



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

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών στην
Επιστήμη Οίνου και Ζύθου
Κατεύθυνση: Οίνος**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

**ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΤΗΣ
ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΟΙΝΩΝ**



**Της Λάγνου Ευαγγελίας
ΑΜ 19208**

Παρουσιάστηκε για τη μερική εκπλήρωση των υποχρεώσεων για την απονομή του Μεταπτυχιακού Τίτλου Σπουδών στο Τμήμα Επιστημών Οίνου, Αμπέλου & Ποτών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής

Επιβλέπων: Σεχάντε Αντνάν

ΑΘΗΝΑ, 2022



**UNIVERSITY OF WEST ATTICA
SCHOOL OF FOOD SCIENCES
DEPARTMENT OF WINE, VINE & BEVERAGE SCIENCES**

**Master of Science in
Wine and Beer Science
Option: Wine**

**Master Thesis
COMPARISON OF METHODS FOR ESTIMATING
THE ANTIOXIDANT CAPACITY OF WINES**

**By
Lagiou Evangelia
AM 19208**

Presented for the partial fulfillment of the obligations for the award of the Master's Degree in the Department of Wine, Vine and Beverage Sciences of the University of West Attica

Supervisor: Adnan Shehadeh

Athens, 2022

Δήλωση εξεταστικής επιτροπής

Οι υπογράφωντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία (master thesis) με τίτλο «ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΟΙΝΩΝ» που παρουσιάστηκε από την ΛΑΓΙΟΥ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

The signatories declare that we have examined the postgraduate diploma thesis titled “**Title of Master Thesis**” presented by **LAGIOY EVANGELIA** and we affirm that it is accepted.

και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή. **Ψηφιακή
Υπογραφή Επιβλέποντα Καθηγητή
(1ου Μέλους Επιτροπής)
ΣΕΧΑΝΤΕ ΑΝΤΝΑΝ**

**Ψηφιακή Υπογραφή Καθηγητή
(2ου Μέλους Επιτροπής)
ΧΑΤΖΗΛΑΖΑΡΟΥ ΑΡΧΟΝΤΟΥΛΑ**

**Ψηφιακή Υπογραφή Καθηγητή
(3ου Μέλους Επιτροπής)
ΕΥΑΓΓΕΛΟΥ ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ**

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογράφουσα Λάγιοι Ευαγγελία , με Α.Μ. 19208 , φοιτήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστημών Οίνου, Αμπέλου και Ποτών, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της Μεταπτυχιακή Διπλωματική 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».

ΛΑΓΙΟΥ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ



Πνευματική ιδιοκτησία © 2022 Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής
Όλα τα δικαιώματα διατηρούνται

Copyright © 2022 University of West Attica
All rights reserved

ΠΕΡΙΛΗΨΗ :

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής είναι η εύρεση της βέλτιστης μεθόδου προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας του οίνου.

Αρχικά , λοιπόν, στο θεωρητικό μέρος ,γίνεται μια εκτενής θεωρητική περιγραφή της σύστασης και την οξείδωσης του οίνου (κατηγορίες, μηχανισμοί και συνέπειες) και της αντιοξειδωτικής ικανότητας του οίνου (τεχνικές μέτρησης).

Στην συνέχεια , στο πειραματικό μέρος αναλύονται δύο δείγματα οίνου – λευκού και ερυθρού οίνου – , οι δύο παραπάνω οίνοι με προσθήκη καφεϊκού οξέος και ένα πρότυπο διάλυμα καφεϊκού οξέος για να δούμε την ανταπόκριση που έχει το καφεϊκό οξύ στο νερό. Οι αναλύσεις των δειγμάτων έγιναν αρχικά με την μέθοδο Folin Ciocalteu για να μετρηθεί η ολική σύσταση σε πολυφαινόλες και στην συνέχεια με τις μεθόδους DPPH και ABTS, για να μετρηθεί η αντιοξειδωτική ικανότητα των οίνων. Τέλος, με την βοήθεια της στατιστικής επεξεργασίας , βγήκαν ορισμένα συμπεράσματα για τις δύο μεθόδους εύρεσης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των οίνων.

Λέξεις κλειδιά : πολυφαινόλες , Folin Ciocalteu, σύγκριση, βέλτιστη μέθοδος , προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας ,DPPH , ABTS, FRAP, ORAC, ερυθρός , λευκός , οίνος, καφεϊκό οξύ , νερό.

ABSTRACT:

The purpose of this thesis is to find the best method for determining the antioxidant capacity of wine.

Initially, therefore, in the theoretical part, an extensive theoretical description of wine composition and oxidation (categories, mechanisms and consequences) and the antioxidant capacity of wine (measurement techniques) was made.

Then, in the experimental part, two wine samples were analyzed – one white and one red wine –, the above two wines with the addition of caffeic acid and a standard caffeic acid solution to see the response of caffeic acid to water. The samples were analyzed first with the Folin Ciocalteu method to measure the composition of polyphenols and then with the DPPH and ABTS methods, to measure the antioxidant capacity of the wines. Finally, with the help of statistical processing, some conclusions were drawn for the two methods of finding the antioxidant capacity of wines.

Keywords: polyphenols, Folin Ciocalteu, comparison, optimal method, determination of antioxidant capacity, DPPH, ABTS, FRAP, ORAC, red, white, wine, caffeic acid, water.

Ευχαριστίες

Αρχικά αξίζει ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου για την στήριξή τους και τέλος αλλά χωρίς να ξεχνάω τους αγαπητούς μου καθηγητές που ήταν δίπλα μου σε όλη την προσπάθεια αυτή.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	7
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 – ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	9
1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ - Οίνος και σύσταση	9
1.2 Η οξείδωση του οίνου	21
1.2.1 Υποστρώματα πρώτης γραμμής για οξείδωση	21
1.2.3 Κατηγορίες και μηχανισμοί οξείδωσης οίνου	24
1.2.4 Συνέπειες οξείδωσης	31
1.3 Μέθοδος προσδιορισμού πολυφαινόλων οίνου με την μέθοδο Folin Ciocalteu	32
1.4 Αντιοξειδωτική ικανότητα οίνου	34
1.5 Τεχνικές μέτρησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των οίνων	36
1.5.1 Μέθοδος DPPH	38
1.5.2 Μέθοδος ABTS	40
1.5.3 Μέθοδος FRAP	42
1.5.4 Μέθοδος ORAC	43
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 – ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	45
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.1 Προετοιμασία δειγμάτων	45
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.2 Πείραμα με την μέθοδο Folin Ciocalteu	45
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.3 Πείραμα με την μέθοδο DPPH	48
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.4 Πείραμα με την μέθοδο ABTS	51
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	53
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.1 Πίνακες - συγκεντρωτικά αποτελέσματα	53
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.2 Συμπεράσματα	55
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ:	56

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 – ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ - Οίνος και σύσταση

«Οίνος είναι το ποτό που προκύπτει αποκλειστικά από τη μερική ή πλήρη αλκοολική ζύμωση νωπών σταφυλιών, είτε συνθλίβονται ή όχι, ή του γλεύκους σταφυλιών.» (ΟΙΥ)

Η ιστορία των ανθρώπων και του οίνου πηγαίνει πολύ πίσω. Πράγματι, ο οίνος είναι μέρος του ανθρώπινου πολιτισμού για σχεδόν 6000 χρόνια (Soleas et al., 1997). Εκείνη την εποχή, πολλές βελτιώσεις έχουν γίνει τόσο στην αμπελοκαλλιέργεια όσο και στις τεχνικές οινοποίησης. Η βιολογική κατανόηση των διαδικασιών ζύμωσης που λαμβάνουν χώρα κατά την οινοποίηση έκανε ένα άλμα προς τα εμπρός με το αξιολογικό έργο του Παστέρ στα μέσα του 19ου αιώνα (Παστέρ, 1866), όταν ο επιστήμονας έγινε ο πρώτος που εξέτασε τη σημασία του οξυγόνου για την παραγωγή και την παλαίωση του οίνου. Από τη δεκαετία του 1960, οι ερευνητές συνεργάστηκαν με οινοποιούς για να προσδιορίσουν συστηματικά τις ενώσεις του κρασιού, ιδιαίτερα τις φαινολικές ενώσεις, για να κατανοήσουν καλύτερα μηχανισμούς οξειδωσης που εμφανίζονται στον οίνο. Αυτές περιλαμβάνουν διαδικασίες από τη συγκομιδή έως την παλαίωση του οίνου σε μπουκάλια και συχνά συνδέονται με τον χρωματισμό του.

Σύσταση οίνου

Ο οίνος είναι ένα μείγμα πολλών ενώσεων, πολλές από τις οποίες βρίσκονται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, ωστόσο παίζουν σημαντικό ρόλο στην ποιότητα και στην εξέλιξη του.

Στην σύνθεση του οίνου παίζουν ρόλο κυρίως η ποικιλία σταφυλιών, ακολουθούμενη από τις τεχνικές οινοποίησης. Η περιεκτικότητα των σταφυλιών σε , οξέα, σάκχαρα, ανθοκυάνες, τανίνες, φαινολικές και αρωματικές ενώσεις και οι αλληλεπιδράσεις τους παίζουν βασικό ρόλο στη ποιότητα και την σύνθεση των οίνων. Οι οινολογικές τεχνικές και πρακτικές στην οινοποίηση επηρεάζουν την παραγωγή, τη σύνθεση και την ποιότητα του οίνου.

Ανάλογα με τα διάφορα χαρακτηριστικά, όπως η ποικιλία, το στάδιο ωρίμανσης των σταφυλιών, η χημική σύσταση του γλεύκους, η χρήση πρόσθετων ουσιών 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).

- **Αλκοόλες**

Η κύρια αλκοόλη η οποία παράγεται κατά την ζύμωση του γλεύκους είναι η αιθανόλη ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) όπου αμέσως μετά το νερό αποτελεί το κύρια συστατικό των οίνων.

- **Υδατάνθρακες – σάκχαρα**

Τα σάκχαρα είναι μια υποομάδα των υδατανθράκων. Τα πιο σημαντικά σάκχαρα στο χυμό σταφυλιών είναι τα δύο ζυμώσιμα σάκχαρα με έξι άνθρακες, η γλυκόζη και η φρουκτόζη.

- **Οξέα**

Οργανικά οξέα που προέρχονται από το σταφύλι.

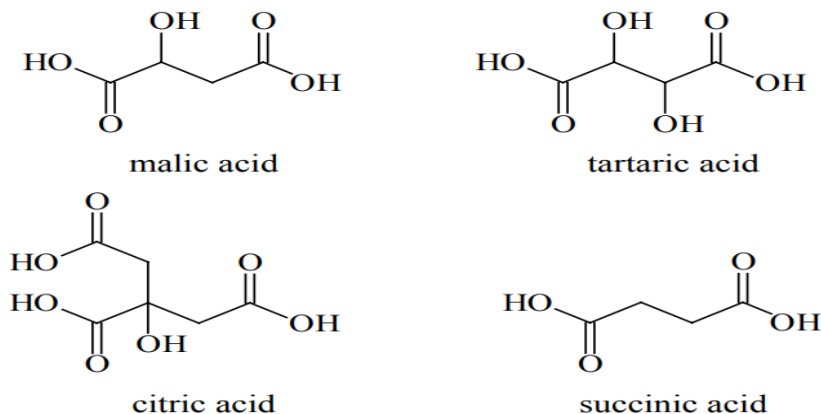
Τα κυριότερα οξέα του σταφυλιού είναι:

Τρυγικό ($\text{HOOCCH}(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$), **μηλικό** ($\text{HOOCCH}_2\text{CHOHCOOH}$), **κιτρικό** ($\text{HO}(\text{COOH})(\text{CH}_2\text{COOH})_2$), **οξαλικό** (HOOCCOOH), **ουρανικά οξέα** (σακχαρικά οξέα), (εξουρονικό οξύ, L-ασκορβικό οξύ βιταμίνη C, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$). Το **γλυκονικό οξύ** (γλουκονικό οξύ, $\text{HOCH}_2(\text{CHOH})_4\text{COOH}$) και άλλα οξέα υπάρχουν όταν συμβαίνει φαιά σήψη.

Το τρυγικό και το μηλικό οξύ βρίσκονται σε μεγαλύτερη αναλογία στο γλεύκος παρά το κιτρικό οξύ. Το κιτρικό είναι σε πολύ μικρά ποσά.

Οργανικά οξέα που σχηματίζονται από ζυμώσεις και μικροβιακές αλλοιώσεις.

Κατά τη ζύμωση σχηματίζονται **ηλεκτρικό οξύ** ($\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_2-\text{COOH}$) και **γαλακτικό οξύ** ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$), που με εστεροποίησης προκύπτουν αιθυλικοί εστέρες που συμβάλλουν σημαντικά στο άρωμα. Άλλα οξέα ζυμώσεων και μικροβιακών αλλοιώσεων είναι το οξικό, το κιτρομηλικό, το διμεθυλογλυκερινικό, το πυροσταφυλλικό, το α-κετογλουταρικό. Ορισμένα οργανικά οξέα, π.χ. προπιονικό, βουτυρικό, γλυκονικό, μυρμηκικό, περιέχονται μόνο στα αλλοιωμένα κρασιά.



Εικόνα 1.1 : Τα κυριότερα οργανικά οξέα των οίνων

- **Φαινολικές ενώσεις**

Φαινολικά συστατικά

Τα φαινολικά συστατικά περιλαμβάνουν ένα ευρύ πλήθος χημικών ενώσεων, διαφορετικών δομών και λειτουργούν και αποτελούν μια από τις βασικές κατηγορίες των δευτερογενών μεταβολιτών (Waterhouse, 2002).

Φαινολικές Ενώσεις είναι οι ενώσεις που περιέχουν τη χαρακτηριστική ομάδα της φαινόλης δηλαδή $-\text{OH}$ σε αρωματικό βενζολικό δακτύλιο. **Απλές φαινόλες** ονομάζονται οι χημικές ενώσεις που περιλαμβάνουν έναν αρωματικό δακτύλιο με ένα ή περισσότερα υδροξύλια ως υποκαταστάτες, ενώ **πολυφαινόλες** ονομάζονται οι ενώσεις που περιλαμβάνουν πολλαπλούς

φαινολικούς δακτυλίους στη δομή τους (ο όρος αρωματικός δακτύλιος αναφέρεται στο βενζόλιο και στις ενώσεις που περιέχουν ένα τουλάχιστον βενζολικό δακτύλιο).

Τα φαινολικά παράγωγα αποτελούν σημαντικό κεφάλαιο της οινολογίας, και αντιπροσωπεύουν μια μεγάλη ομάδα μορίων που υπάρχουν στο σταφύλι και το κρασί με ουσιαστικό ρόλο στην οινολογία. Οι φαινολικές ενώσεις των σταφυλιών συμβάλλουν στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του κρασιού όπως, η γεύση, η στυπτικότητα και η πικρία και η ικανότητά τους στην ωρίμανση, και καθορίζουν το χρώμα και τις αποχρώσεις των έγχρωμων οίνων (Ribéreau-Gayon et al. 2006).

Η σημασία των φαινολικών συστατικών στους οίνους είναι ιδιαίτερα σημαντική. Η γνώση των ολικών ανθοκυανών και των ολικών φαινολικών ενώσεων αποτελεί ένα επιπλέον κριτήριο τεχνολογικής ωρίμανσης. Ωστόσο, τα επίπεδα των ενώσεων αυτών μπορεί να ποικίλουν, λόγω ποικιλιακών και περιβαλλοντολογικών συνθηκών.

Από χημική άποψη, οι φαινολικές ενώσεις διαθέτουν έναν βενζολικό δακτύλιο που συνδέεται άμεσα από μία ή περισσότερες υδροξυλομάδες. Η δραστηριότητά τους οφείλεται στον όξινο χαρακτήρα της φαινολικής ομάδας και στον πυρηνόφιλο χαρακτήρα του βενζολικού δακτυλίου (Monagas et al. 2005).

Διακρίνονται σε 4 ομάδες :

- Τα φαινολικά οξέα
- Τις φλαβόνες
- Τις ανθοκυάνες
- Τις τανίνες

Οι φαινολικές ενώσεις στον οίνο περιλαμβάνουν μία μεγάλη ομάδα ενώσεων. Διαιρούνται σε δύο κατηγορίες :

A) Μη φλαβονοειδείς φαινόλες οι οποίες περιλαμβάνουν :

- A) Φαινολικά οξέα α) παράγωγα του βενζοϊκού οξέος β) παράγωγα του κινναμωμικού οξέος.
- B) Στυλβένια

B) Φλαβονοειδείς φαινόλες οι οποίες περιλαμβάνουν :

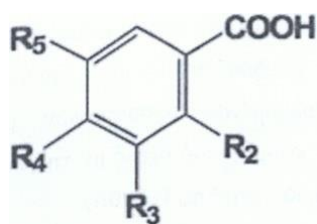
- 1) Φλαβονόλες
- 2) Φλαβονονόλες και φλαβόνες
- 3) Φλαβανόλες α) κατεχίνες β) συμπτυκνωμένες τανίνες ή προανθοκυανιδίνες
- 4) Ανθοκυάνες

A) Μη φλαβονοειδείς φαινόλες

Στην κατηγορία των μη φλαβονοειδών φαινολών υπάγονται μονομοριακά φαινολικά παράγωγα που βρίσκονται στο σταφύλι και στον οίνο. Η παρουσία τους στον οίνο οφείλεται είτε στο σταφύλι, όπου απαντούν στους φλοιούς και στη σάρκα, είτε στο ξύλο των βαρελιών που χρησιμοποιήθηκαν για την παλαίωση. Οι ερυθρές ποικιλίες και οίνοι περιέχουν μεγαλύτερες ποσότητες σε σχέση με τα αντίστοιχα λευκά.

