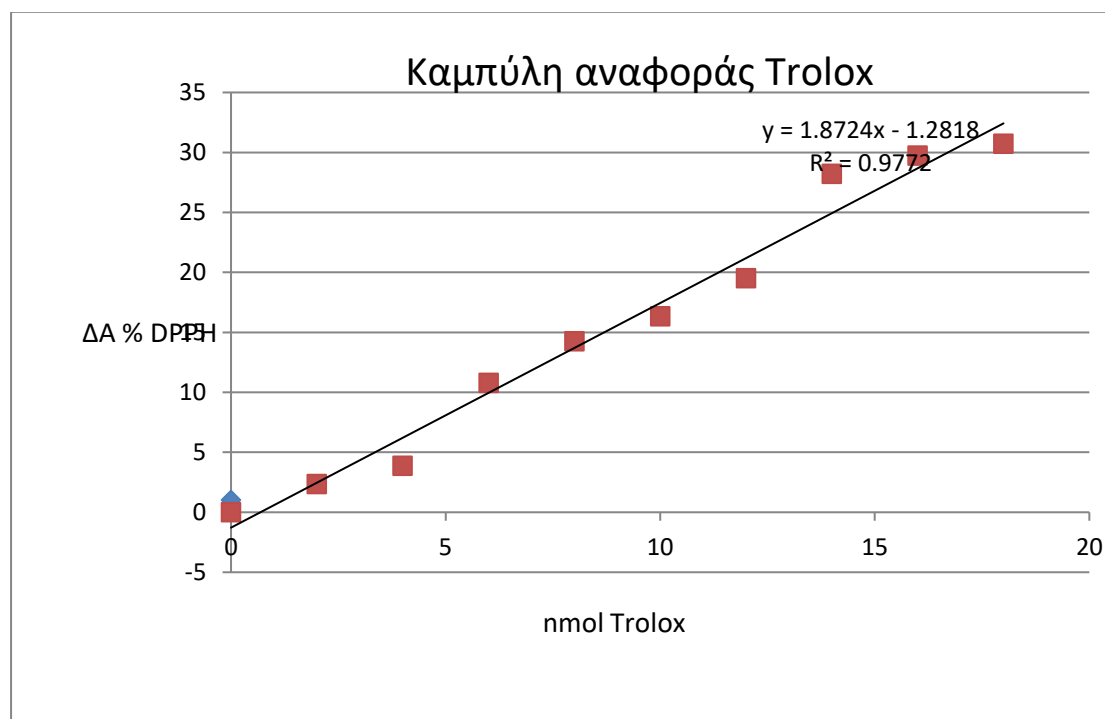
Πίνακας 3 : Διαλύματα Trolox

	Όγκος DPPH/CH ₃ OH 60 μM	Όγκος CH ₃ OH	Όγκος διαλύματος Trolox	nmole Trolox	Απορρόφηση λ=515 t=30min	ΔΑ%
1	3000μL	100μL	0μL	0nmol	0,723±0,001	
2	3000μL	90μL	10μL	2nmol	0,706±0,002	2,35
3	3000μL	80μL	20μL	4nmol	0,695±0,001	3,87
4	3000μL	70μL	30μL	6nmol	0,645±0,003	10,78
5	3000μL	60μL	40μL	8nmol	0,620±0,002	14,24
6	3000μL	50μL	50μL	10nmol	0,605±0,001	16,32
7	3000μL	40μL	60μL	12nmol	0,582±0,004	19,50
8	3000μL	30μL	70μL	14nmol	0,519±0,002	28,21
9	3000μL	20μL	80μL	16nmol	0,508±0,003	29,73
10	3000μL	10μL	90μL	18nmol	0,501±0,001	30,70

Πίνακας 3 : Διαλύματα Trolox

nmol Trolox	ΔΑ% DPPH
0	0
2	2,35
4	3,87
6	10,78
8	14,24
10	16,32
12	19,5
14	28,21
16	29,73
18	30,7