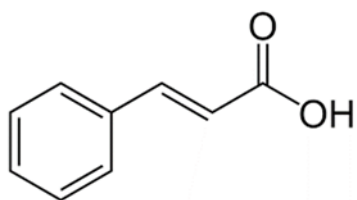
Κύριοι εκπρόσωποι είναι τα φαινολοξέα και ειδικότερα τα παράγωγα του βενζοϊκού

Οξέος και του κινναμωμικού οξέος, των οποίων ένα ή περισσότερα υδρογόνα των ανθράκων του δακτυλίου έχουν αντικατασταθεί με υδροξυλομάδες και μεθόξυ ομάδες,



Εικόνα 1.2 Σκελετός Βενζοϊκού οξέος

Βενζοϊκό οξύ	R2	R3	R4	R5
Π-υδροξυβενζοϊκό	H	H	OH	H
Πρωτοκατεχινικό	H	OH	OH	H
Βανιλλικό οξύ	H	OCH ₃	OH	H
Γαλλικό οξύ	H	OH	OH	OH
Συριγγικό οξύ	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Σαλικυλικό	OH	H	H	H



Εικόνα 1.3 Σκελετός Κινναμωμικού οξέος

Κινναμωμικό οξύ	R2	R3	R4	R5
Π-κουμαρικό οξύ	H	H	OH	H
Καφεϊκό οξύ	H	OH	OH	H
Φερουλικό οξύ	H	OCH ₃	OH	H
Σιναπικό οξύ	H	OCH ₃	OH	OCH ₃

Από τα βενζοϊκά οξέα το σταφύλι περιέχει κυρίως **γαλλικό οξύ**, το οποίο βρίσκεται συνήθως υπό τη μορφή εστέρων των φλαβονολών-3 (κατεχινών).

Από τα **κινναμωμικά οξέα**, μια μικρή ποσότητα βρίσκεται σε ελεύθερη μορφή, τα περισσότερα είναι εστεροποιημένα, κυρίως με τρυγικό οξύ, ενώ κάποια είναι ενωμένα με γλυκόζη. Τα υδροξυκινναμωμικά οξέα είναι και τα επικρατέστερα στο σταφύλι και βρίσκονται στα χυμοτόπια των κυττάρων του φλοιού και της σάρκας υπό τη μορφή των εστέρων με τρυγικό οξύ. Οι εστέρες αυτοί είναι ιδιαίτερα ευοξειδωτά συστατικά του γλεύκους και ευθύνονται για το καφέτιασμα των λευκών γλευκών.

Τα κινναμωμικά οξέα συνδυάζονται με ανθοκυανικούς μονογλυκοζίτες, προς σχηματισμό ακυλιωμένων ανθοκυανών, μέσω της εστεροποίησης του καφεϊκού και του π-κουμαρικού οξέος με τη γλυκόζη του γλυκοζίτη. Τα φαινολικά οξέα είναι άχρωμα όταν βρίσκονται σε αλκοολικό διάλυμα, αλλά αποκτούν κίτρινο χρώμα όταν οξειδωθούν. Δεν έχουν ιδιαίτερη γεύση ή οσμή, αλλά αποτελούν πρόδρομες ενώσεις πτητικών φαινολών που παράγονται από κάποιους μικροοργανισμούς. Οι αιθυλφαινόλες έχουν οσμές ζώου και απαντώνται σε ερυθρούς οίνους. Σε

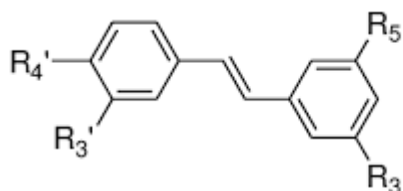
λευκούς οίνους υπάρχουν βινυλφαινόλες και βινυλγουαϊακόλες. Οι ενώσεις αυτές προέρχονται από το π-κουμαρικό οξύ και το φερουλικό, μετά από διάσπασή τους.

Η τυροσόλη, η οποία απαντάται σε ερυθρούς και λευκούς οίνους παράγεται κατά την αλκοολική ζύμωση από την τυροσίνη. Η τυροσόλη, της οποίας η συγκέντρωση παραμένει σχετικά σταθερή κατά την παλαίωση του οίνου, συνυπάρχει με άλλες μη φαινολικές αλκοόλες.

Άλλη μια οικογένεια που αποτελείται από περισσότερο πολύπλοκες πολυφαινόλες και απαντώνται σε σταφύλια, οίνους και ξύλο δρυός, είναι τα στυλβένια. Πρόκειται για ενώσεις με δύο βενζολικούς δακτυλίους, οι οποίοι συνδέονται συνήθως με ένα αιθύλιο ή πιθανώς με μια αιθυλενική αλυσίδα. Μεταξύ αυτών των trans ισομερών συγκαταλέγεται και η ρεσβερατρόλη ή αλλιώς το 3,5,4'-τριυδροξυστυλβένιο, ενώ απαντάται και το παραγωγό της με γλυκόζη.

Στυλβένια

Τα στυλβένια περιέχουν δύο δακτυλίους βενζολίου ενωμένους με ένα μόριο αιθανόλης ή αιθυλενίου.



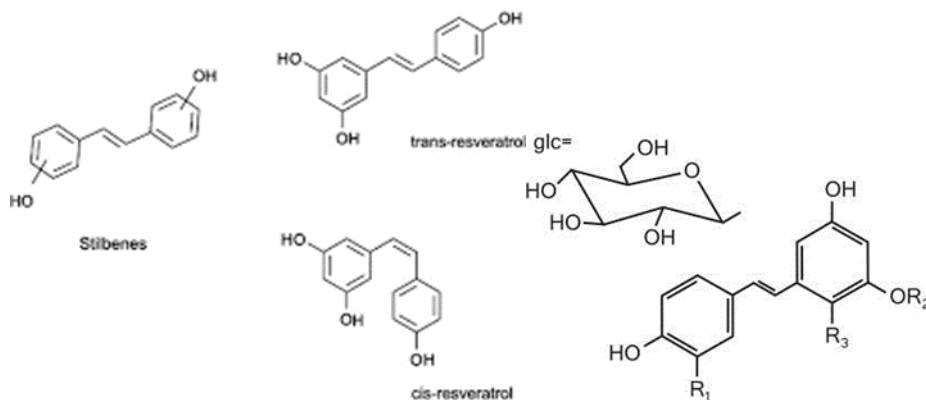
Resveratrol: $R_4' = OH, R_3' = H, R_3 = R_5 = OH$

Piceatannol: $R_3' = R_4' = R_3 = R_5 = OH$

Pinosylvin: $R_3 = R_5 = OH$

Εικόνα 1.4 Σκελετός στυλβενίων

Η ρεσβερατρόλη είναι η κύρια αντιπρόσωπος αυτής της ομάδας, το trans ισομερές της ρεσβερατρόλης παράγεται από αμπέλια σε απόκριση σε μυκητιασικές λοιμώξεις. Εντοπίζεται κυρίως στην φλούδα των σταφυλιών και ως εκ τούτου εξάγεται κυρίως κατά την παραγωγή ερυθρών οίνων. Η χημική δομή των στυλβενίων και των παραγώγων γλυκοζιτών τους φαίνονται παρακάτω:



Εικόνα 1.5 Σκελετός στυλβενίων και γλυκοζιτικών παραγώγων

Πίνακας 1.1 Στιλβένια και υποκαταστάτες

Στιλβένια	R ₁	R ₂	R ₃
<i>Trans- Ρεσβερατρόλη</i>	H	H	H
Trans- ρεσβερατρόλη-3-Ο- γλυκοσίδη	H	glc	H
Trans- ρεσβερατρόλη-2-с- γλυκοσίδη	H	H	glc
<i>Trans-astringin</i>	OH	glc	H

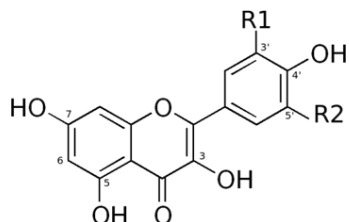
Φαίνεται ότι το φυτό συνθέτει αυτές τις ενώσεις ως αμυντική αντίδραση σε μυκητιασική λοίμωξη και ακτινοβολία υπεριώδους φωτός, σε φύλλα, ρίζες και φλούδα των σταφυλιών (Langcake and Pryce 1976, Jeandet et al. 1991). Τα στιλβένια δεν έχουν καμία σημασία στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του κρασιού.

Β) Φλαβονοειδείς φαινόλες

Τα φλαβονοειδή χαρακτηρίζονται από ένα βασικό σκελετό με 15 άτομα άνθρακα του τύπου 2-φαινυλ-βενζοπυρόνη. Χωρίζονται σε πολλές ομάδες, οι οποίες διαχωρίζονται ανάλογα με το βαθμό οξείδωσης του πυρανικού δακτυλίου. Στην κατηγορία αυτή υπάγονται κυρίως οι φλαβονόλες, φλαβόνες, φλαβανόλες (ή κατεχίνες), οι ανθοκυάνες καθώς και οι προανθοκυανιδίνες (ή προκυανιδίνες) που είναι ολιγομερή των φλαβανολών και οι τανίνες που είναι πολυμερή των φλαβανολών (Kallithraka S., Tsoutsouras E., Tzourou E., Lanaridis P., 2006).

Φλαβονόλες

Οι φλαβονόλες της σταφυλής είναι οι μόνες που με βάση τη δομή της 2-φαινυλ-βενζοπυρόνης αντιπροσωπεύουν τα φλαβονοειδή, ενώ με την ευρεία έννοια του όρου συμπεριλαμβάνονται και οι ανθοκυάνες και οι φλαβανόλες-3. Οι φλαβονόλες απαντούν μόνο στους φλοιούς υπό μορφή γλυκοζιτών στη θέση 3. Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζεται ο χημικός τύπος της άγλυκης μορφής των τεσσάρων βασικών φλαβονολών του σταφυλιού.



Εικόνα 1.6 Σκελετός Φλαβονόλης

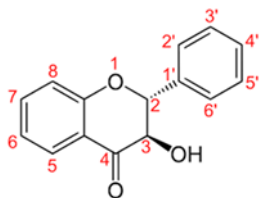
Πίνακας 1.2 Φλαβανόλες και υποκαταστάτες

R1	R2	Φλαβονόλη
H	H	Κεμπφερόλη
OH	H	Κερκετίνη
OH	OH	Μυρικετίνη

Στο σταφύλι βρέθηκαν οκτώ μονογλυκοζίτες και τρεις διγλυκοζίτες των φλαβονολών. Οι μορφές των γλυκοζιτών (με γλυκόζη) απαντούν σε πολύ μεγαλύτερες ποσότητες, αλλά βρίσκονται και σημαντικές ποσότητες των εστέρων τους με το γλυκουρονικό οξύ. Τόσο οι λευκές, όσο και οι ερυθρές ποικιλίες αμπέλου περιέχουν τις ίδιες ποσότητες φλαβονολών, διαφέρουν όμως στην ποιοτική τους σύσταση. Η περιεκτικότητα των φλαβονολών ποικίλει από 10 έως 100 mg/Kg ραγών.

Φλαβανόλες

Οι ενώσεις που ανήκουν σε αυτή την οικογένεια είναι γλυκοζίτες και ταυτοποιήθηκαν σε φλοιούς λευκών ποικιλιών. Πρόκειται για την διυδροκερκετίνη και τη διυδροκαιμπερόλη και έχουν πολύ ανοιχτό κίτρινοχρώμα. Οι φλαβανόλες απαντούν και στους βοστρύχους (Κοτσερίδης, Γ., 2006).



Εικόνα 1.5 Σκελετός φλαβανόλης

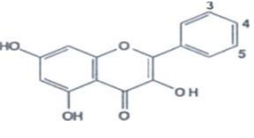
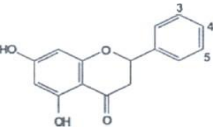
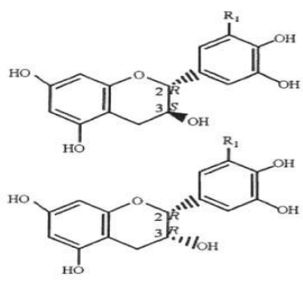
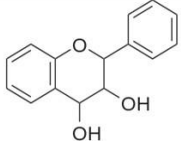
Φλαβανόλη

Φλαβανόλη	OH
Διυδροκερκετίνη	4',3'
Διυδροκαιμπερόλη	4'

Φλαβανόνες

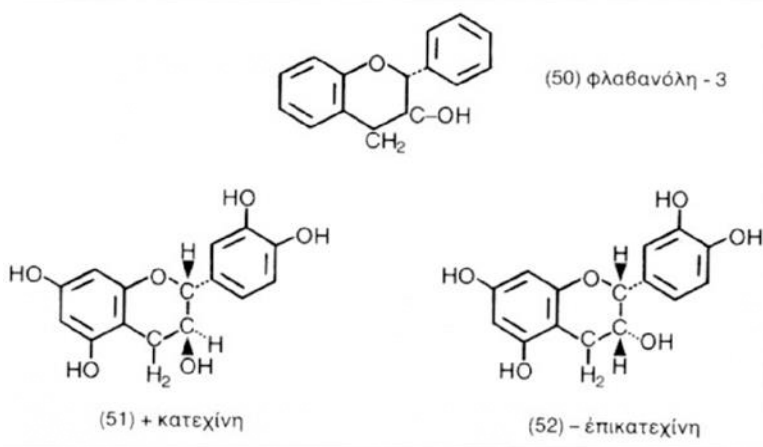
Οι φλαβανόνες διαφέρουν από τις φλαβονόλες κυρίως λόγω της απουσίας του δραστικού –OH στη θέση 3. Οι φλαβανόνες είναι ελάχιστα διαδεδομένες στη φύση και τα παράγωγά τους δεν είναι συστατικά των σταφυλών, αλλά ανήκουν στα φαινολικά συστατικά του ξύλου της δρυός. Επομένως, η παρουσία τους έχει διαπιστωθεί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

Πίνακας 1.3 Φλαβονοειδείς ενώσεις του οίνου

Βασικός τύπος	Όνομασία φαινολών	Θέση πρόσθετων ομάδων	
		OH	-OCH ₃
Φλαβονόλες			
	Καμφερόλη Κερκετίνη Μυρισετίνη Ισοραμνετίνη	4 3,4 3,4,5 4	
Φλαβανόνες			
	Ναρριγετίνη Εσπεριτίνη	4 3	4
Φλαβανόλες-3(Κατεχίνες)			
	Κατεχίνη Γαλλοκατεχίνη Επικατεχίνη Γαλλοεπικατεχίνη	R ₁ : OH R ₁ : OH	
Φλαβανοδιόλες 3,4			
	Λευκοκυανιδίνη Λευκοδελφινιδίνη Λευκομαλβινιδίνη Λευκοπετουνιδίνη	3,4 3,4,5 4 4,5	3,5 3

Κατεχίνες

Οι κατεχίνες είναι τα υδροξυλιωμένα παράγωγα της φλαβανόλη-3, με πιο διαδεδομένη την κατεχίνη. Η κατεχίνη έχει δύο ασύμμετρα άτομα άνθρακα και δίνει τέσσερα ισομερή: την (+) και (-) κατεχίνη και την (+) και (-) επικατεχίνη.



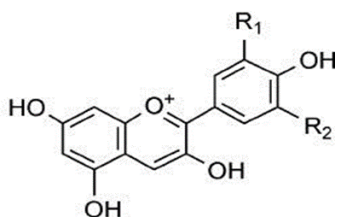
Εικόνα 1.6 Σκελετοί κατεχινών

Στα σταφύλια και στους οίνους απαντούν κυρίως η (+) κατεχίνη και η (-) επικατεχίνη

Η κατεχίνη είναι πολύ ευοξειδωτή ουσία κυρίως λόγω των δυο -OH σε ο-θέση στον πλευρικό βενζολικό δακτύλιο, και όταν θερμανθεί σε όξινο περιβάλλον πολυμερίζεται προς ενώσεις με χρώμα κίτρινο, που προοδευτικά σκουραίνει, ανάλογα με το βαθμό πολυμερισμού και μπορεί να γίνει καστανόμαυρο (Γκρέκος, Χάδος, 2002). Σε τέτοια φαινόμενα οφείλεται το καφέτισμα των οίνων και για τον λόγο αυτό η παρουσία κατεχινών στους λευκούς οίνους είναι ανεπιθύμητη.

Ανθοκυάνες ή ανθοκυανίνες

Οι ανθοκυάνες ανήκουν στις φλαβονοειδείς φαινόλες και είναι υπεύθυνες για το πορφυρό, ερυθρό, πορτοκαλί, κυανό και ιώδες χρώμα τμημάτων των φυτών. Στα σταφύλια βρίσκονται κυρίως στους φλοιούς, αλλά στις μαύρες ποικιλίες υπάρχουν και στη σάρκα. Επίσης απαντώνται σε μεγάλες ποσότητες στα φύλλα, κυρίως στο τέλος της ανάπτυξής τους. Οι ανθοκυάνες, σε αντίθεση με το σύνολο των φαινολών, μπορούν να αποτελέσουν καθοριστικό παράγοντα για την κατάταξη των οινοποιήσιμων ποικιλιών. Απαντούν στη φύση σε μορφή ετεροζιτών, οι οποίοι ως ακετάλες, υδrolύονται εύκολα προς ένα άγλυκο και ένα ή περισσότερα μόρια σακχάρων. Τα άγλυκα τμήματα λέγονται ανθοκυανιδίνες. Από τις ανθοκυανιδίνες των σταφυλιών και των οίνων η πιο διαδεδομένη είναι η κυανιδίνη, παρά το γεγονός ότι είναι, μαζί με τη δελφινιδίνη, η πιο ασταθής, λόγω των φαινολικών -OH σε ο-θέση. Αυτές οι δύο είναι και οι πρόδρομοι ανθοκυανιδινών σταθερότερων μορφών, όπως η παιονιδίνη και η μαλβιδίνη, που δεν έχουν -OH σε ο-θέση. Έτσι στα σταφύλια ερυθρών ποικιλιών μετά τον περκασμό εμφανίζεται η κυανιδίνη και η συγκέντρωσή της αυξάνεται, όπως της δελφινιδίνης, τις πρώτες δεκαπέντε μέρες ωρίμανσης, τελικά όμως επικρατεί κατά πολύ η μαλβιδίνη, που είναι η κύρια ανθοκυανιδίνη όλων σχεδόν των σταφυλιών και των έγχρωμων οίνων. Η ταξινόμηση των ανθοκυανών βασίζεται κατά κυρίως στην θέση των ομάδων υδροξυλίου (-OH) και -OCH₃ στο Β δακτύλιο του μορίου της ανθοκυανιδίνης (Monagas. and Bartolomé 2009) όπως φαίνεται στο παρακάτω πίνακα 1.4 :



Εικόνα 1.7 Σκελετός ανθοκυανιδινών

Πίνακας 1.4 Γενική δομή ανθοκυανιδινών

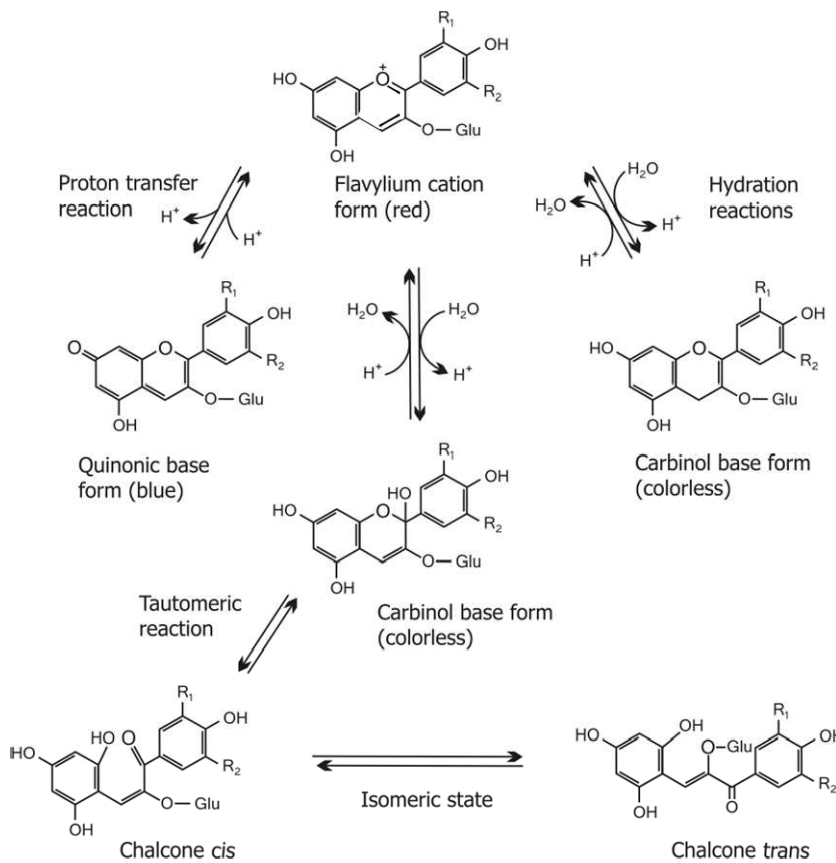
Ανθοκυανιδίνη	R2	R3
Πελαργονιδίνη	H	H
Δελφινιδίνη	OH	OH
Κυανιδίνη	OH	H
Πετουνιδίνη	OCH ₃	OH
Πεονιδίνη	OCH ₃	H
Μαλβιδίνη	OCH ₃	OCH ₃

Δομή μερικών ανθοκυανιδινών

Στα σταφύλια και το κρασί κυριαρχούν οι 3-O-ακετυλομονογλυκοζίτες και οι 3-O-κουμαροϋλμονογλυκοζίτες των πέντε κύριων ανθοκυανιδινών. Η ποσότητα και η αναλογία της κάθε κατηγορίας ανθοκυανών ποικίλλουν σημαντικά και αυτό εξαρτάται από την ποικιλία και τις συνθήκες ανάπτυξης του πρέμνου.

Η απόχρωση όσο και τη σταθερότητα του χρώματος επηρεάζονται άμεσα από τον αριθμό των υδροξυλίων του δακτυλίου B της ανθοκυανιδίνης και από το ποσοστό των ανθοκυανών. Το κυανό χρώμα αυξάνεται με τον αριθμό των ελεύθερων υδροξυλομάδων (-OH), ενώ η ερυθρότητα αυξάνει με τις μεθοξυ-ομάδες (Jackson, 1994). Κατά την αλκοολική ζύμωση, προκαλείται η αναγωγή των συστατικών του γλεύκους. Το υδρογόνο μεταφέρεται στις ανθοκυάνες από το συνένζυμο NADH₂ και προκαλεί αποχρωματισμό λόγω της αναγωγής των ανθοκυανών. Με την οξυγόνωση των νέων κρασιών, οι ανθοκυάνες ξαναπαίρνουν το χρώμα τους.

Οι ανθοκυάνες σε υδατικό διάλυμα υπάρχουν με τη μορφή τεσσάρων βασικών δομών σε ισορροπία, ανάλογα με το pH όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα. Οι σχετικές ποσότητες καθορίζονται από τις δομικές μορφές που συνυπάρχουν στην ισορροπία είναι συνάρτηση του pH του μέσου και των υποκαταστατών του.



Εικόνα 1.8 Η ισορροπία της ανθοκυάνης εξαρτώμενη από το pH

Οι σχετικές ποσότητες καθεμιάς από τις δομικές μορφές που συνυπάρχουν στην ισορροπία είναι συνάρτηση του pH του μέσου και των υποκαταστατών του. Σε πολύ όξινο pH ($pH < 2$) οι ανθοκυάνες είναι κυρίως με τη μορφή κατιόντος φλοβυλίου. Το κατιόν φλοβυλίου είναι πολύ έγχρωμο και εμφανίζεται κόκκινο. Καθώς αυξάνεται το pH, το κατιόν φλοβυλίου εξαφανίζεται γρήγορα για να δημιουργηθούν με αποπρωτονίωση διάφορες μορφές κινσοειδούς βάσης που έχουν μπλε χρώμα. Μια άλλη αντίδραση που προκύπτει είναι η ενυδάτωση κατιόντος φλοβυλίου που οδηγεί στο σχηματισμό άχρωμων ψευδοβάσεων καρβινόλης.

Από την άλλη πλευρά, σε ασθενώς όξινο περιβάλλον, όταν η θερμοκρασία των διαλυμάτων είναι υψηλή, η καρβινόλη ψευδοβάση μπορεί να μετατραπεί σε cis ή trans χαλκόνη ανοίγοντας τον δακτύλιο πυριλίου. Οι χαλκόνες μπορεί να είναι ουδέτερες και άχρωμες ή μπορούν να ιονιστούν και να έχουν ελαφρώς κίτρινο χρώμα. Η αναστροφή σε μορφή φλοβυλίου με μείωση του pH συμβαίνει πολύ πιο αργά στην περίπτωση του trans απ' ό,τι στην περίπτωση της μορφής cis, υποδεικνύοντας ότι η μορφή trans μπορεί να είναι μη αναστρέψιμη.

Στο pH του κρασιού μπορούμε να θεωρήσουμε ότι υπάρχει μια ισορροπία μεταξύ των διαφορετικών μορφών. Η κόκκινη μορφή φλοβυλίου υπάρχει μόνο σε μικρή αναλογία, ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό ανθοκυανών βρίσκεται σε άχρωμες ή ασθενώς χρωματισμένες μορφές. (Quideau et al., 2011). (Mulero et al., 2015).

- Αζωτούχες ενώσεις

Τα σταφύλια περιέχουν μία ποικιλία αζωτούχων ενώσεων εκ των οποίων οι πιο σημαντικές είναι τα α-αμινοξέα R-CH(NH₂)-COOH, τα αμμωνιακά ιόντα και τα ολιγοπεπτίδια. Η προλίνη αποτελεί το κυρίαρχο αμινοξύ σε πολλές ποικιλίες σταφυλιών και δεν μπορεί να μεταβολιστεί υπό αναερόβιες συνθήκες. Η περιεκτικότητα των αζωτούχων υλών είναι 0,5-4 g/L. περίπου το 20 % του ξηρού υπολείμματος. Διακρίνονται σε οργανικές και ανόργανες. Οι οργανικές αποτελούν το περίπου 95 % των αζωτούχων υλών, και είναι πρωτεΐνες, πεπτίδια, αμινοξέα και άλλα αζωτούχα συστατικά. Οι ανόργανες, που είναι αμμωνιακά άλατα όπως το φωσφορικό αμμώνιο (DAP), αποτελούν το υπόλοιπο περίπου 5 % των αζωτούχων υλών.

Κατά τη διάρκεια των πρώιμων σταδίων της αλκοολικής ζύμωσης, οι ενώσεις αυτές καταναλώνονται ταχύτατα από τις ζύμες, πληρώνοντας έτσι τις βιοσυνθετικές απαιτήσεις για αμινοξέα, τα οποία είναι απαραίτητα για τη σύνθεση των πρωτεϊνών και την ανάπτυξή τους. Τα αζωτούχα συστατικά προέρχονται κατά βάση από τα στερεά μέρη του σταφυλιού, ενώ το γλεύκος συχνά εμπλουτίζεται με φωσφορικό ή θειικό αμμώνιο. Η μεγάλη σημασία των αζωτούχων υλών οφείλεται στο ότι αποτελούν θρεπτικά συστατικά των ζυμομυκήτων και των βακτηρίων.

Κίνδυνοι από τις ανεπαρκείς συγκεντρώσεις αφομοιώσιμου αζώτου.

1. Μείωση του ρυθμού απόδοσης της βιομάζας έχοντας ως συνέπεια αργές ή κολλημένες ζυμώσεις.
2. Αύξηση του μεταβολικού στρες, το οποίο επίσης συνδέεται με μη επιθυμητές οσμές, όπως τα δισουλφίδια.
3. Εκτός από την επίδραση στην κινητική ανάπτυξης των ζυμών, το YAN μπορεί να ρυθμίσει τον μεταβολισμό των ζυμών σε διάφορα επίπεδα συμπεριλαμβανομένων των πτητικών και μη πτητικών δευτερογενών μεταβολιτών, οι οποίοι μεταβάλλουν τη γευστική ισορροπία των οίνων. Έτσι, η θρέψη του γλεύκους με ανόργανο άζωτο υπό τη μορφή αμμωνιακών αλάτων, όπως το διαμμωνικό φώσφορο (DAP), μπορεί να μειώσει τέτοιους κινδύνους, και να περιορίζει επίσης και την παραγωγή ανεπιθύμητων θειούχων πτητικών ενώσεων.

Το αφομοιώσιμο άζωτο εκτός από την επίδραση που προκαλεί στην κινητική ανάπτυξης των ζυμών, μπορεί και να ρυθμίσει τον μεταβολισμό των ζυμών σε διάφορα επίπεδα μεταξύ των οποίων και οι πτητικοί και μη πτητικοί δευτερογενείς μεταβολίτες, οι οποίοι μεταβάλλουν τη γευστική ισορροπία των οίνων. Από της μη πτητικές ενώσεις, η γλυκερίνη, το μηλικό οξύ και το ηλεκτρικό οξύ, ο θειώδης ανυδρίτης και τα φαινολικά μπορούν να επηρεαστούν από τη πηγή αζώτου και τη συγκέντρωση. Πολλές από τις πτητικές ενώσεις που συντίθενται από τις ζύμες, μεταβάλλονται επίσης αναλόγως τις πηγές ή/και τις συγκεντρώσεις του αζώτου. Γλεύκη φτωχά σε άζωτο δεν επιτρέπουν την ανάπτυξη των ζυμομυκήτων, γεγονός που έχει αρνητική επίπτωση στην ποιότητα του οίνου. (Markoski et al., 2016).

- 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. Έχουν εντοπιστεί πάνω από 1000 πτητικές ενώσεις 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. 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 (Quideau et al., 2011).

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

Επίσης οι εστέρες όπως ο οξικός αιθυλεστέρας και ο οξικός εξυλεστέρας (που σχηματίζονται από αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αλκοολών και του οξικού οξέος) συμβάλλουν στο άρωμα του οίνου, και τα φουράνια όπως το φουρφουρυλικό οξύ αλκοόλη (που σχηματίζεται από την αποσύνθεση των σακχάρων) και η βανιλίνη (που εκχυλίζεται από τα βαρέλια στους οίνους) συμβάλλουν στο άρωμα του οίνου (Markoski et al., 2016).

1.2 Η οξείδωση του οίνου

Η οξείδωση ορίζεται ως η απώλεια ηλεκτρονίων από ένα άτομο, μόριο ή ιόν. Αναγωγή ενός στοιχείου είναι η πρόσληψη ηλεκτρονίων από αυτό. Φυσικά οξείδωση και αναγωγή γίνονται πάντα ταυτόχρονα οπότε μπορούμε να πούμε ότι : οξειδοαναγωγή είναι η μετακίνηση ηλεκτρονίων μεταξύ ατόμων. Σε μια οξειδοαναγωγική αντίδραση, η αναγωγική ένωση προσφέρει τα ηλεκτρόνια της και έτσι η ίδια οξειδώνεται.

Το οξυγόνο συμμετέχει σε πολλές οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις του οργανισμού, εξαιτίας της ικανότητάς του να δέχεται μονήρη ηλεκτρόνια και να δημιουργεί ελεύθερες ρίζες (Δημόπουλος και Αντωνοπούλου, 2009).

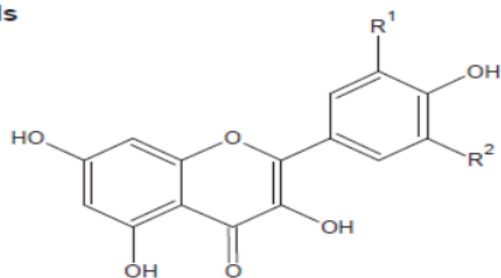
1.2.1 Υποστρώματα πρώτης γραμμής για οξείδωση

Από τα συστατικά του οίνου, οι φαινολικές ενώσεις πρέπει να ληφθούν υπόψη με ιδιαίτερο ενδιαφέρον όσον αφορά τη διαδικασία οξείδωσης που συμβαίνει κατά την οινοποίηση και την παλαίωση. Με τυπική συνολική συγκέντρωση περίπου 0,01% (συνολικό βάρος) για το λευκό κρασί και 0,2% για το κόκκινο κρασί, οι φαινόλες παίζουν βασικό ρόλο στη συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα του κρασιού. Αρκετές φαινολικές ενώσεις που υπάρχουν στο κρασί, ιδιαίτερα το κόκκινο κρασί, έχουν συγκεντρώσει επιστημονικό ενδιαφέρον σε ιατρικές εφαρμογές. Οι προκυανιδίνες, για παράδειγμα, έχουν αναγνωριστεί ως οι κύριες αγγειοδραστικές πολυφαινόλες στο κόκκινο κρασί και σχετίζονται με τη μείωση της αθανασίας από καρδιαγγειακά νοσήματα (Corder et al., 2006). Αυτή η φαρμακευτική επίδραση της κατανάλωσης κόκκινου κρασιού είναι επίσης κοινώς γνωστή ως «Γαλλικό Παράδοξο» (Renaud et al., 1992). Ορισμένες άλλες πολυφαινόλες του κρασιού εμφανίζουν επίσης επιθυμητές βιολογικές ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένων των μη φλαβονοειδών φαινολικών οξέων (κουμαρικό, κινναμικό, καφεϊκό, γεντιζικό, φερουλικό και βανιλικό οξύ), τριυδροξυστυλβένια (ρεσβερατρόλη και πολυδατίνη) και φλαβονοειδή (κατεχίνη, επικατεχίνη, et al., 1997).