Γράφημα 1 : Καμπύλη Trolox



6.4.1 Πειραματική διαδικασία δειγμάτων οίνου προζυμωτικά

Σε γυαλινες κυψελίδες προστέθηκαν κατά σειρά: 3000 μL του διαλύματος 60 μM DPPH/ CH_3OH , κατόπιν 80 μL CH_3OH και τέλος 20 μL δείγματος με βότανο βασιλικό, ανά 2 min. Ακολούθησε ανάδευση και παραμονή στο σκοτάδι για μισή ώρα, ώστε να

πραγματοποιηθεί η αντίδραση. Κατόπιν τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε κυψελίδες γυάλινες και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 515 nm. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε 3 φορές για κάθε δείγμα και ως απορρόφηση λαμβάνεται ο μέσος όρος των τιμών των απορροφήσεων.

Το control περιείχε 3000μL του διαλύματος 60μL DPPH/CH₃OH και 100mL CH₃OH.

Ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου πραγματοποιήθηκε με CH₃OH.

Χρησιμοποιούμε την σχέση $y = 1,872x - 1,281$

άρα $x = (y + 1,281) / 1,872$ δηλαδή $x = (\Delta A\% + 1,281) / 1,872$ όποτε μπορούμε να βρούμε nmol Trolox.

Πίνακας 4 : DPPH προζυμωτικές βασιλικός

Δείγματα	A ¼ αραιώση	ΔA%	nmol Trolox/ 0.02 mL	nmol Trolox/L
Control	0,422±0,0012			
B 6gr/L	0,364±0,0013	13.73	8.02	1604000
B 10gr/L	0,3472±0,0015	17.729	10.154	2030930
B 15gr/L	0,3227±0,0014	23.53	13.254	2650710

Για το βότανο χαμομήλι ακολουθήθηκε η ίδια πειραματική πορεία όπως και παραπάνω.

Πίνακας 5 : DPPH προζυμωτικές χαμομήλι

Δείγματα	A ¼ αραιώση	ΔA%	nmol Trolox αραιωμένο/0.02 mL	nmol Trolox/L δείγματος
Control	0,422±0,0012			
X 6gr/L	0,363±0,0013	13.98	8.15	1630000
X 10gr/L	0,346±0,0015	18.01	10.31	2062000
X 15gr/L	0,333±0,0016	21,09	11,95	2390000

Για το έτοιμο κρασί χωρίς βότανα χρησιμοποιήθηκαν 20μL δείγματος. Στη συνέχεια ακολουθείται η πειραματική πορεία όπως και παραπάνω.

Πίνακας 6 : DPPH μετρήσεις Ροδίτης

Δείγματα	A	ΔA%	nmol Trolox/ 0.02 mL	nmol Trolox/L
Control	0,422			
Ροδίτης	0,300	28,91	16,13	806500

6.4.2 Πειραματική διαδικασία δειγμάτων οίνου μεταζυμωτικά

Σε πλαστικά κωνικά φιαλίδια προστίθενται κατά σειρά: 3000 μL του διαλύματος 60 μM DPPH/ CH_3OH , κατόπιν 80 μL CH_3OH και τέλος 20 μL δείγματος με βότανο βασιλικό, ανά 2 min. Ακολούθησε ανάδευση σε συσκευή Vortex και παραμονή στο σκοτάδι για μισή ώρα, ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίδραση. Κατόπιν τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε κυψελίδες γυάλινες και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 515 nm. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε 3 φορές για κάθε δείγμα και ως απορρόφηση λαμβάνεται ο μέσος όρος των τιμών των απορροφήσεων.

Το control περιέχει 3000 μL του διαλύματος 60 μL DPPH/ CH_3OH και 100mL CH_3OH .

Ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου πραγματοποιήθηκε με CH_3OH .

$$\text{Χρησιμοποιούμε την σχέση } y = 1,872x - 1,281$$

$$\text{αρα } x = (y + 1,281) / 1,872 \text{ δηλαδή } x = (\Delta A\% + 1,281) / 1,872$$

Πίνακας 7 : Μεταζυμωτικές βασιλικός

Δείγματα	A $\frac{1}{4}$ αραιώση	ΔA%	nmol Trolox/ 0.02 mL αραιωμένο	nmol Trolox/L
Control	0,422			
B 6gr/L	0,3633	13.92	8.12	1624000
B 10gr/L	0,3473	17.69	10.134	2026800
B 15gr/L	0,3213	23.86	13.43	2686000

Για το βότανο χαμομήλι ακολουθήθηκε η ίδια πειραματική πορεία όπως και παραπάνω.

Πίνακας 8 : Μεταζυμωτικές χαμομήλι

Δείγματα	A ¼ αραίωση	ΔA%	nmol Trolox/ 0.02 mL αραιωμένο	nmol Trolox/L
Control	0,4220			
X 6gr/L	0,3600	14,69	8,53	1706000
X 10gr/L	0,3403	19.348	11.02	2204000
X 15gr/L	0,3100	26,54	14,86	2972000

Πίνακας 9 : DPPH Μετρήσεις Ροδίτης

Δείγματα	A ¼	ΔA%	nmol Trolox	nmol Trolox/L
Control	0,422			
Ροδίτης	0,300	28,91	16,12	806000

Τελικά αποτελέσματα

Πίνακας 10 : DPPH Προ ζυμωτικές εκχυλίσσεις

Δείγματα	X _i -X _M nmol Trolox/L	nmol Trolox/L/g βοτάνου	mmol Trolox /g βοτάνου/L	Μέγιστη Εκχύλιση
B 6gr/L	798000	133000	0.133000	6
B 10gr/L	1224930	122493		9.21
B 15gr/L	1844710	122980		13.87
X 6gr/L	824000	137333	0.137333	6
X 10gr/L	1256000	125600		9.15
X 15gr/L	1584000	105600		11.53

Πίνακας 11 : DPPH μετα ζυμωτικές εκχυλίσεις

Δείγματα	$X_i - X_M$ nmol Trolox/L	nmol Trolox/L/g βοτάνου	mmol Trolox /g βοτάνου/L	Μέγιστη Εκχύλιση
B 6gr/L	818000	136333	0.136333	6
B 10gr/L	1220800	122080		8.95
B 15gr/L	1880000	1880000		13.79
X 6gr/L	900000	150000	0.1500	6
X 10gr/L	1398000	139800		9.32
X 15gr/L	2166000	216600		14.44

Συμπεράσματα

Το κρασί αποτελεί το πιο δημοφιλές αλκοολούχο ποτό στον κόσμο. Στην Ελλάδα κατέχει περίοπτη θέση καθώς αποτελεί το αρχαιότερο αλκοολούχο ποτό που παράγεται και καταναλώνεται.

Το άρωμα και η γεύση είναι οι σημαντικοί παράγοντες αποδοχής του κρασιού. Για την προστασία του χρησιμοποιούνται αρκετές ενώσεις κυρίως φυσικής προέλευσης που λειτουργούν σαν αντιοξειδωτικά.

Τα αντιοξειδωτικά φυσικά μπορούν να βρεθούν σε όλα τα μέρη των φυτών, όπως οι καρποί, τα άνθη, τα φύλλα, ο βλαστός και η ρίζα. Ως εκ τούτου, τα κρασιά που εμποτίζονται με βότανα παρουσιάζουν αυξημένη προστασία από οξειδώσεις που θα μεταβάλλουν τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά.

Η προσθήκη βοτάνων στον οίνο μπορεί να πραγματοποιηθεί για πολλούς σκοπούς. Ένας από αυτούς είναι και οι αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες. Ταυτόχρονα η γεύση και τα χαρακτηριστικά στους οίνους μπορούν να βελτιωθούν με την προσθήκη βοτάνων γεγονός που οφείλεται στον πλούτο τους σε αντιοξειδωτικά, κυρίως φαινολικές ενώσεις. Αυτές οι φαινολικές ενώσεις προστατεύουν τον οίνο από οξειδώσεις (Yuwa-Armonpitak et al., 2012).

Στην παρούσα έρευνα μελετήθηκε η προσθήκη βασιλικού και χαμομηλιού σε οίνους της ποικιλίας Ροδίτης και στη συνέχεια προσδιορίστηκαν τα ολικά φαινολικά και η αντιοξειδωτική ικανότητα των οίνων με τα βότανα.