Το έργο της κατανόησης των φαινολικών ενώσεων φαίνεται μάλλον περίπλοκο όταν λαμβάνει κανείς υπόψη το εύρος και την ποικιλομορφία τους. περισσότερες από 8000 δομές έχουν αναφερθεί σε φυτά (Bravo, 1998). Οι κύριες κατηγορίες φαινολικών ενώσεων που βρίσκονται παραδοσιακά στο σταφύλι και το κρασί μπορούν ουσιαστικά να ομαδοποιηθούν σε μη φλαβονοειδή και φλαβονοειδή με βάση τον ανθρακικό σκελετό τους όπως φαίνεται παρακάτω:

(a) Flavonoids

Flavonols

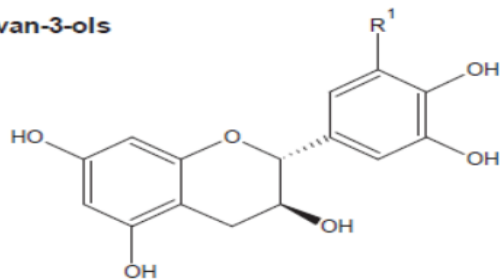


Kaempferol ($R^1=R^2=H$)

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

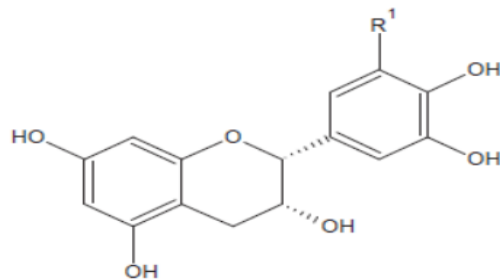
Myricetin ($R^1=R^2=OH$)

Flavan-3-ols



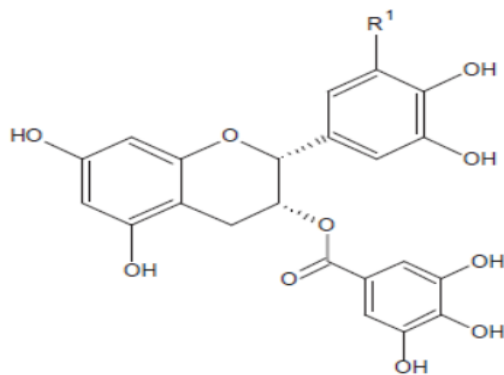
(+)-Catechin ($R^1=H$)

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



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

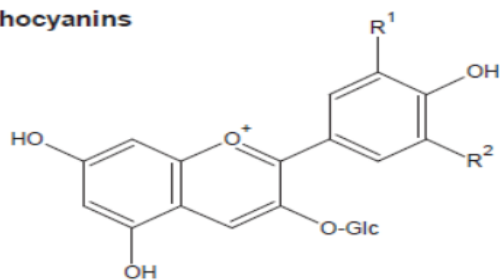
(-)-Epigallocatechin ($R^1=OH$)



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

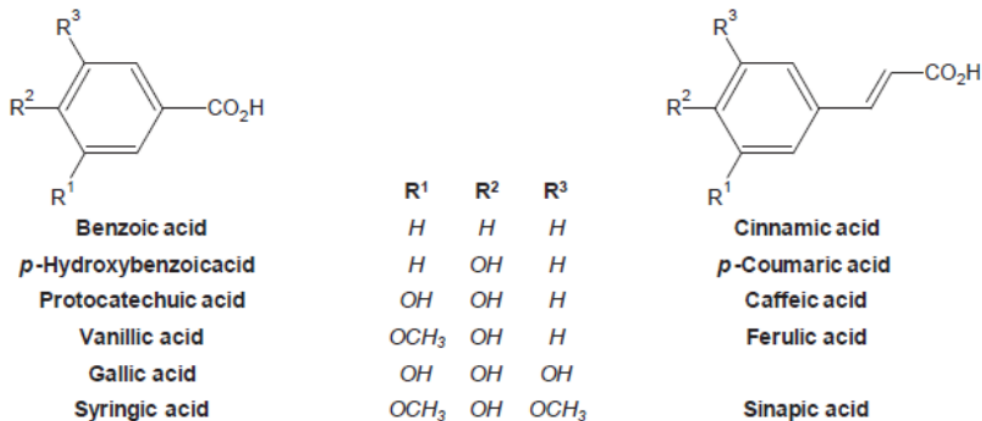
Petunidin 3-glucoside ($R^1=OH, R^2=OCH_3$)

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

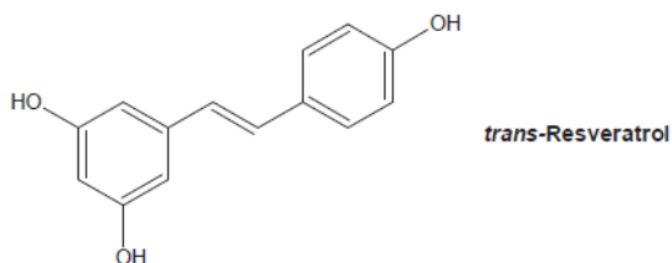
EIKONA 1.9 : Οι κυριότερες φλαβονοειδείς φαινόλες στον οίνο

(b) Non - Flavonoids

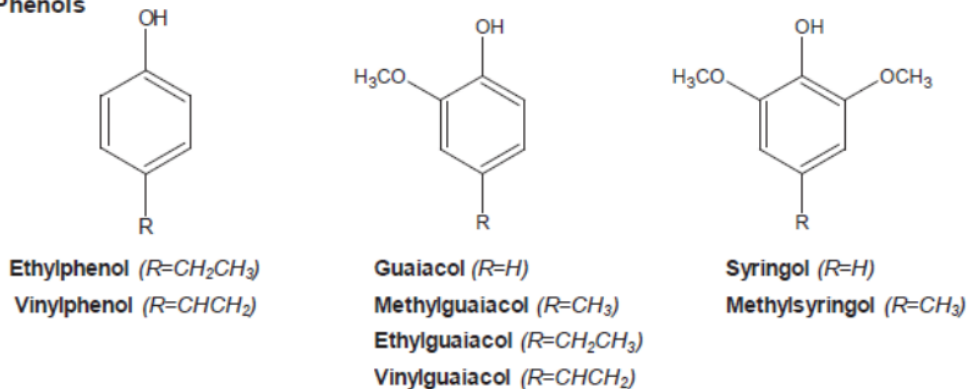
Derivates of benzoic and cinnamic acid



Stilbenes



Volatile Phenols



Εικόνα 1.10 : Οι κυριότερες μη φλαβονοειδείς φαινόλες στον οίνο

Τα φαινολικά μόρια που βρίσκονται στο κρασί προέρχονται κυρίως από το σταφύλι, όπου είναι άνισα κατανομημένα μέσα στον καρπό (Macheix et al., 1991). Υπάρχουν σημαντικές παραλλαγές μεταξύ λευκών και ερυθρών κρασιών με τα τελευταία να αντιπροσωπεύουν μεγαλύτερη πηγή φλαβονοειδών, περίπου το 85% της συνολικής περιεκτικότητας σε φαινολικά, σε σύγκριση με τα λευκά κρασιά (περίπου 20% της συνολικής περιεκτικότητας σε φαινολικά). Όλες οι φαινολικές κατηγορίες εμφανίζονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στα κόκκινα κρασιά.

Οι εξωτερικές πηγές φαινολικών ενώσεων που βρίσκονται στο κρασί περιλαμβάνουν τα βαρέλια δρυός, και βελανιδιάς που χρησιμοποιούνται για τη γήρανση, όπου τα μικρά μόρια είναι ευαίσθητα στη μετανάστευση από το ξύλο στο κρασί. Αυτά τα μόρια περιλαμβάνουν παράγωγα

υδροξυβενζοϊκού οξέος, που αντιπροσωπεύονται ως επί το πλείστον από ελλαγιικό οξύ ή γαλλικό οξύ, που προέρχονται από τη διάσπαση υδρολυόμενων τανινών υπό όξινες συνθήκες κρασιού ή απλές φαινόλες όπως η κινναμαλδεΐδη και τα παράγωγα βενζαλδεΐδης από αποικοδόμηση λιγνίνης (Macheix, 1991).

Μπορεί να σημειωθεί ότι οι υδρολυόμενες τανίνες, που ονομάζονται επίσης ελλαγιταννίνες, δεν υπάρχουν φυσικά στο σταφύλι και η παρουσία τους στο κρασί προέρχεται από οινολογικές πρακτικές όπως η παλαίωση σε βαρέλια βελανιδιάς και η εξαγωγή φυσικού ξύλου ή η προσθήκη εξωγενών τανινών σε εμπορικά προϊόντα (Moutounet et al., 2004). Επιπλέον, ορισμένα συστατικά κρασιού, ειδικά οι πτητικές αρωματικές ενώσεις, μπορούν επίσης να απορροφηθούν από το ξύλο και κατά συνέπεια να εμφανίσουν φθίνουσα συγκέντρωση στο κρασί κατά την επαφή με το ξύλο (Ramirez Ramirez et al., 2001; Barrera-Garcia et al., 2006). Αυτές οι μεταφορές μάζας οδηγούν σε μια νέα κατάσταση ισορροπίας για τις φαινολικές ενώσεις του κρασιού, οι οποίες εξαρτώνται εξαιρετικά από τις περιβαλλοντικές συνθήκες κατά την παλαίωση, όπως συγκέντρωση και μεταφορά οξυγόνου, pH, αρχικές συγκεντρώσεις φαινολών, θερμοκρασία, συγκέντρωση αιθανόλης, συγκέντρωση SO₂ και μαγιά. συγκέντρωση.

Η συγκέντρωση των φλαβονοειδών στον οίνο επηρεάζεται έντονα από τις τεχνικές οινοποίησης, όπως η πίεση και η διαβροχή που επηρεάζουν το βαθμό εκχύλισης χρωστικών από τους φλοιούς και ειδικά από τα γίγαρτα που είναι πλούσια σε φλαβανο-3-όλες. Οι παραπάνω βρίσκονται στα στερεά μέρη του σταφυλιού και διακρίνονται σε μονομερείς, ολιγομερείς ή πολυμερείς μορφές. Οι δύο τελευταίες μορφές είναι επίσης γνωστές ως προανθοκυανιδίνες ή συμπυκνωμένες τανίνες. Οι μη φλαβονοειδείς ενώσεις είναι κυρίως παράγωγα του βενζοϊκού οξέος και του κινναμωμικού οξέος. Μια άλλη κατηγορία μη φλαβονοειδών στο σταφύλι περιλαμβάνει τα στυλβένια και τις στυλβενικές γλυκοσίδες, με την trans-ρεσβερατρόλη να αποτελεί το πιο γνωστό παράδειγμα. Από οργανοληπτική σκοπιά, η ελεγχόμενη οξειδωση θα μπορούσε να είναι ευεργετική για έναν ερυθρό οίνο ενισχύοντας και σταθεροποιώντας το χρώμα του και μειώνοντας τη στυπτικότητα. Ωστόσο, η ποιότητα του λευκού οίνου γενικά υποβαθμίζεται από την έκθεση στο οξυγόνο (Singleton 1987, Singleton, 2000).

1.2.3 Κατηγορίες και μηχανισμοί οξείδωσης οίνου

- Μακροσκοπικές Τροποποιήσεις και Αισθητηριακή Αλλοίωση.

Εάν ο οίνος ληφθεί υπόψη από μακροσκοπική άποψη, οι δύο πρώτες σημαντικές αισθητηριακές εντυπώσεις είναι το χρώμα και το άρωμα. Το μαύρισμα, που προκαλείται κυρίως από την οξείδωση, μπορεί να εκληφθεί είτε ως θετική όψη, στην περίπτωση των σέρι ή των γλυκών εμπλουτισμένων οίνων όπως τα λευκά Ports ή Rivesaltes, είτε ως αρνητική πτυχή για τα ξηρά λευκά κρασιά. Το Browning, όπως υποδηλώνει το όνομα, χαρακτηρίζεται από ένα καφέ-κίτρινο χρώμα που αντικαθιστά προοδευτικά το αρχικό (γενικά ωχροκίτρινο) χρώμα μέσω της επίδρασης του οξυγόνου και το οποίο μπορεί να χαρακτηριστεί παγκοσμίως από την απορρόφηση στα 420 nm (Singleton, 1987).

Από τη μια πλευρά, το οξυγόνο φαίνεται να έχει θετική επίδραση κατά την αλκοολική ζύμωση ή τη μικροοξυγόνωση των κρασιών. Από την άλλη πλευρά, το οξυγόνο φαίνεται να παίζει αρνητικό ρόλο όταν παρατηρούνται αισθητηριακές μετατοπίσεις σε μια δεξαμενή ή φιάλη, με απώλεια φρεσκάδας και φρουτώδους, και την ανάπτυξη ενός δυσάρεστου οξειδωμένου χαρακτήρα. Πράγματι, πριν από μια εύκολα παρατηρήσιμη χρωματική αλλαγή, μια τέτοια οξειδωτική γήρανση δημιουργεί αρχικά τυπικές γεύσεις, οι οποίες γενικά περιγράφονται ως «rancio» στα γλυκά

εμπλουτισμένα κρασιά (Cutzach et al., 1998) και ως μη επιθυμητές γεύσεις «μελιού», «βραστή πατάτα», «μαγειρευτά λαχανικά», «ζωοτροφές στο αγρόκτημα», «σανό» και «σαν ξυλώδη» στα ξηρά λευκά κρασιά (Escudero et al., 2002· Silva Ferreira et al., 2002, 2003).

Λίγες όμως μελέτες διερευνούν τις χημικές τροποποιήσεις που σχετίζονται με την ανάπτυξη τέτοιων άσχημων γεύσεων.

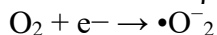
Μοριακό Οξυγόνο και Σχηματισμός Δραστικών Ειδών Οξυγόνου

Υπό τυπική θερμοκρασία και πίεση, το οξυγόνο υπάρχει ως αέριο στοιχείο που αντιπροσωπεύει το 20,9% της ατμόσφαιρας της γης. Αυτό το διατομικό μόριο με τον τύπο O₂ ονομάζεται κοινώς οξυγόνο, αν και η σωστή ονομασία του θα πρέπει να είναι διοξυγόνο και μπορεί επίσης να ονομάζεται μη δεσμευμένο οξυγόνο ή μοριακό οξυγόνο.

Ως δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS, reactive oxygen species) ορίζονται όλες οι ελεύθερες ρίζες, οι οποίες περιέχουν οξυγόνο καθώς και αυτές οι οποίες εύκολα θα μπορούσαν να μετατραπούν σε ελεύθερες ρίζες.

Παραδείγματα ROS περιλαμβάνουν τα υπεροξειδία (peroxides), τα σουπεροξειδία ή υπερ-υπεροξειδία (superoxides), τις ρίζες υδροξυλίου, το μονήρες οξυγόνο, και το άλφα-οξυγόνο.

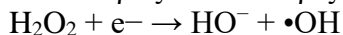
Η αναγωγή του μοριακού οξυγόνου (O₂) παράγει σουπεροξειδίο (ή υπερ-υπεροξειδίο) (•O₂⁻), το οποίο είναι ο πρόδρομος στις περισσότερες άλλες δραστικές μορφές οξυγόνου:



Αυτοοξειδοαναγωγή του σουπεροξειδίου παράγει υπεροξειδίο του υδρογόνου (H₂O₂):

$$2H^+ + \bullet O_2^- + \bullet O_2^- \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

Το υπεροξειδίο του υδρογόνου με τη σειρά του μπορεί να αναχθεί μερικώς, σχηματίζοντας έτσι ιόντα υδροξειδίου και ρίζες υδροξυλίου (•OH), ή να αναχθεί πλήρως σε νερό:

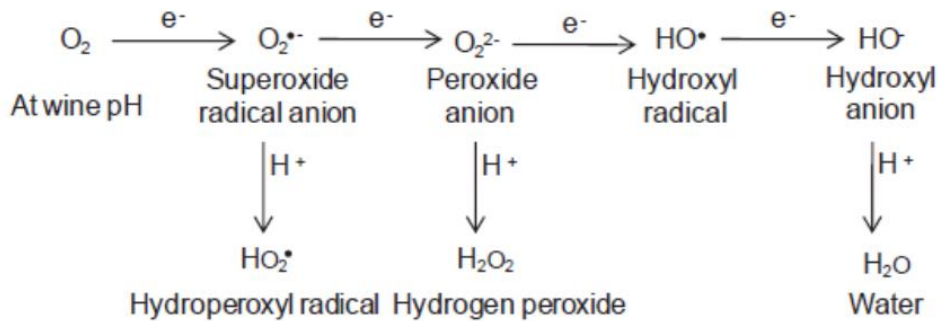


ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ	ΣΥΜΒΟΛΙΣΜΟΣ ΕΛΕΥΘΕΡΗΣ ΡΙΖΑΣ
Ρίζα υδροξυλίου	OH•
Μονήρες Οξυγόνο	O ₂
Ρίζα Σουπεροξειδίου	O ₂ • ⁻
Ρίζα Αλκοξυλίου	RO•
Ρίζα Περοξυλίου	ROO•
Υπεροξειδίο του Υδρογόνου	H ₂ O ₂
Υδρουπεροξειδίο	ROOH
Όζον	O ₃

Εικόνα 1.11 Παραδείγματα ελευθέρων ριζών

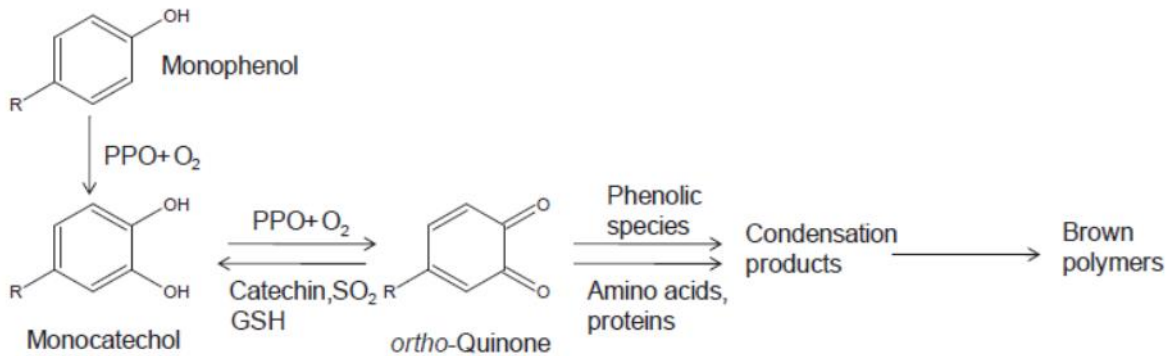
Στον οίνο, οι ρίζες αυτές μπορεί να παραχθούν από ιόντα μετάλλων χαμηλού σθένους [π.χ. Fe (II)] στη σταδιακή προσθήκη ενός μόνο ηλεκτρονίου στο οξυγόνο (O₂). Η αρχική μεταφορά ενός ηλεκτρονίου οδηγεί στο σχηματισμό του ριζικού ανιόντος (O₂•⁻), το οποίο σε pH οίνου υπάρχει ως πρωτονιωμένη ρίζα υδροϋπεροξυλίου (HOO•). Η μεταφορά ενός δευτέρου ηλεκτρονίου θα παράγει το ανιόν του υπεροξειδίου (O₂²⁻), το οποίο στο pH του οίνου βρίσκεται στην πρωτονιωμένη μορφή ως υπεροξειδίο του υδρογόνου (H₂O₂).