Ολικά φαινολικά

Τα Ολικά φαινολικά υπολογιστήκαν με την μέθοδο FOLIN-CIOCALTEU.

A) Προ ζυμωτικές εκχυλίσεις

Βρέθηκε ότι από κάθε γραμμάριο Βασιλικό/L οίνου εκχυλίστηκαν φαινόλες που ισοδυναμούν με 47.17 mg γαλλικού οξέος και ότι η μέγιστη εκχυλισματική απόδοση του Βασιλικού ανά λίτρο οίνου είναι 8.26g βοτάνου.

Με την εκχύλιση του βοτάνου χαμομήλι βρέθηκε ότι από κάθε γραμμάριο χαμομήλι/L οίνου εκχυλίστηκαν φαινόλες που ισοδυναμούν με 38.83mg γαλλικού οξέος και η μέγιστη εκχυλισματική απόδοση του ανά λίτρο οίνου είναι η10.64 g.

B) Μέτα ζυμωτικές εκχυλίσεις

Βρέθηκε ότι από κάθε γραμμάριο Βασιλικό/L οίνου εκχυλίστηκαν φαινόλες που ισοδυναμούν με 28371.03 mg γαλλικού οξέος και ότι η μέγιστη εκχυλισματική απόδοση του Βασιλικού ανά λίτρο οίνου είναι 8.26g βοτάνου.

Με την εκχύλιση του βοτάνου χαμομήλι βρέθηκε ότι από κάθε γραμμάριο χαμομήλι/L οίνου εκχυλίστηκαν φαινόλες που ισοδυναμούν με 48.23mg γαλλικού οξέος και η μέγιστη εκχυλισματική απόδοση του ανά λίτρο οίνου είναι η10.64 g.

Αντιοξειδωτικής ικανότητας

Η αντιοξειδωτικής ικανότητας υπολογιστήκαν με την μέθοδο DPPH.

Με την εφαρμογή της μεθόδου DPPH, εκτιμήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα εκφρασμένη σε nmol Trolox/L που προσφέρει κάθε γραμμάριο βοτάνου σε ένα λίτρο οίνου .

A) Προ ζυμωτικές εκχυλίσεις

Βρέθηκε ότι από κάθε γραμμάριο Βασιλικό/L οίνου εκχυλίστηκαν αντιοξειδωτικές ουσίες ισοδυναμούν με 0.133 mmol Trolox και ότι η μέγιστη εκχυλισματική απόδοση του βασιλικού ανά λίτρο οίνου είναι 13.87g βοτάνου.

Με την εκχύλιση του βοτάνου χαμομήλι βρέθηκε ότι από κάθε γραμμάριο χαμομήλι/L οίνου εκχυλίστηκαν αντιοξειδωτικές ουσίες ισοδυναμούν με 0.13733 mmol Trolox και ότι η μέγιστη εκχυλισματική απόδοση του βασιλικού ανά λίτρο οίνου είναι 11.53g βοτάνου.

B) Μέτα ζυμωτικές εκχυλίσεις

Βρέθηκε ότι από κάθε γραμμάριο Βασιλικό/L οίνου εκχυλίστηκαν αντιοξειδωτικές ουσίες ισοδυναμούν με 0.13633 mmol Trolox και ότι η μέγιστη εκχυλισματική απόδοση του βασιλικού ανά λίτρο οίνου είναι 13.79g βοτάνου.

Με την εκχύλιση του βοτάνου χαμομήλι βρέθηκε ότι από κάθε γραμμάριο χαμομήλι/L οίνου εκχυλίστηκαν αντιοξειδωτικές ουσίες ισοδυναμούν με 0.1500 mmol Trolox και ότι η μέγιστη εκχυλισματική απόδοση του βασιλικού ανά λίτρο οίνου είναι 14.44 g βοτάνου.

Βιβλιογραφία

Al-Hindawi, M. K., Al-Deen, I. H., Nabi, M. H., & Ismail, M. A. (1989). Anti-inflammatory activity of some Iraqi plants using intact rats. *Journal of ethnopharmacology*, 26(2), 163-168.

Amerine, M. A. (1980). *The technology of wine making*.

Amrani, S., Harnafi, H., Gadi, D., Mekhfi, H., Legssyer, A., Aziz, M., ... & Bosca, L. (2009). Vasorelaxant and anti-platelet aggregation effects of aqueous *Ocimum basilicum* extract. *Journal of ethnopharmacology*, 125(1), 157-162.

Areshian, G. E., Gasparian, B., Avetisyan, P. S., Pinhasi, R., Wilkinson, K., Smith, A., ... & Zardaryan, D. (2012). The chalcolithic of the Near East and south-eastern Europe: discoveries and new perspectives from the cave complex Areni-1, Armenia. *Antiquity*, 86(331), 115-130.

Avrutis, W., Chaim, A., Farhi, Y., & Vincenz, A. D. (2015). *Wine presses at the Nesher-Ramla Quarry: a thousand years of winemaking*.

Barril, C., Clark, A. C., Prenzler, P. D., Karuso, P., & Scollary, G. R. (2009). Formation of pigment precursor (+)-1''-methylene-6''-hydroxy-2 H-furan-5''-one-catechin isomers from (+)-catechin and a degradation product of ascorbic acid in a model wine system. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(20), 9539-9546.

Basilico, M. Z., & Basilico, J. C. (1999). Inhibitory effects of some spice essential oils on *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174 growth and ochratoxin A production. *Letters in Applied Microbiology*, 29(4), 238-241.

Blainski, A., Lopes, G. C., & De Mello, J. C. P. (2013). Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. *Molecules*, 18(6), 6852-6865.

Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Simin, N., & Anackov, G. (2006). Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(5), 1822-1828.

Cacho, J., Castells, J. E., Esteban, A., Laguna, B., & Sagristá, N. (1995). Iron, copper, and manganese influence on wine oxidation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46(3), 380-384.

Castellari, M., Matricardi, L., Arfelli, G., Galassi, S., & Amati, A. (2000). Level of single bioactive phenolics in red wine as a function of the oxygen supplied during storage. *Food Chemistry*, 69(1), 61-67.

- Chandra, P., & Arora, D. S. (2017). Antioxidant compounds derived from plants, description and mechanism of phytochemicals. *Journal of Agroecology and Natural Resource Management*, 4(1), 55-59.
- Charters, S. (2006). *Wine and society*. Routledge.
- Cheyrier, V. (2000). Ossidazione dei polifenoli nei mosti d'uva. *Vignevini, Rivista Italiana di Viticoltura e di Enologia*, 27(11), 52-56.
- Clark, A. C. (2008). The production of yellow pigments from (+)-catechin and dihydroxyfumaric acid in a model wine system. *European Food Research and Technology*, 226(4), 925-931.
- Crellin, J. K., Philpott, J., & Bass, A. T. (1990). *Herbal Medicine Past and Present: A reference guide to medicinal plants* (Vol. 2). Duke University Press.
- Danilewicz, J. C., Secombe, J. T., & Whelan, J. (2008). Mechanism of interaction of polyphenols, oxygen, and sulfur dioxide in model wine and wine. *American journal of enology and viticulture*, 59(2), 128-136.
- De Beer, D., Joubert, E., Marais, J., & Manley, M. (2008). Effect of oxygenation during maturation on phenolic composition, total antioxidant capacity, colour and sensory quality of Pinotage wine.
- Danilewicz, J. C. (2003). Review of reaction mechanisms of oxygen and proposed intermediate reduction products in wine: Central role of iron and copper. *American Journal of Enology and Viticulture*, 54(2), 73-85.
- Danilewicz, J. C., Secombe, J. T., & Whelan, J. (2008). Mechanism of interaction of polyphenols, oxygen, and sulfur dioxide in model wine and wine. *American journal of enology and viticulture*, 59(2), 128-136.
- Elias, R. J., Andersen, M. L., Skibsted, L. H., & Waterhouse, A. L. (2009). Identification of free radical intermediates in oxidized wine using electron paramagnetic resonance spin trapping. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(10), 4359-4365.
- Elias, R. J., & Waterhouse, A. L. (2010). Controlling the Fenton reaction in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(3), 1699-1707.
- Freire, C. M. M., Marques, M. O. M., & Costa, M. (2006). Effects of seasonal variation on the central nervous system activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil. *Journal of ethnopharmacology*, 105(1-2), 161-166.
- Glories, Y., Ribéreau-Gayon, P., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2000). *Handbook of Enology: The Chemistry of Wine: Stabilization and Treatments*. John Wiley & Sons.