Το επόμενο βήμα δημιουργεί ένα ακόμη πιο δραστικό οξειδωτικό, την ρίζα υδροξυλίου (HO•), η οποία μπορεί να αφαιρέσει ένα άτομο υδρογόνου από οργανικές ενώσεις έως την παραγωγή νερού, το τελικό προϊόν της καταβολής του οξυγόνου (Danilewicz 2003; Waterhouse & Laurie 2006).



Εικόνα 1.12 : Διάγραμμα αναγωγής του οξυγόνου (Waterhouse & Laurie, 2006).

Ενζυμική οξείδωση: Ένας πιθανός μηχανισμός για την οξείδωση των φαινολικών ενώσεων περιλαμβάνει υδροξυλίωση στην ορθο-θέση δίπλα σε υπάρχουσα υδροξυλομάδα του φαινολικού υποστρώματος (δραστικότητα μονοφαινόλης οξειδάσης) και οξείδωση των ορθο-διυδροξυβενζολίων προς ορθο-βενζοκινόνες (δραστικότητα οξειδάσης διφαινόλης) (Εικόνα 1.13).



Εικόνα 1.13 : δραστικότητα οξειδάσης διφαινόλης

Η οξείδωση αυτών των φαινολών οδηγεί στο σχηματισμό ελεύθερων ριζών ημικινόνης και κινονών. Η οξείδωση των φαινολικών ενώσεων είτε θεωρείται ότι καταλύεται από ιόντα μετάλλων μετάπτωσης (Danilewicz, 2003), είτε ότι είναι αυτοκαταλυτική (Singleton, 1987· Waterhouse et al., 2006).

Στην πρώτη υπόθεση, η οξείδωση των φαινολών μεσολαβείται άμεσα από ένα μέταλλο μετάπτωσης όπως τα ιόντα σιδήρου, δίνοντας το σχηματισμό μιας ρίζας ημι-κινόνης, η οποία οξειδώνεται περαιτέρω στην αντίστοιχη κινόνη. Σε μια κυκλική αλυσίδα ριζικών αντιδράσεων, οι παράλληλες, διαδοχικές μονοσθενείς αναγωγές περιλαμβάνουν οξείδωση ιόντων σιδήρου για να σχηματίσουν τρία δραστικά είδη από το τριπλό οξυγόνο: ρίζα υδροϋπεροξειδίου, υπεροξειδίου του υδρογόνου και ρίζα υδροξυλίου.

Αυτό το τελευταίο είδος οξυγόνου είναι πολύ ασταθές και αντιδρά πολύ γρήγορα. Θεωρείται επομένως ως μια μη εκλεκτική αντίδραση οξείδωσης, όχι μόνο με φαινολικές ενώσεις αλλά και με όλες τις οξειδώσιμες οινικές ουσίες, με όσο πιο συμπυκνωμένες ουσίες είναι τόσο πιο πιθανό να οξειδωθούν τα υποστρώματα. Μέσω αυτού του μηχανισμού οξείδωσης μπορούν να σχηματιστούν πολυάριθμα προϊόντα (όπως η κινόνη από τη φαινόλη ή η δεϋδροασκορβική από το ασκορβικό οξύ). Λόγω της υψηλής συγκέντρωσης της στο κρασί, η αιθανόλη μπορεί στη

συνέχεια να οξειδωθεί από ρίζες υδροξυλίου οι οποίες στη συνέχεια ανάγεται σε νερό. Σε ένα δεύτερο βήμα, η ρίζα άνθρακα που σχηματίζεται από αιθανόλη μπορεί να αντιδράσει με ένα μόριο οξυγόνου για να σχηματίσει ακεταλδεΐδη και μια νέα ρίζα υδροϋπεροξειδίου. Η αναγέννηση μιας τέτοιας ρίζας διαιώνίζει την οξείδωση των φαινολικών ενώσεων στις αντίστοιχες μορφές κινόνης τους. Μια πιο λεπτομερής ανασκόπηση του μηχανισμού οξείδωσης στον οίνο, με ιδιαίτερη έμφαση στις δυνατότητες μείωσης των οξειδοαναγωγικών ζευγαριών που προέρχονται από τις πολυφαινόλες του κρασιού και το οξυγόνο για τις συνθήκες του οίνου, πραγματοποιήθηκε από τον Danilewicz (2003).

Η φαινολική οξείδωση μπορεί επίσης να προκύψει από την αναγωγή του οξυγόνου στη ρίζα του υδροϋπεροξειδίου (που περιλαμβάνει την οξείδωση Fe^{2+} σε Fe^{3+}), η οποία μπορεί στη συνέχεια να οξειδώσει μια φαινόλη σε μια ρίζα ημικινόνης. Τα φαινολικά είναι καλοί δότες υδρογόνου και κατά συνέπεια επιτρέπουν στις ρίζες υδροϋπεροξειδίου να αφαιρούν πρωτόνια από ομάδες υδροξυλίου. Έτσι, η ρίζα του υδροϋπεροξειδίου μετατρέπεται σε υπεροξειδίου του υδρογόνου μέσω της αποδοχής της ρίζας του υδρογόνου. Στη συνέχεια μπορεί να αναχθεί στο εξαιρετικά δραστικό είδος της ρίζας υδροξυλίου μέσω της συμμετοχής ενός ιόντος μετάλλου μεταπτώσεως. Η επίδραση του υπεροξειδίου του υδρογόνου υποπτεύεται ότι είναι το συζευγμένο προϊόν της οξείδωσης της φαινολικής ένωσης, που οδηγεί σε περαιτέρω αντιδράσεις οξείδωσης (Wildenrad et al., 1974).

Οι τρεις κύριες κατηγορίες ενζύμων που καταλύουν την οξείδωση των φαινολικών ενώσεων είναι οι οξειδοορεδοκτάσες που χρησιμοποιούν το οξυγόνο ως δέκτη ηλεκτρονίων, η μονοοξυγενάση της μονοφαινόλης και οι υπεροξειδάσες.

Οι πιο σημαντικές οξειδοορεδοκτάσες υπεύθυνες για το browning, κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας των σταφυλιών είναι πολυφαινολοξειδάσες (PPO), συγκεκριμένα η οξειδάση της κατεχόλης ή τυροσινάση, η λακκάση και υπεροξειδάσες (POD) (Li, Guo, & Wang, 2008; Whitaker, 1995). Οι πολυφαινολοξειδάσες περιέχουν Cu, ενώ οι υπεροξειδάσες περιέχουν Fe.

Η τυροσινάση, παράγεται φυσικά στο σταφύλι και μπορεί να καταλύσει την οξείδωση των μονοφαινολών και των κατεχολών (Li et al., 2008; Singleton, 1987). Η λακκάση παράγεται από μύκητες και μπορεί να οξειδώσει μεγάλο αριθμό υποστρωμάτων, ιδιαίτερα τα 1,2- και 1,4-διυδροξυβενζόλια.

Επιπλέον, το καφέτιασμα που προκαλείται από τις υπεροξειδάσες φαίνεται ασήμαντο στα φρούτα, αν και ορισμένοι ερευνητές διαπίστωσαν ότι αύξησε την υποβάθμιση της φαινόλης όταν συνυπάρχει με πολυφαινολοξειδάσες (Robards, Prenzler, Tucker, Swatsitang, & Glover, 1999).

Στο γλεύκος, το ενζυμικό καφέτιασμα συσχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με την περιεκτικότητα σε υδροξυκιναμικά άλατα όπως το καφταρικό οξύ και κουταρικό οξύ (Cheynier, Trousdale, Singleton, Salgues, & Wylde, 1986) και προωθείται από τις φλαβανο-3-όλες (Cheynier, Fulcrand, Guyot, Oszmianski, & Moutounet, 1995).

Οι βενζοκινόνες που παράγονται από ενζυματική οξείδωση θα υποστούν περαιτέρω αντιδράσεις, σύμφωνα με τις ιδιότητες οξειδοαναγωγής και τις συγγένειες των ηλεκτρονίων (Robards et al., 1999). Όταν οξειδωτικά, οι κινόνες μπορούν να οξειδώσουν ουσίες που έχουν χαμηλότερη τιμή δυναμικού Redox, όπως πολυφαινόλες και ασκορβικό οξύ καθώς και SO_2 . Η κίνηση στη συνέχεια μετατρέπεται πίσω στην αρχική της κατεχόλη.

Στην οξείδωση του γλεύκους, η αρχική πρόσληψη οξυγόνου από τα ορθοδιυδροξυβενζόλια επιβραδύνεται με την προσθήκη θειολών όπως η κυστεΐνη (Cys) ή η γλουταθειόνη (GSH) (Cheynier & Van Hulst, 1988).

Όταν το καφταρικό οξύ οξειδώνεται στην αντίστοιχη κίνηση του, από την τυροσινάση, η γλουταθειόνη θα αντιδράσει γρήγορα με την κίνηση, σχηματίζοντας ένα άχρωμο προϊόν (GRP,

2-S-γλουταθειονυλοκαταρικό οξύ), το οποίο δεν είναι πλέον υπόστρωμα για περαιτέρω οξειδωση από την τυροσινάση (*Salgues, Cheynier, Gunata, & Wylde, 1986; Singleton & Cilliers, 1995*). Ως εκ τούτου, ο σχηματισμός του GRP πιστεύεται ότι περιορίζει την οξειδωση και εξαρτάται από τις σχετικές ποσότητες γλουταθειόνης . Η ανάλυση των παλαιωμένων εμφιαλωμένων οίνων, δείχνει ότι το GRP υδρολύεται αργά στο παράγωγο καφεϊκού οξέος-γλουταθειόνης (ο τρυγικός εστέρας υδρολύεται) (*Cheynier et al., 1986*).

Όταν δεν υπάρχει διαθέσιμη γλουταθειόνη, ο πολυμερισμός των κινονών οδήγησε σε αποχρωματισμό του γλεύκους (*Salgues et al., 1986*). Είναι αποδεκτό ότι η τυροσινάση είναι πιο ευαίσθητη στο SO₂, ενώ η λακκάση είναι πιο ανθεκτική σε SO₂ και έχει ένα ευρύτερο φάσμα οξειδωσης του υποστρώματος (*Du Toit, Marais, Pretorius, & Du Toit, 2006*).

Γενικά, δεν είναι επιζήμια η εμφάνιση της ενζυματικής οξειδωσης σε γλεύκος λευκού σταφυλιού. Η υπεροξυγόνωση του λευκού γλεύκους μειώνει τη δυνατότητα οξειδωσης του οίνου με δύο τρόπους: από την εξαφάνιση της τυροσινάσης και από την εξάντληση των οξειδώσιμων πολυφαινολών κατά τη διάρκεια των αντιδράσεων οξειδωσης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οίνοι με χαμηλές συγκεντρώσεις πολυφαινολών και υψηλή περιεκτικότητα σε GRP, να είναι πιο σταθεροί από εκείνους που παράγονται από μη οξειδωμένο γλεύκος , όπου τα υψηλά περιεχόμενα πολυφαινολών διατηρούνται με υψηλό δυναμικό οξειδωσης (*Li et al., 2008*). Ωστόσο, κατά τη διάρκεια της οινοποίησης του ερυθρού οίνου η επίδραση της ενζυματικής οξειδωσης είναι περιορισμένη (*Cheynier, Fulcrand, & Moutounet, 2000*).

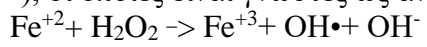
Μη ενζυματική οξειδωση : Κατά τη διάρκεια της μη ενζυματικής οξειδωσης, που ονομάζεται επίσης και χημική οξειδωση του οίνου, οι οξειδωτικές διεργασίες ευνοούνται από την οξειδωση των πολυφαινολών που περιέχουν ένα τμήμα ορθο-διυδροξυβενζολίου (α- δακτύλιος κατεχόλης) ή τμήμα 1,2,3-τριυδροξυβενζολίου (ομάδα γαλοϋλίου), όπως (+) - κατεχίνη / (-) - επικατεχίνη, γαλακτοκίνη, γαλλικό οξύ και οι εστέρες του και το καφεϊκό οξύ, που είναι το πιο εύκολα οξειδώσιμα συστατικά του οίνου (*Singleton, 1987; Singleton, 2000; Kilmartin, Zou, & Waterhouse, 2001; Danilewicz, 2003; Li et al., 2008*). Αυτά τα υποστρώματα διαδοχικά οξειδώνονται σε ρίζες ημικινόνης και βενζοκινόνες, ενώ το οξυγόνο γίνεται υπεροξειδίο του υδρογόνου και όλη η διαδικασία διαμεσολαβείται από τον κύκλο redox των Fe³⁺ / Fe²⁺ και Cu²⁺ / Cu⁺ (*Danilewicz, Seccombe, & Whelan, 2008*). Περαιτέρω ενώσεις με πιο απομονωμένες φαινολικές ομάδες όπως η μαλβιδίνη, η κύρια έγχρωμη ανθοκυανίνη σε ερυθρούς οίνους , το παρακουμαρικό οξύ και η ρεσβερατρόλη είναι οξειδώσιμα συστατικά σε υψηλότερα δυναμικά (*Kilmartin et al., 2001*).

Ο Danilewicz (2003) και οι Waterhouse και Laurie (2006) έχουν εξετάσει τους προτεινόμενους μηχανισμούς με τους οποίους το οξυγόνο και τα ενδιάμεσα αναγωγικά προϊόντα αντιδρούν με συστατικά του κρασιού, όπως η συμμετοχή των μεταλλικών ιόντων μετάβασης σε αυτές τις αντιδράσεις. Οι συγγραφείς έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα ότι το οξυγόνο δεν αντιδράει άμεσα με τις φαινολικές ενώσεις χωρίς την παρουσία μεταλλικών ιόντων μετάπτωσης.

Επιπλέον, μια επέμβαση ιόντων σιδήρου, χαλκού και μαγγανίου είχε ήδη παρατηρηθεί σε οξειδωση του οίνου (*Cacho, Castells, Esteban, Laguna, & Sagristá, 1995*).

Οι κινόνες που σχηματίστηκαν από την οξειδωση των πολυφαινολών, ως πρωτογενή προϊόντα, είναι ασταθή και μπορεί να υποστούν περαιτέρω αντιδράσεις. Οι κινόνες μπορούν να συνδυαστούν αυθόρμητα με πυρηνόφιλες ενώσεις (συμπεριλαμβανομένων ορισμένων φαινολών, θειολών και αμινών) λόγω του υψηλού τους ηλεκτροφιλικού χαρακτήρα. Επιπλέον, αυτά τα διμερή ή πολυμερή σε συζευγμένες αντιδράσεις οξειδωσης , έχουν χαμηλότερα δυναμικά οξειδοαναγωγής από τις αρχικές φαινόλες τους και είναι πολύ πιο εύκολα οξειδώσιμα (*Li et al., 2008; Singleton, 1987*). Κατά συνέπεια, προτείνεται ότι η οξειδωση αυτών των προϊόντων οδηγεί σε επιτάχυνση της διαδικασίας πολυμερισμού (*Boulton, Singleton, Bisson, & Kunkee, 2001; Zhai, Du, Guan, Qiao, & Pan, 2001*).

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου αντιδράει με τα ιόντα σιδήρου και παράγει ρίζες υδροξυλίου (HO•), οι οποίες είναι γνωστές ως αντίδραση Fenton .



Ο ρυθμός αντίδρασης των φαινολικών ενώσεων με ROS εξαρτάται από την ικανότητα σχηματισμού σταθερής ρίζας προϊόντος.

1.2.4 Συνέπειες οξείδωσης

Μία από τις πρώτες αντιδράσεις που περιγράφονται στους ερυθρούς οίνους, ήταν η αντίδραση πολυμερισμού μεταξύ ανθοκυανινών και φλαβανολών (κατεχίνες και συμπυκνωμένες τανίνες) με την μεσολάβηση της ακεταλδεΐδης (Lee, Swinny, & Jones, 2004; Rivas-Gonzalo, Bravo-Haro & Santos-Buelga, 1995; Timberlake & Bridle, 1976). Η ακεταλδεΐδη μπορεί επίσης να συνδεθεί με τις φλαβανόλες τα οποία συνδεόμενα με την μεθυλομεθίνη, παράγουν προσθετικά φλαβανόλης (Cheynier, 2005; Danilewicz, 2003; Fulcrand, Dueñas, Salas, & Cheynier, 2006). Αρκετές πρόσφατες αναφορές σχετικά με τις επιπτώσεις της μικρο-οξυγόνωσης στους ερυθρούς οίνους και επιβεβαίωσαν την απώλεια μονομερών ανθοκυανινών και άλλων πολυφαινολών, μαζί με το σχηματισμό πολυμερών χρωστικών, ανθεκτικών στο διοξείδιο του θείου (SO₂), συχνά με συνέπεια την αύξηση της έντασης του χρώματος του οίνου (De Beer, Joubert, Marais, & Manley, 2008; Tao, Dykes, & Kilmartin, 2007). Επιπρόσθετες αλλαγές στις ερυθρές χρωστικές, περιλαμβάνουν τον σχηματισμό ενώσεων μεθυλμεθανοανθοκυανίνης-κατεχίνης και ενώσεων πυρανοανθοκυανίνης-κατεχίνης, οι οποίες διαμεσολαβούνται από την ακεταλδεΐδη η οποία απελευθερώνεται κατά τη διάρκεια των διεργασιών οξείδωσης του οίνου (οξείδωση αιθανόλης), όπως θα δούμε στο επόμενο υποκεφάλαιο (Timberlake & Bridle, 1976; Francia-Aricha, Guerra, Rivas-Gonzalo & Santos, 1997; Mateus, Silva, Santos-Buelga, Rivas-Gonzalo, & De Freitas, 2002).

Η αύξηση της ακεταλδεΐδης έχει καταγραφεί στα μεταγενέστερα στάδια της μακροπρόθεσμης μικρο-οξυγόνωσης (Carlton, Gump, Fugelsang, & Hasson, 2007) και κατά τη διάρκεια μιας ηλεκτροχημικής μικροοξείδωσης (Fell, Dykes, Nicolau & Kilmartin, 2007).

Μια περαιτέρω επίδραση στον ρυθμό των οξειδωτικών αλλαγών κατά τη μικρο-οξυγόνωση είναι το επίπεδο του SO₂ στον οίνο. Σε έναν ερυθρό οίνο ο οποίος υποβλήθηκε σε μικρο-οξυγόνωση με προσθήκες 0 έως 200 mg / L SO₂, παρατηρήθηκε μεγάλη μείωση της ποσότητας των μονομερών ανθοκυανινών και της φλαβαν-3-όλης σε οίνους με χαμηλότερη συγκέντρωση SO₂, σε συνδυασμό με αύξηση των χρωστικών, αύξηση των τανινών και μεγαλύτερος ερυθρός χρωματισμός ενός εκχυλίσματος προανθοκυανιδίνης (Tao et al., 2007). Αυτές οι αλλαγές έλαβαν χώρα σε μεγάλο βαθμό σε οίνους, οι οποίοι αρχικά υποβλήθηκαν σε προσθήκη 200 mg / L SO₂ και εμφανίστηκαν αργότερα σε οίνους οι οποίοι αποθηκεύτηκαν σε φιάλες απουσία O₂.

Η συγκέντρωση του SO₂ φαίνεται να ρυθμίζει τη χημεία των πολυφαινολών, η οποία εμπλέκεται στον σχηματισμό πολυμερών χρωστικών και σε αλλαγές στη δομή των τανινών, οι οποίες επηρεάζουν την στυπτικότητα του οίνου (Tao et al., 2007).

Οι λευκοί οίνοι περιέχουν χαμηλότερα επίπεδα πολυφαινολών, κυρίως υδροξυκιναμικών οξέων (Betes-Saura, Andres-Lacueva, & Lamuela-Raventos, 1996), αλλά αυτά παραμένουν πολύ σημαντικά για ζητήματα που σχετίζονται με την οξείδωση στα αρώματα του οίνου και τις απώλειες του αρώματος της ποικιλίας. Οι χαμηλές συγκεντρώσεις φλαβονοειδών όπως η κατεχίνη και η γλυκοζυλιωμένη κερκετίνη παραμένουν σημαντικές ιδιαίτερα για το browning και είναι πιο διαδεδομένες σε γλεύκη που εκτίθενται σε μεγαλύτερους χρόνους επαφής με το φλοιό και σε μεγαλύτερες πιέσεις (Singleton, 1987).

1.3 Μέθοδος προσδιορισμού πολυφαινολών οίνου με την μέθοδο Folin Ciocalteu

Χρησιμοποιούνται διάφοροι τύποι μεθόδων για την ανάλυση του περιεχομένου των φαινολικών ενώσεων στους οίνους, όπως η χρωματογραφία, ο ηλεκτροδιαχωρισμός και ειδικά οι οπτικές μέθοδοι. Μία από τις ευρέως χρησιμοποιούμενες, έγκυρες και επίσης μια από τις ευκολότερες μεθόδους και μέθοδος αναφοράς για τον προσδιορισμό των συνολικών πολυφαινολών, είναι η φασματοφωτομετρική μέθοδος χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (FC) που προτάθηκε από τους Folin και Denis (1912) και αργότερα τροποποιήθηκε από τους Folin and 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.

Η αρχή της βασίζεται στην οξείδωση των φαινολικών ενώσεων σε αλκαλικό μέσο με μολυβδαίνιο και φωσφορικό βολφράμιο για σχηματισμό ενός μπλε χρώματος συμπλόκου. Η ένταση του συμπλόκου του μπλε βολφραμίου με τις πολυφαινόλες μετράται φασματοφωτομετρικά στο μήκος κύματος των 750 nm. Αυτή η μέθοδος αργότερα τροποποιήθηκε πολλές φορές και η μέθοδος που πρότειναν οι Singleton και Rossi (1965) είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη για την ανάλυση της συνολικής περιεκτικότητας σε πολυφαινόλες (TP) στους οίνους. Πολλοί άλλοι συγγραφείς (Alonzo et al., 2002; Lachman et al., 2003; Šulc et al., 2003; Vichitphan et al., 2007; Majo et al., 2008; Satora et al., 2008; Geldenhuys, 2009; Weingerl et al., 2009; Amendola et al., 2010; Ivanova et al., 2011; κ.λπ.) ανέφεραν και πρότειναν τροποποίηση αυτής της μεθόδου.

Έχει βελτιστοποιηθεί και επαληθευθεί η μέθοδος προσδιορισμού των συνολικών πολυφαινολών στους οίνους. Η τιμή μιας ανάλυσης της βελτιστοποιημένης μεθόδου είναι 10 φορές χαμηλότερη από την τιμή μιας ανάλυσης της τυπικής μεθόδου, που αναπτύχθηκε από τους Šulc et al. (2003).

Ωστόσο, δεν είναι τόσο ακριβής η συσχέτιση για τους ερυθρούς οίνους, λόγω του γεγονότος ότι ορισμένα ερυθρά κρασιά έδειξαν υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα παράλο που είχαν χαμηλή συγκέντρωση ολικών φαινολών.

Όλες οι φαινολικές ενώσεις που περιέχονται στο κρασί οξειδώνονται από το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu. Το αντιδραστήριο αυτό σχηματίζεται από ένα μίγμα από φωσφοβολφραμικό οξύ, H₃PW₁₂O₄₀, και φωσφομολυβδικό οξύ, H₃PMo₁₂O₄₀, το οποίο, κατά την οξείδωση του από τις φαινόλες, ανάγεται σε ένα μίγμα μπλε οξειδίων του βολφραμίου, W₈O₂₃, και του μολυβδαινίου, Mo₈O₂₃. Το μπλε χρώμα παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στη περιοχή των 750 nm, και είναι ανάλογο με τη συνολική ποσότητα των φαινολικών ενώσεων.

Το αντιδραστήριο είναι εμπορικώς διαθέσιμο σε μορφή έτοιμη για χρήση.

Η μέτρηση της απορρόφησης γίνεται επίσης, και με την χρήση φασματοφωτομέτρου στα 280 nm. Ενώσεις με αρωματικούς δακτυλίους –όπως οι φαινόλες– απορροφούν την υπεριώδη ακτινοβολία.

Μειονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι ότι όλοι οι φαινολικοί δακτύλιοι απορροφούν ακτινοβολία καθώς και οι μη φαινολικές ενώσεις οι οποίες περιέχουν και αρωματικούς δακτυλίους (νουκλεοτίδια, αρωματικά αμινοξέα, πεπτίδια, πρωτεΐνες), άρα δεν προσφέρει καμία πληροφορία σχετικά με τον τύπο των φαινολικών που μετρήθηκαν. Επίσης, δεν εφαρμόζεται σε λευκούς οίνους με μεγάλη ακρίβεια.

Η μέθοδος Folin-Ciocalteu έχει μερικά πλεονεκτήματα όπως είναι :

1. Το αντιδραστήριο είναι εμπορικά διαθέσιμο, και η διαδικασία είναι τυποποιημένη.
2. Η απορρόφηση σε μεγάλο μήκος κύματος του χρωμοφόρου (730 nm) ελαχιστοποιεί την πιθανότητα εσφαλμένων αποτελεσμάτων λόγω της καταμέτρησης και των χρωστικών του δείγματος καθώς πολλά οργανικά δείγματα περιέχουν χρωστικές ουσίες.
3. Είναι μια γενικά αποδεκτή τεχνική που εφαρμόζεται για τα αντιοξειδωτικά τροφικής προελεύσεως σε όλο τον κόσμο
4. Έχει παραχθεί μια μεγάλη βάση δεδομένων με συγκρίσιμα αποτελέσματα (εκφράζεται ως η συνολική περιεκτικότητα σε φαινόλες, αντί για μείωση της παραγωγικής ικανότητας). Η μέθοδος Folin-Ciocalteu εφαρμόζεται σε υδατικά διαλύματα (Huang et al., 2005).

Για την απόκτηση αξιόπιστων αλλά και προβλέψιμων αποτελεσμάτων απαραίτητη προϋπόθεση είναι (Prior et al., 2005):

- A. Η σωστή αναλογία του όγκου μεταξύ του αντιδραστηρίου και του αλκαλίου
- B. Εφαρμογή του βέλτιστου χρόνου αντίδρασης και θερμοκρασίας για την ανάπτυξη του χρώματος
- C. Οπτική πυκνότητα λ_{max} στα 765 nm
- D. Χρήση γαλλικού οξέος ως πρότυπο

- Υλικά και αντιδραστήρια για την μέθοδο Folin-Ciocalteu

Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu
Ανθρακικό νάτριο (Na_2CO_3) 20%(W/V)
Διάλυμα γαλλικού οξέος 50 mgr/100 ml
Απεσταγμένο νερό
Δείγματα κρασιών
Καφεϊκό οξύ

- Όργανα μεθόδου Folin-Ciocalteu
Αυτόματες πιπέτες των 10-100 μL και 100-1000 μL
Σιφώνια 5ml, 10ml, 20ml
Ογκομετρικές φιάλες των 25 ml, 100 ml, 250 ml
Αναλυτικός ζυγός
Γυάλινη ράβδος
Ποτήρια ζέσεως
Φασματοφωτόμετρο UV-Vis
Γυάλινες κυψελίδες ($b=1,00$)

1.4 Αντιοξειδωτική ικανότητα οίνου

Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται αναπόφευκτα στα βιολογικά συστήματα και αντιμετωπίζονται επίσης εξωγενώς, και είναι γνωστό ότι προκαλούν διάφορες εκφυλιστικές διαταραχές στον άνθρωπο, όπως η μεταλλαξογένεση, καρκινογένεση, καρδιαγγειακές διαταραχές και γήρανση (Singh και Singh 2008).

Τα αντιοξειδωτικά είναι οι ενώσεις, οι οποίες καταπολεμούν τις ελεύθερες ρίζες παρεμβαίνοντας σε οποιοδήποτε από τα τρία βασικά στάδια της -μεσολαβούμενης από τις ελεύθερες ρίζες- οξειδωτικής διαδικασίας, δηλαδή, έναρξη, διάδοση και τερματισμό (Cui et al. 2004). Αυτά τα αντιοξειδωτικά παράγονται επίσης από το βιολογικό σύστημα και εμφανίζονται φυσικά σε πολλά τρόφιμα και η ισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών συνεισφέρει στην υγεία και τη δύναμη (Halliwell, 1996).

Η δράση τους είναι δηλαδή, η δέσμευση των ελεύθερων ριζών ή η αναστολή της παραγωγής τους. Ανάλογα με το μηχανισμό δράσης που χρησιμοποιούν τα αντιοξειδωτικά, γίνετε ο διαχωρισμός τους σε ομάδες.

Ο διαχωρισμός κατατάσσει τα αντιοξειδωτικά σε πρωτογενή, τα οποία διακόπτουν τις αντιδράσεις των ελεύθερων ριζών και στα δευτερογενή που έχουν προληπτική δράση και διασπών τα υδροϋπεροξειδία επιβραδύνοντας έτσι τον ρυθμό εκκίνησης της αλυσιδωτής αντίδρασης που οδηγεί στον πολυμερισμό. (Κοτροκόης και Παπαδογιαννάκης, 2009).

Στα πρωτογενή ανήκουν οι φαινολικές ενώσεις και οι τοκοφερόλες.

Στα δευτερογενή οι δράσεις των αντιοξειδωτικών είναι:

1. Δεσμευτές οξυγόνου. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν το ασκορβικό οξύ και οι εστέρες του.
2. Δεσμευτές μετάλλου, όπου είναι το κιτρικό οξύ, το τρυγικό οξύ και το EDTA.
3. Αυτά που εξαλείφουν το διεγερμένο οξυγόνο που είναι το β-καροτένιο και οι τοκοφερόλες
4. Αναγωγικά και ο ρόλος τους είναι η αναγέννηση των φαινολικών αντιοξειδωτικών.
5. Και τέλος τα πολλαπλής δράσης φωσφολιπίδια (Κοτροκόης και Παπαδογιαννάκης, 2009).

Τα αντιοξειδωτικά, δρουν μετατρέπόμενα προσωρινά σε ελεύθερες ρίζες. Προσφέρουν δηλαδή τα ηλεκτρόνια τους στις ελεύθερες ρίζες, έτσι αυτές εξουδετερώνονται, ενώ το αντιοξειδωτικό μετατρέπεται προσωρινά σε ελεύθερη ρίζα αφού έχει ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο. Όμως τα αντιοξειδωτικά αυτά έχουν την ικανότητα να αποβάλουν το ασύζευκτο αυτό ηλεκτρόνιο χωρίς να δημιουργούν βλάβες στα κύτταρα λόγω των συστημάτων των οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων. Οι δράσεις και οι αντιδράσεις των ελευθέρων ριζών και ηλεκτρονίων εξηγούν πάρα πολλά χημικά φαινόμενα που συνοδεύουν όχι μόνο την τροφική αλυσίδα αλλά σχεδόν όλο το σύνολο των βιοχημικών κύκλων της ζωής, όπως είναι η γήρανση των κυττάρων και του οργανισμού αλλά και η ενοχοποίηση τους για καρκινογένεσεις (Σφλώμος, 2011).

Ταξινομούμε επίσης τα αντιοξειδωτικά στις εξής κατηγορίες : στα ενζυματικά και τα μη ενζυματικά αντιοξειδωτικά .

Τα μη ενζυματικά αντιοξειδωτικά λειτουργούν διακόπτοντας τις αλυσιδωτές αντιδράσεις των ελεύθερων ριζών. Για παράδειγμα, η βιταμίνη E μπορεί να διακόψει μια αλυσίδα δραστηριότητας των ελευθέρων ριζών μέσα σε μόνο πέντε αντιδράσεις. Τα μη ενζυματικά αντιοξειδωτικά περιλαμβάνουν τα εξής : την βιταμίνη C, βιταμίνη E, φυτικές πολυφαινόλες, καροτενοειδή και την γλουταθειόνη (GSH).

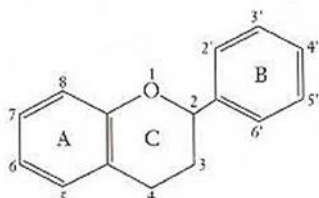
Η γλουταθειόνη έχει ονομαστεί ως το «κύριο αντιοξειδωτικό» και βρίσκεται σε κάθε κύτταρο του σώματός μας, μεγιστοποιώντας τη δραστηριότητα όλων των άλλων αντιοξειδωτικών.

Φυσικά και τεχνητά αντιοξειδωτικά: Τα αντιοξειδωτικά τέλος χωρίζονται σε δύο ομάδες ανάλογα με την προέλευσή τους ως «φυσικά αντιοξειδωτικά» και «συνθετικά αντιοξειδωτικά».

Τα περισσότερα από τα συνθετικά αντιοξειδωτικά είναι φαινολικού τύπου. Οι διαφορές στις αντιοξειδωτικές τους δραστηριότητες σχετίζονται με τις χημικές τους δομές, οι οποίες επηρεάζουν επίσης τις φυσικές τους ιδιότητες όπως η πτητικότητα, η διαλυτότητα και η θερμική σταθερότητα. Τα εμπορικά διαθέσιμα και επί του παρόντος χρησιμοποιούμενα συνθετικά αντιοξειδωτικά είναι βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη (BHA), βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο (BHT) και η τρι-βουτυλο υδροκινόνη (TBHQ).

Συνθετικά αντιοξειδωτικά : Τα τελευταία χρόνια, υπάρχει ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον για τα φυσικά αντιοξειδωτικά και στη συνέχεια μελετώντας την βιβλιογραφία αναγνωρίζεται ότι η αντικατάσταση των συνθετικών αντιοξειδωτικών από φυσικά μπορεί να έχει πολλά οφέλη και μεγάλο μέρος της έρευνας για τα φυσικά αντιοξειδωτικά έχει επικεντρωθεί στις φαινολικές ενώσεις, συγκεκριμένα στα флаβονοειδή ως πιθανές πηγές φυσικών αντιοξειδωτικών . Αριθμός φυσικών αντιοξειδωτικών ενώσεων που υπάρχουν σε φρούτα, λαχανικά και συμπληρώματα διατροφής , αποτελούν το ασκορβικό οξύ, α-τοκοφερόλη, φαινολικά οξέα (βενζοϊκό οξύ, trans-κινναμωμικό οξύ και υδροξυκινναμικό οξύ), κουμαρίνες, λιγνάνες, στιλβένια (σε γλυκοζυλιωμένη μορφή), флаβονοειδή, ισοφλαβονοειδή και φαινολικά πολυμερή (τανίνες).