Gruenwald, J., Brendler, T., & Jaenicke, C. (1998). *PDR for Herbal Medicines*. 1st edn. Montvale, NJ: Medical Economics Company.

Guidoni, S., Ferrandino, A., & Novello, V. (2008). Effects of seasonal and agronomical practices on skin anthocyanin profile of Nebbiolo grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, 59(1), 22-29.

Hakkim, F. L., Shankar, C. G., & Girija, S. (2007). Chemical composition and antioxidant property of holy basil (*Ocimum sanctum* L.) leaves, stems, and inflorescence and their in vitro callus cultures. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(22), 9109-9117.

Handa, S. S., Rakesh, D. D., & Vasisht, K. (2006). Compendium of medicinal and aromatic plants ASIA. *ICS UNIDO Asia*, 2, 305.

Harborne, A. J. (1998). *Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis*. Springer science & business media.

Hussain, A. I., Anwar, F., Sherazi, S. T. H., & Przybylski, R. (2008). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food chemistry*, 108(3), 986-995.

Izumi, S., Takashima, O., & Hirata, T. (1999). Geraniol is a potent inducer of apoptosis-like cell death in the cultured shoot primordia of *Matricaria chamomilla*. *Biochemical and biophysical research communications*, 259(3), 519-522.

Johnson, H. (1989). *Vintage: the story of wine*. Simon and Schuster.

Kerenyi, C. (1976). Dionysos: Archetypal image of indestructible life, trans. *Ralph Manheim*. New Jersey.

Khalil, A. (2013). Antimicrobial activity of ethanolic extracts of *Ocimum basilicum* leaf from Saudi Arabia. *Biotechnology*, 12(1), 61-4.

Kilmartin, P. A., Zou, H., & Waterhouse, A. L. (2001). A cyclic voltammetry method suitable for characterizing antioxidant properties of wine and wine phenolics. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(4), 1957-1965.

Koutsoudaki, C., Krsek, M., & Rodger, A. (2005). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil and the gum of *Pistacia lentiscus* Var. chia. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(20), 7681-7685.

Lachowicz, K. J., Jones, G. P., Briggs, D. R., Bienvenu, F. E., Palmer, M. V., Mishra, V., & Hunter, M. M. (1997). Characteristics of plants and plant extracts from five varieties of basil (*Ocimum basilicum* L.) grown in Australia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(7), 2660-2665.

- Lee, J., & Scagel, C. F. (2009). Chicoric acid found in basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves. *Food Chemistry*, *115*(2), 650-656.
- Li, H., Guo, A., & Wang, H. (2008). Mechanisms of oxidative browning of wine. *Food chemistry*, *108*(1), 1-13.
- Máday, E., Szöke, É., Muskáth, Z., & Lemberkovics, E. (1999). A study of the production of essential oils in chamomile hairy root cultures. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics*, *24*(4), 303-308.
- Main, G. L. (1992). *Juice fining treatments to reduce browning and use of sulfur dioxide in white wine production* (Doctoral dissertation, University of Arkansas).
- Markoski, M. M., Garavaglia, J., Oliveira, A., Olivaes, J., & Marcadenti, A. (2016). Molecular properties of red wine compounds and cardiometabolic benefits. *Nutrition and metabolic insights*, *9*, NMI-S32909.
- McGovern, P., Jalabadze, M., Batiuk, S., Callahan, M. P., Smith, K. E., Hall, G. R., ... & Lordkipanidze, D. (2017). Early neolithic wine of Georgia in the South Caucasus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(48), E10309-E10318.
- McGovern, P. E., Callahan, M. P., Hall, G. R., Petersen, W. C., Cavalieri, D., Hartl, D. L., ... & Maria Lamuela-Raventós, R. (2021). A Response to Léa Drieu et al., 2020, "Is It Possible to Identify Ancient Wine Production Using Biomolecular Approaches?" (STAR: Science & Technology of Archaeological Research, DOI: 10.1080/20548923.2020.1738728). *STAR: Science & Technology of Archaeological Research*, *7*(1), 43-48.
- McKay, D. L., & Blumberg, J. B. (2006). A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, *20*(7), 519-530.
- Merida, J., Lopez-Toledano, A., Marquez, T., Millan, C., Ortega, J. M., & Medina, M. (2005). Retention of browning compounds by yeasts involved in the winemaking of sherry type wines. *Biotechnology letters*, *27*(20), 1565-1570.
- Mulero, J., Martínez, G., Oliva, J., Cermeño, S., Cayuela, J. M., Zafrilla, P., ... & Barba, A. (2015). Phenolic compounds and antioxidant activity of red wine made from grapes treated with different fungicides. *Food chemistry*, *180*, 25-31.
- Nygaard, V., Løland, A., Holden, M., Langaas, M., Rue, H., Liu, F., ... & Smith-Sørensen, B. (2003). Effects of mRNA amplification on gene expression ratios in cDNA experiments estimated by analysis of variance. *BMC genomics*, *4*(1), 1-13.
- Oliveira, C. M., Ferreira, A. C. S., De Freitas, V., & Silva, A. M. (2011). Oxidation mechanisms occurring in wines. *Food Research International*, *44*(5), 1115-1126.

- Phippen, W. B., & Simon, J. E. (1998). Anthocyanins in basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*(5), 1734-1738.
- Pino, J. A., Bayat, F., Marbot, R., & Aguero, J. (2002). Essential oil of chamomile *Chamomilla recutita* (L.) Rausch. from Iran. *Journal of Essential Oil Research*, *14*(6), 407-408.
- Pourova, J., Kottova, M., Voprsalova, M., & Pour, M. (2010). Reactive oxygen and nitrogen species in normal physiological processes. *Acta physiologica*, *198*(1), 15-35.
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, *53*(10), 4290-4302.
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., & Pouységu, L. (2011). Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, *50*(3), 586-621.
- Raina, P., Deepak, M., Chandrasekaran, C. V., Agarwal, A., Wagh, N., & Kaul-Ghanekar, R. (2016). Comparative analysis of anti-inflammatory activity of aqueous and methanolic extracts of *Ocimum basilicum* (basil) in RAW264. 7, SW1353 and human primary chondrocytes in respect of the management of osteoarthritis. *Journal of Herbal Medicine*, *6*(1), 28-36.
- Ramadan, M., Goeters, S., Watzer, B., Krause, E., Lohmann, K., Bauer, R., ... & Imming, P. (2006). Chamazulene carboxylic acid and matricin: a natural profen and its natural prodrug, identified through similarity to synthetic drug substances. *Journal of Natural Products*, *69*(7), 1041-1045.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (Eds.). (2006). *Handbook of enology, Volume 1: The microbiology of wine and vinifications* (Vol. 1). John Wiley & Sons.
- Robinson, J., & Harding, J. (Eds.). (2015). *The Oxford companion to wine*. American Chemical Society.
- Robards, K., Prenzler, P. D., Tucker, G., Swatsitang, P., & Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food chemistry*, *66*(4), 401-436.
- Shiradhonkar, R., Dukare, A., Jawalekar, K., Magar, P., & Jadhav, H. (2014). Fortification of Wine with Herbal Extracts: Production, Evaluation and Therapeutic applications of such Fortified Wines. *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, *8*(3), 09-14.
- Shahrajabian, M. H., Sun, W., & Cheng, Q. (2020). Chemical components and pharmacological benefits of Basil (*Ocimum basilicum*): A review. *International Journal of Food Properties*, *23*(1), 1961-1970.