Φλαβονοειδή ως αντιοξειδωτικά :



Εικόνα 1.14 Βασικός σκελετός флаβονοειδών

Τα флаβονοειδή (εικόνα 1.14) είναι δευτερεύοντα φυτικά προϊόντα που, όπως προηγουμένως αναφέρθηκε, αναγνωρίζονται ως οι χαρακτηριστικές κόκκινες, μπλε και μοβ χρωστικές της ανθοκυανίνης των φυτικών ιστών. Εκτός από τους φυσιολογικούς ρόλους τους στα φυτά, τα флаβονοειδή χαρακτηρίζονται ως σημαντικά συστατικά της ανθρώπινης διατροφής , αλλά ποτέ δεν θεωρούνται θρεπτικά συστατικά . Οι διάφορες κατηγορίες флаβονοειδών διαφέρουν ως προς το επίπεδο οξείδωσης και τον τρόπο αντικατάστασης του C δακτυλίου.

Μεταξύ των διαφόρων κατηγοριών флаβονοειδών, οι σημαντικές είναι οι флаβόνες, οι флаβονόνες, οι ισοφλαβόνες, οι флаβονόλες, η флаβανόλη (κατεχίνη), οι флаβονόλες, οι флаβάνες-3-όλες και οι ανθοκυανιδίνες (Κουράκου θέματα οινολογίας, Manach 2004) .

Η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα ή η αντιοξειδωτική δράση είναι ένας όρος χωρίς το πλαίσιο συγκεκριμένων συνθηκών αντίδρασης όπως θερμοκρασία, πίεση, μέσο αντίδρασης, σημεία αναφοράς, χημική αντιδραστικότητα κ.λπ.

Τα αντιοξειδωτικά παραδοσιακά χωρίζονται σε δύο κατηγορίες. πρωτογενή ή αντιοξειδωτικά που σπάζουν την αλυσίδα και δευτερογενή αντιοξειδωτικά .

Τα δευτερογενή αντιοξειδωτικά επιβραδύνουν το ρυθμό οξείδωσης. Τα ενεργά μέταλλα Redox όπως ο σίδηρος (Fe), ο χαλκός (Cu), το χρώμιο (Cr), το κοβάλτιο (Co) και άλλα μέταλλα τα οποία υφίστανται οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις και διαθέτουν την ικανότητα να παράγουν αντιδραστικές ρίζες σε βιολογικά συστήματα όπως η ρίζα ανιόντων υπεροξειδίου και το νιτρικό οξείδιο.

Αυτά τα μεταλλικά ιόντα είναι απαραίτητα για πολλές φυσιολογικές λειτουργίες, καθώς τα συστατικά των πρωτεϊνών του αίματος και των συμπαραγόντων διαφορετικών ενζύμων στην αντιοξειδωτική άμυνα. Τυπική αντίδραση τύπου Fenton που δημιουργεί ελεύθερες ρίζες περιλαμβάνει την οξείδωση ιόντων σιδήρου σε ιόντα σιδήρου με υπεροξειδίο υδρογόνου για τη δημιουργία ρίζας υδροξυλίου και ανιόν υδροξυλίου. Ο σίδηρος (III) στη συνέχεια ανάγεται σε σίδηρο (II), μια ρίζα υπεροξειδίου και ένα πρωτόνιο από το ίδιο υπεροξειδίο υδρογόνου. Οι ελεύθερες ρίζες που δημιουργούνται από αυτήν τη διαδικασία εμπλέκονται σε αριθμό δευτερογενών αντιδράσεων.

Υπάρχει ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον για τα αντιοξειδωτικά, ιδιαίτερα σε εκείνα που αποσκοπούν στην αποτροπή των υποτιθέμενων επιβλαβών επιδράσεων των ελεύθερων ριζών στο ανθρώπινο σώμα και στην αποτροπή της φθοράς των λιπών και των άλλων συστατικών των τροφίμων. Και στις δύο περιπτώσεις, υπάρχει προτίμηση για αντιοξειδωτικά από φυσικές και όχι από συνθετικές πηγές (Abdalla and Roozen, 1999). Υπάρχει συνεπώς μια παράλληλη αύξηση στη χρήση μεθόδων για την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας τέτοιων ουσιών όπως τα αντιοξειδωτικά (Sa'nchez-Moreno, 2002; Schwarz, et al., 2001).

Επομένως, είναι σημαντικό να γνωρίζουμε το αντιοξειδωτικό περιεχόμενο και την αποτελεσματικότητά τους στα τρόφιμα, για τη συντήρηση ή την προστασία από οξειδωτικές βλάβες, για να αποφευχθούν επιβλαβείς αλλαγές και απώλεια εμπορικής και θρεπτικής αξίας (Halliwell, 1997). Αυτό απαιτεί την ανάπτυξη μιας ταχείας μεθόδου για τον προσδιορισμό της πιθανής αντιοξειδωτικής ικανότητας σε διάφορα τρόφιμα.

Η αντιοξειδωτική δραστηριότητα στα βιολογικά συστήματα και τα τρόφιμα μπορεί να είναι αξιολογηθεί με μεθόδους , οι οποίες βασίζονται σε χημικές αντιδράσεις ή στις χημικές-φυσικές ιδιότητες των αντιοξειδωτικών.

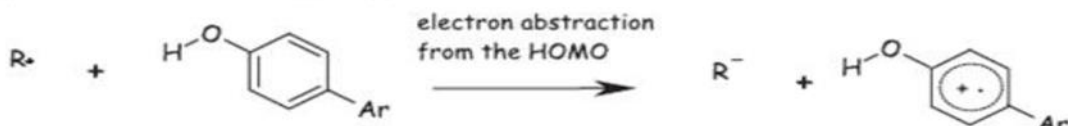
1.5 Τεχνικές μέτρησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των οίνων

Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων βιολογικής προέλευσης υπάρχουν διάφορες μέθοδοι, οι οποίες διαφέρουν μεταξύ τους στην εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του δείγματος αλλά και στην πολυπλοκότητα τους, στον εργαστηριακό εξοπλισμό, στον χρόνο που χρειάζεται αλλά και στην ικανότητα τους να αναλυθούν λιπόφιλα και υδρόφιλα δείγματα. Η ταξινόμηση των μεθόδων αυτών γίνεται σε δυο κατηγορίες βάση του μηχανισμού με τον οποίο δρουν. Έτσι υπάρχουν οι μέθοδοι που βασίζονται στην μεταφορά ατόμου υδρογόνου (Hydrogen Atom Transfer, HAT μέθοδοι) και σε μεθόδους που βασίζονται στην μεταφορά ηλεκτρονίου (Single Electron Transfer, SET μέθοδοι) (εικόνα 1.7).

1. Hydrogen Atom Transfer (HAT)



2. Single Electron Transfer (SET)



Εικόνα 1.15 : Μηχανισμοί δράσης των αντιοξειδωτικών (Leopoldini et al., 2011)

Στην πρώτη κατηγορία οι μέθοδοι βασίζονται στην ικανότητα που έχει το αντιοξειδωτικό να δίνει ένα άτομο υδρογόνου, καταστρέφοντας έτσι τις ελεύθερες ρίζες και εμποδίζοντας τις αλυσιδωτές αντιδράσεις που προκαλούνται από την παραγωγή των ελεύθερων ριζών. Στην κατηγορία αυτή ανήκει η μέθοδος ORAC (Huang et al., 2005).

Η δεύτερη κατηγορία βασίζεται στην ικανότητα των αντιοξειδωτικών να μεταφέρουν ένα ηλεκτρόνιο σε ένα οξειδωτικό αντιδραστήριο με αποτέλεσμα αυτό να ανάγεται. Κατά την αναγωγή του αντιδραστήριου γίνεται αλλαγή του χρώματος του. Ο βαθμός της αλλαγής αυτής εξαρτάται από την συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών τα οποία υπάρχουν στο δείγμα προς μέτρηση, ενώ η αντιοξειδωτική ικανότητα είναι ίση με την αναγωγική ικανότητα. Η εφαρμογή πολλαπλών SET μεθόδων για την μέτρηση της μείωσης της ικανότητας ενός αντιοξειδωτικού οδηγεί συχνά σε εξαιρετική γραμμική συσχέτιση μεταξύ των αποτελεσμάτων τους (Huang et al., 2005). Στην κατηγορία αυτή ανήκουν διάφοροι μέθοδοι όπως είναι η FRAP, η μέθοδος των ολικών φαινολών με την χρήση του αντιδραστήριου Folin-Ciocalteu, η DPPH, η TEAC κα.

Σε κάποιες περιπτώσεις τα αντιοξειδωτικά δρουν μέσω πολλαπλών μηχανισμών ή μέσω ενός μηχανισμού ανάλογα με την αντίδραση του συστήματος. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα καροτενοειδή που ενώ δεν είναι πολύ καλοί αποσβέστες υδροϋπεροξειδίων σε σχέση με τις φαινολικές ενώσεις και άλλα αντιοξειδωτικά, είναι πολύ καλοί αποσβέστες ηλεκτρονίων κάτι στο οποίο τα περισσότερα αντιοξειδωτικά είναι αναποτελεσματικά (Prior et al., 2005).

Για τη μέτρηση χρησιμοποιήθηκαν μέθοδοι οι οποίες περιλαμβάνουν ποτενσιομετρικές τιτλοδοτήσεις, ή αντίσταση στην οξείδωση των λευκών οίνων υπό κανονικές και αναγκαστικές συνθήκες παλαίωσης.

Υπάρχει μεγάλος αριθμός μεθόδων για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας τροφίμων και ποτών με βάση διαφορετικές αρχές:

1. Η σάρωση οργανικής ρίζας (2,2-Azino-bis (3-ethylbenz-thiazoline- 6-σουλφονικό οξύ, ABTS);
2. 2,2-Διφαινυλ-1-πικρυλυδραζυλ, DPPH); (Pérez-Jiménez και Saura-Calixto, 2008).
3. Σάρωση ριζών υπεροξυλίου (ικανότητα ριζικής απορρόφησης οξυγόνου, ORAC).
4. Συνολική αντιοξειδωτική δύναμη παγίδευσης ριζοσπαστικών (TRAP).
5. Η αναγωγική ισχύς των μετάλλων (Ferric Reducing Antioxidant Power, FRAP);

6. Αντιοξειδωτική δύναμη αναγωγής χαλκού (CUPRAC);
7. Η σάρωση ρίζας υδροξυλίου (προσδιορισμός δεοξυριβόζης).

Οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες διαδικασίες για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας είναι οι FRAP, ABTS, TEAC (ισοδύναμη αντιοξειδωτική ικανότητα Trolox), DPPH και ORAC (Pérez-Jiménez et al., 2008).

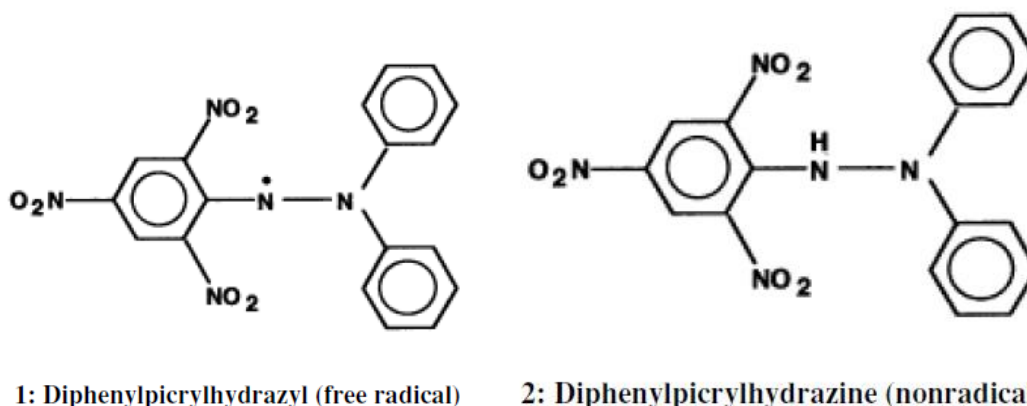
1.5.1 Μέθοδος DPPH

Μία τέτοια μέθοδος που είναι σήμερα δημοφιλής βασίζεται στη χρήση του σταθερού ελεύθερου ριζικού διφαινυλ-πικρυλδραζυλίου (DPPH).

Το μόριο 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλδραζυλίου (α , α -διφαινυλ- β -πικρυλδραζυλίου · DPPH:

- 1) χαρακτηρίζεται ως σταθερή ελεύθερη ρίζα λόγω της μετεγκατάστασης του εφεδρικού ηλεκτρονίου πάνω από το μόριο ως σύνολο, έτσι ώστε τα μόρια να μην διμερίζονται, όπως θα συνέβαινε με τις περισσότερες άλλες ελεύθερες ρίζες. Η μετατόπιση προκαλεί επίσης το βαθύ ιώδες χρώμα, το οποίο χαρακτηρίζεται από ένα φάσμα απορρόφησης σε διάλυμα αιθανόλης που βρίσκεται περίπου στα 520 nm.

Όταν ένα διάλυμα DPPH αναμιγνύεται με αυτό μιας ουσίας που μπορεί να δώσει ένα άτομο υδρογόνου, τότε αυτό δημιουργεί τη μειωμένη μορφή (2) με την απώλεια αυτού του ιώδους χρώματος (αν και θα αναμενόταν να υπάρχει εναπομένον ανοιχτό κίτρινο χρώμα από την ομάδα πικριλίου που εξακολουθεί να υπάρχει). Αντιπροσωπεύοντας τη ρίζα DPPH από το $Z \cdot$ και το μόριο του δότη έως το AH, η κύρια αντίδραση είναι $Z \cdot + AH = ZH + A \cdot$ [1], όπου το ZH είναι η μειωμένη μορφή και το $A \cdot$ είναι η ελεύθερη ρίζα που παράγεται σε αυτό το πρώτο βήμα. Αυτή η τελευταία ρίζα στη συνέχεια θα υποβληθεί σε περαιτέρω αντιδράσεις που ελέγχουν τη συνολική στοιχειομετρία, δηλαδή, ο αριθμός των μορίων του DPPH μειώθηκε (αποχρωματισμένο) από ένα μόριο του αναγωγικού (εικόνα 1.16).



Εικόνα 1.16 χημικός τύπος DPPH

Η αντίδραση [1] έχει ως εκ τούτου, σκοπό να παρέχει τη σύνδεση με τις αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα σε ένα οξειδωτικό σύστημα, όπως η αυτοοξειδωση ενός λιπιδίου ή άλλης ακόρεστης ουσίας. Συνεπώς το μόριο DPPH Z, αντιπροσωπεύει τις ελεύθερες ρίζες που σχηματίζονται στο σύστημα του οποίου η δραστηριότητα πρέπει να κατασταλεί από την ουσία AH.

Η μέθοδος DPPH είναι γρήγορη, απλή, ακριβής και φθηνή ανάλυση για τη μέτρηση της ικανότητας διαφορετικών ενώσεων να δρουν ως ελεύθερες ρίζες ή δότες υδρογόνου και για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης τροφών και ποτών (Prakesh, 2001).

Η μέθοδος DPPH περιγράφεται ως μια απλή, γρήγορη και βολική μέθοδος - ανεξάρτητη από την πολικότητα του δείγματος - για την διαλογή πολλών δειγμάτων για δραστικές δραστηριότητες σάρωσης ριζών (Marxen et al., 2007).

Η μέθοδος DPPH χρησιμοποιείται ευρέως για τη μέτρηση της ικανότητας σάρωσης των αντιοξειδωτικών ελεύθερων ριζών (Perez-Jimenez και Saura-Calixto, 2008; Perez-Jimenez et al., 2008). Για τον προσδιορισμό της ριζικής δραστηριότητας σάρωσης διαφορετικών τροφών, ποτών και υποστρωμάτων υποβλήθηκαν σε επεξεργασία μια μεγάλη ποικιλία μεθόδων με χρήση DPPH (1,1-Διφαινυλ-2-πικρυλυδραζυλ). Βασίζεται στις αρχικές μεθόδους των Blois (1958) και Brand-Williams et al. (1995).

Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα ονόματα της μεθόδου DPPH είναι η δραστηριότητα σάρωσης ελεύθερων ριζών και η αντιοξειδωτική δράση. Το πιο σωστό όνομα, το οποίο περιέγραψε τον μηχανισμό της αντίδρασης, είναι το πρώτο.