- Shivananda Nayak, B., Sivachandra Raju, S., & Chalapathi Rao, A. V. (2007). Wound healing activity of *Matricaria recutita* L. extract. *Journal of Wound Care*, *16*(7), 298-302.
- Singleton, V. L., Trousdale, E., & Zaya, J. (1979). Oxidation of wines. I. Young white wines periodically exposed to air. *American Journal of Enology and Viticulture*, *30*(1), 49-54.
- Skouroumounis, G. K., Kwiatkowski, M. J., Francis, I. L., Oakey, H., Capone, D. L., Peng, Z., ... & Waters, E. J. (2005). The influence of ascorbic acid on the composition, colour and flavour properties of a Riesling and a wooded Chardonnay wine during five years' storage. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *11*(3), 355-368.
- Singh, O., Khanam, Z., Misra, N., & Srivastava, M. K. (2011). Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): an overview. *Pharmacognosy reviews*, *5*(9), 82.
- Soković, M., & Van Griensven, L. J. (2006). Antimicrobial activity of essential oils and their components against the three major pathogens of the cultivated button mushroom, *Agaricus bisporus*. *European Journal of plant pathology*, *116*(3), 211-224.
- Sumby, K. M., Grbin, P. R., & Jiranek, V. (2010). Microbial modulation of aromatic esters in wine: Current knowledge and future prospects. *Food chemistry*, *121*(1), 1-16.
- Suppakul, P., Miltz, J., Sonneveld, K., & Bigger, S. W. (2003). Antimicrobial properties of basil and its possible application in food packaging. *Journal of agricultural and food chemistry*, *51*(11), 3197-3207.
- Tohti, I., Tursun, M., Umar, A., Turdi, S., Imin, H., & Moore, N. (2006). Aqueous extracts of *Ocimum basilicum* L.(sweet basil) decrease platelet aggregation induced by ADP and thrombin in vitro and rats arterio-venous shunt thrombosis in vivo. *Thrombosis research*, *118*(6), 733-739.
- Troup, G. J., & Hunter, C. R. (2002). EPR, free radicals, wine, and the industry: some achievements. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *957*(1), 345-348.
- Wang, C. Y., Chen, Y. W., & Hou, C. Y. (2019). Antioxidant and antibacterial activity of seven predominant terpenoids. *International Journal of food properties*, *22*(1), 230-238.
- Wannissorn, B., Jarikasem, S., Siriwangchai, T., & Thubthimthed, S. (2005). Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. *Fitoterapia*, *76*(2), 233-236.
- Warrier, P. K., Nambiar, V. P. K., & Ramankutty, C. (1994). Indian medical plants.
- Waterhouse, A. L., & Laurie, V. F. (2006). Oxidation of wine phenolics: A critical evaluation and hypotheses. *American Journal of Enology and Viticulture*, *57*(3), 306-313.

Wilfred, V., & Nicholson, R. (2006). *Phenolic compound biochemistry*. Springer.

Yamasaki, K., Nakano, M., Kawahata, T., MORI, H., OTAKE, T., UEDA, N., ... & NAKANISHI, T. (1998). Anti-HIV-1 activity of herbs in Labiatae. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 21(8), 829-833.

Yonekura-Sakakibara, K., Nakayama, T., Yamazaki, M., & Saito, K. (2008). Modification and stabilization of anthocyanins. In *Anthocyanins* (pp. 169-190). Springer, New York, NY.

Yuwa-Amornpitak, T., Koguchi, M., & Teramoto, Y. (2012). Antioxidant activity of herbal wine made from cassava starch. *World Applied Sciences Journal*, 16(6), 874-878.

Zhai, H., Du, J., Guan, X., Qiao, X., & Pan, Z. (2001). Cultivating and processing technologies for wine grapes.

OIV (2018). Definition of the vitivincultural products by code sheet. <https://www.oiv.int/en/technical-standards-and-documents/products-definition-and-labelling/definition-of-the-vitivincultural-products-by-code-sheet>

Κοντοκόστας, Σ. (2010). *Οι επιδράσεις της ζύμωσης και της ωρίμανσης του κρασιού στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του* (Bachelor's thesis).