Οι αντιδράσεις του DPPH είναι εξαιρετικά ευαίσθητες στις συνθήκες του συστήματος όπου λαμβάνει χώρα η αντίδραση, δηλαδή στην ύπαρξη νερού και διαλύτη, στο pH, στο οξυγόνο και στην έκθεση στο φως. Η ύπαρξη και των δύο μηχανισμών αντιδράσεων (SET και HAT) είναι ιδιαίτερα εμφανής στην μεταβλητότητα των αντιδράσεων που παρουσιάζει το DPPH με διαλύτη (Schaich et al., 2015)

- Υλικά και αντιδραστήρια για την μέθοδο DPPH

Διάλυμα Trolox 0,2mM

Διάλυμα DPPH 60μM

Μεθανόλη

Δείγματα κρασιών

Καφεϊκό οξύ

- Όργανα μεθόδου DPPH

Φασματοφωτόμετρο UV-Vis

Αυτόματες πιπέτες 10-100μL και 100-1000 μL

Πλαστικές κυψελίδες (b=1,00cm)

Αναλυτικός ζυγός

Γυάλινη ράβδος

Ποτήρια ζέσεως

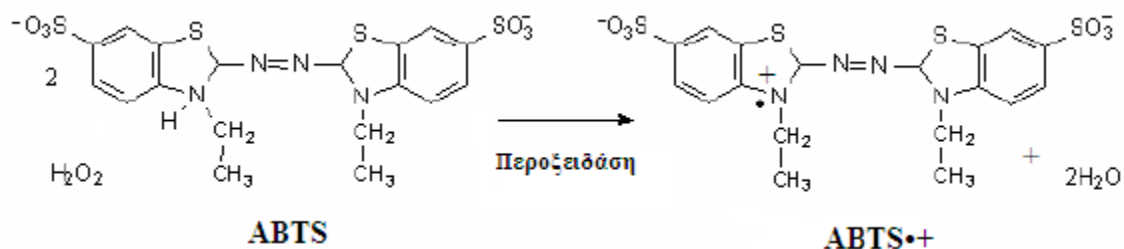
Ογκομετρικές φιάλες 25ml, 100ml, 250ml

1.5.2 Μέθοδος ABTS

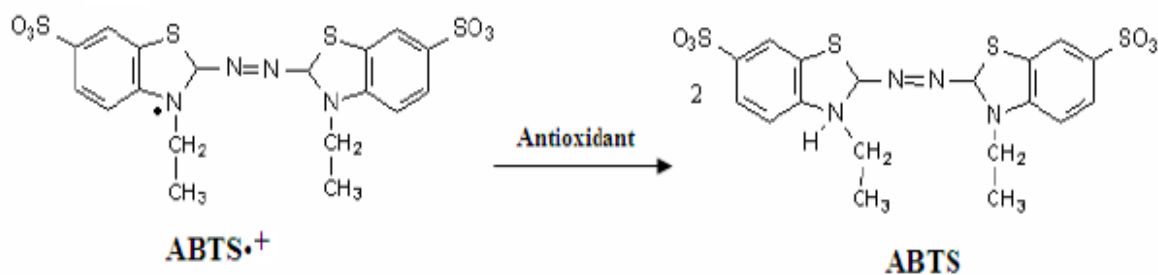
ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η μέθοδος εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εν δυνάμει αντιοξειδωτικών μορίων, αναπτύχθηκε από τους Miller και Rice-Evans, (Rice-Evans et al., 1993) και βασίζεται σε μία αντίδραση αποχρωματισμού. Χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, βασιζόμενη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης αντιοξειδωτικών μορίων με τη σταθερή ρίζα ABTS•+. Το ABTS [2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid)] παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) και μέσω της δράσης του ενζύμου περοξειδάση (HRP), οξειδώνεται και δημιουργείται η δραστική ρίζα ABTS•+ (κατιόν) (Εικόνα 1.17). Η συγκεκριμένη ρίζα έχει κυανοπράσινο χρώμα και απορροφά στα 730 nm. Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μιας ουσίας πρέπει αρχικά να προηγηθεί ο σχηματισμός της ρίζας και στη συνέχεια να ακολουθήσει η προσθήκη της εξεταζόμενης ουσίας ώστε να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των αντιοξειδωτικών παραγόντων με τους οξειδωτικούς παράγοντες που χρησιμοποιούνται για την οξείδωση του ABTS.

Όταν στο διάλυμα προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα ABTS•+, ανάγεται είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου (single electron transfer, SET) είτε μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (hydrogen atom transfer, HAT), με αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό του διαλύματος σε βαθμό ανάλογο της συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού και έχει σαν συνέπεια τη μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 730 nm (Εικόνα 1.18) (Prior et al., 2005; Miller et al, 1993; Re et al, 1999).



Εικόνα 1.17 Η οξείδωση του ABTS σε δραστική ρίζα ABTS•+



Εικόνα 1.18 : Η αλληλεπίδραση του αντιοξειδωτικού με τη ρίζα ABTS

Η ανάλυση ABTS θεωρείται μία από τις πιο ευαίσθητες τεχνικές για τον εντοπισμό της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας, επειδή η απόκριση των αντιοξειδωτικών περιλαμβάνει ταχύτερη κινητική αντίδρασης (Chanput et al., 2016).

Η ανάλυση είναι τεχνικά απλή και έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για διαλογή και προσδιορισμούς ρουτίνας.

Μεταξύ των πλεονεκτημάτων αυτής της μεθόδου είναι επίσης ,το γεγονός ότι οι τιμές αντιοξειδωτικής ικανότητας των ισοδύναμων trolox αναφέρονται σε ένα ευρύ φάσμα τροφίμων που επιτρέπει τη διεξαγωγή των συγκρίσεων. Επιπλέον, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ένα ευρύ φάσμα pH και ιοντικών δυνάμεων, επιπλέον του γεγονότος ότι το ABTS•+ είναι διαλυτό τόσο σε νερό όσο και σε οργανικούς διαλύτες, γεγονός που επιτρέπει τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας τόσο των υδρόφιλων όσο και των λιπόφιλων ενώσεων ακόμα και σε ενώσεις υψηλής χρωστικής με την ίδια βασική μεθοδολογία.

Μεταξύ των μειονεκτημάτων αυτής της τεχνικής είναι το αρχικό μόριο του ABTS, το οποίο πρέπει προηγουμένως να έχει δημιουργηθεί από χημική αντίδραση ή ηλεκτροχημική αντίδραση και ότι η κινητική της αντίδρασης με ορισμένα αντιοξειδωτικά μπορεί να είναι αργή και, ως εκ τούτου, μπορεί να οδηγήσει σε σφάλματα στον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας (Magalhaes et al., 2013; Londoño 2012; Kuskoski et al., 2005).

Επιπλέον, το ABTS δεν βρίσκεται στην φύση, επομένως υπάρχει πιθανή κριτική ότι η ανάλυση δεν σχετίζεται άμεσα με καμία βιολογική λειτουργία. Επιπλέον, θερμοδυναμικά οποιαδήποτε ένωση με δυναμικό οξειδοαναγωγής χαμηλότερο από αυτό του ABTS•+ μπορεί να αντιδράσει με τη ρίζα (Scott et al., 1993).

- Αντιδραστήρια
Πυκνό διάλυμα ABTS
K₂S₂O₈
H₂O
Δείγματα ερυθρών οίνων.

- Όργανα
Φασματοφωτόμετρο
Αυτόματες πιπέτες.
Κυψελίδες
Πλαστικά κωνικά φιαλίδια.
Ποτήρι ζέσεως

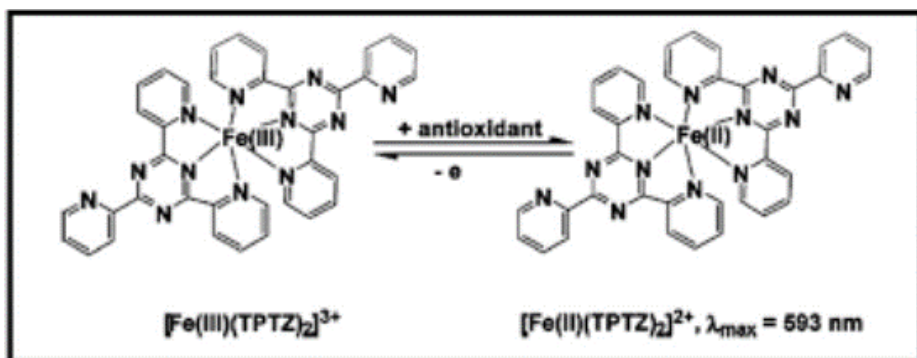
1.5.3 Μέθοδος FRAP

Η μέθοδος FRAP (Ferric iron reducing antioxidant power) είναι μία μέθοδος απλή, φθηνή, γρήγορη και δεν απαιτεί ειδικό εξοπλισμό. Πρόκειται για μια φωτομετρική μέθοδο προσδιορισμού της συνολικής αντιοξειδωτικής ισχύος ενός οίνου.

Αρχικά αναπτύχθηκε από τους Benzie και Strain για την μέτρηση της αναγωγικής ισχύος στο πλάσμα και έπειτα προσαρμόστηκε κατάλληλα για την χρήση της σε δείγματα βοτανικής προελεύσεως (Prior et al., 2005).

Η αντίδραση μετρά την αναγωγή του συμπλόκου τριχλωριούχου σιδήρου – TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) σε ένα έγχρωμο προϊόν (σε όξινο pH, ώστε να διατηρηθεί η διαλυτότητα του σιδήρου). Με την μέθοδο FRAP δεν μπορούμε να ανιχνεύσουμε ενώσεις που δρουν ως αποσβέστες ελεύθερων ριζών (μεταφορά υδρογόνου), ιδιαίτερα θειόλες και πρωτεΐνες.

Τα αποτελέσματα της FRAP μπορεί να διαφέρουν παρά πολύ, ανάλογα με την χρονική διάρκεια της ανάλυσης. Οι φαινόλες που δεσμεύουν το σίδηρο ή έχουν την ικανότητα να διασπώνται σε ενώσεις με χαμηλή ή διαφορετική δραστηριότητα, αναλύονται καλύτερα σε σύντομα χρονικά διάστημα όπως είναι τα 4 min, ενώ ενώσεις όπως είναι οι πολυφαινόλες αντιδρούν πιο αργά και χρειάζονται μεγαλύτερο χρόνο ανάλυσης για να ανιχνευθούν (Huang et al., 2005).



Εικόνα 1.19: Αναγωγή του συμπλόκου Fe Cl3-TPTZ σε έγχρωμο προϊόν

Η σειρά της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών μπορεί να διαφέρει και να αλλάξει ανάλογα με το χρόνο αντίδρασης. Με την δοκιμασία αυτή δεν μπορούμε να μετρήσουμε αντιοξειδωτικά που περιέχουν στο μόριο τουςθειόλες όπως είναι η γλουταθειόνη, μετράει μόνο την αναγωγική ικανότητα με βάση το ιόν τρισθενούς σιδήρου (Prior et al., 2005).

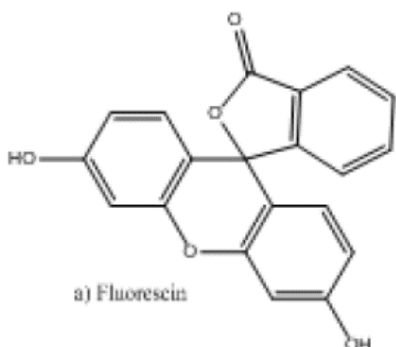
1.5.4 Μέθοδος ORAC

Η μέθοδος ORAC είναι μια φθορισμομετρική τεχνική. Αρχικά στην διαδικασία γίνονταν χρήση της β-φυκοερυθρίνης (β-PE, φθορίζουσα πρωτεΐνη που απομονώνεται από το *Porphyridium cruentum*) ως ανιχνευτής της αντίδρασης. Η μείωση του φθορισμού της β-PE παρείχε μια ένδειξη της καταστροφής που δημιουργείται από την αντίδραση της με τις ρίζες υδροϋπεροξειδίων. Αργότερα, βρέθηκε ότι β-PE είχε πολλά μειονεκτήματα όπως την μεγάλη μεταβλητότητα της από παρτίδα σε παρτίδα, τον αποχρωματισμό της από την έκθεση στο φως, την αλληλεπίδραση της με μερικές πολυφαινόλες και την μείωση του φθορισμού της ακόμη και χωρίς την προσθήκη ελεύθερων ριζών (Prior, 2015).

Για την επίλυση αυτών των προβλημάτων η β-PE αντικαταστάθηκε από την φλουορεσκεΐνη. Πρόκειται για μια συνθετική μη πρωτεϊνική ουσία που δρα ως ανιχνευτής και δεν έχει τους περιορισμούς της β-PE.

Η μέθοδος ανήκει στην κατηγορία του μηχανισμού δράσης μεταφοράς οξυγόνου και αποτελεί ένα άμεσο μέτρο καταμέτρησης την αντιοξειδωτικής ικανότητας των λιπόφιλων και υδρόφιλων συστατικών ενάντια των ελεύθερων ριζών. Η μέθοδος είναι σχετική με τις *in vivo* συνθήκες, αφού χρησιμοποιεί υδροϋπεροξειδία που είναι από τις πιο διαδεδομένες ελεύθερες ρίζες που υπάρχουν στον ανθρώπινο οργανισμό. Από τα πιο βασικά πλεονεκτήματα της μεθόδου αυτής είναι ότι έχει αυτοματοποιηθεί και προσαρμόζεται ανάλογα με την προέλευση του δείγματος (πλάσμα, ιστός, τρόφιμα) (Prior, 2015).

Η μέθοδος μετράει την απώλεια φθορισμού της φλουορεσκεΐνης (στην εικόνα 1.12 φαίνεται η δομή της φλουορεσκεΐνης) με την πάροδο του χρόνου λόγω του σχηματισμού υπεροξυλικής ρίζας από τη διάσπαση ενός εκκινητή δις αζιδίου, AAPH (2, 2'-azobis – 2 – μεθυλοπροπανιμιδαμίδιο, διυδροχλωρίδιο) στους 37 °C. Η μείωση του φθορισμού παρακολουθείται οπτικά, και η αντιοξειδωτική ικανότητα καθορίζεται από την επιβράδυνση της απώλειας φθορισμού παρουσία του αντιοξειδωτικού.



Εικόνα 1.20 Η χημική δομή της φλουορεσκεΐνης

Το Trolox [6-Υδροξυ-2,5,7,8-τετραμεθυλοχρωμαν-2-καρβοξυλικό οξύ], ένα υδατοδιαλυτό ανάλογο της βιταμίνης E, χρησιμεύει ως θετικός μάρτυρας που αναστέλλει τη διάσπαση της φλουορεσκεΐνης με δοσοεξαρτώμενο τρόπο.

Στην μέθοδο ORAC η θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιείται η αντίδραση είναι μέγιστης σημασίας και απαιτείται προσεκτικός και συστηματικός έλεγχός της. Ο βαθμός της θερμοκρασίας εξαρτάται από τη ένωση χρησιμοποιείται για την παραγωγή ελεύθερων ριζών (για το AAPH η θερμοκρασία είναι 37 °C). Η διατήρηση της θερμοκρασίας στα επιθυμητά επίπεδα εξασφαλίζει την έγκαιρη και πλήρη αποσύνθεση του οξειδωτικού μέσου. Σε περίπτωση που οι θερμοκρασίες δεν επιτευχθούν η αντίδραση που πραγματοποιείται είναι αργή και ανεπαρκής που ως αποτέλεσμα οδηγεί στην μη επαναληψιμότητα των πειραμάτων. Επιπρόσθετα η αργή και προβληματική αυτή αντίδραση, μπορεί να παρερμηνευτεί ως αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα της ουσίας που μελετάται και να οδηγήσει στην υπερεκτίμηση της (Schaich et al., 2015).

Τυπικά η διαδικασία που εφαρμόζεται στην ORAC είναι η ανάμιξη του δείγματος (ή του control ή των πρότυπων) με διάλυμα φλουορεσκεΐνης και η επώαση σε θερμοκρασία 37°C πριν προστεθεί διάλυμα AAPH (δημιουργεί ελεύθερες ρίζες) για να ξεκινήσει η αντίδραση. Η ένταση του φθορισμού μετράται στα 485 nm (ex)/525 nm (em), για 35 λεπτά με σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας και pH (37°C και pH 7.4) καθ' όλη την διαδικασία. Όσο προχωράει η αντίδραση η φλουορεσκεΐνη καταναλώνεται και η ένταση του φθορισμού της μειώνεται. Η παρουσία ενός αντιοξειδωτικού αναστέλλει αυτήν την διεργασία (Huang et al., 2005).

Είναι η μόνη μέθοδος που παρακολουθείται η δράση των ελεύθερων ριζών μέχρι τέλους και χρησιμοποιεί την περιοχή κάτω από την καμπύλη (στο διάγραμμα του αποτελέσματος) για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων συνδυάζοντας έτσι τόσο το ποσοστό της αναστολής και το μήκος του χρόνου αναστολής των ελεύθερων ριζών σε μια μονάδα (Krishnaiah et al., 2011).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 – ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.1 Προετοιμασία δειγμάτων

Για να παρασκευαστούν τα δείγματά μας και να μετρηθεί με διάφορες μεθόδους η αντιοξειδωτική ικανότητα έγινε η εξής διαδικασία.

Αρχικά για τα λευκά δείγματα οίνου, ζυγίστηκαν 0,005 γρ. καφεϊκού οξέος –ως την κύρια αντιοξειδωτική ουσία – η οποία περιέχεται στους οίνους, και προστέθηκε σε 100 ml λευκού οίνου (Ροδίτης, Μοσχάτο Αλεξανδρίας –Πειραματική οινοποίηση 2019- λευκός ξηρός) και ομοίως 0,01 γρ. καφεϊκού σε 100 ml οίνου.

Ενώ για τα ερυθρά δείγματά μας, ζυγίστηκαν 0,005 γρ. καφεϊκού οξέος και προστέθηκε σε 100 ml ερυθρού οίνου (ερυθρός ξηρός- Αγιωργήτικο –οινοποιείο Σελλάς -Ονείρου οδός 2018) και ομοίως 0,01 γρ. καφεϊκού σε 100 ml οίνου.

Επιπλέον, παρασκευάστηκαν τρία πρότυπα καφεϊκού οξέος. Για του λόγου το αληθές ζυγίστηκαν 0,02 γρ. καφεϊκού και τα διαλύθηκαν σε 50 ml απιονισμένου ύδατος (40 mg/100 ml). Από εκεί λάβαμε 10 ml, 15 και 20 ml και τα πληρώθηκαν σε 50 ml νερού. Συνεπώς, παρασκευαστήκανε διαλύματα καφεϊκού οξέος με συγκεντρώσεις (8, 10 και 12 mg/100ml).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.2 Πείραμα με την μέθοδο Folin Ciocalteu

- Πειραματική διαδικασία της μεθόδου Folin-Ciocalteu

Κατασκευή προτύπου καμπύλης

Αρχικά παρασκευάστηκε, πρότυπο διάλυμα γαλλικού οξέος 50 mgr/100ml σε ογκομετρική φιάλη των 250 ml. Για τον σκοπό αυτό σε αναλυτικό ζυγό, μέσα σε ποτήρι ζέσεως ζυγίστηκαν 0,125gr γαλλικού οξέος, διαλύθηκαν με νερό και μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 250 ml και έγινε αραιώση 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, 25, 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

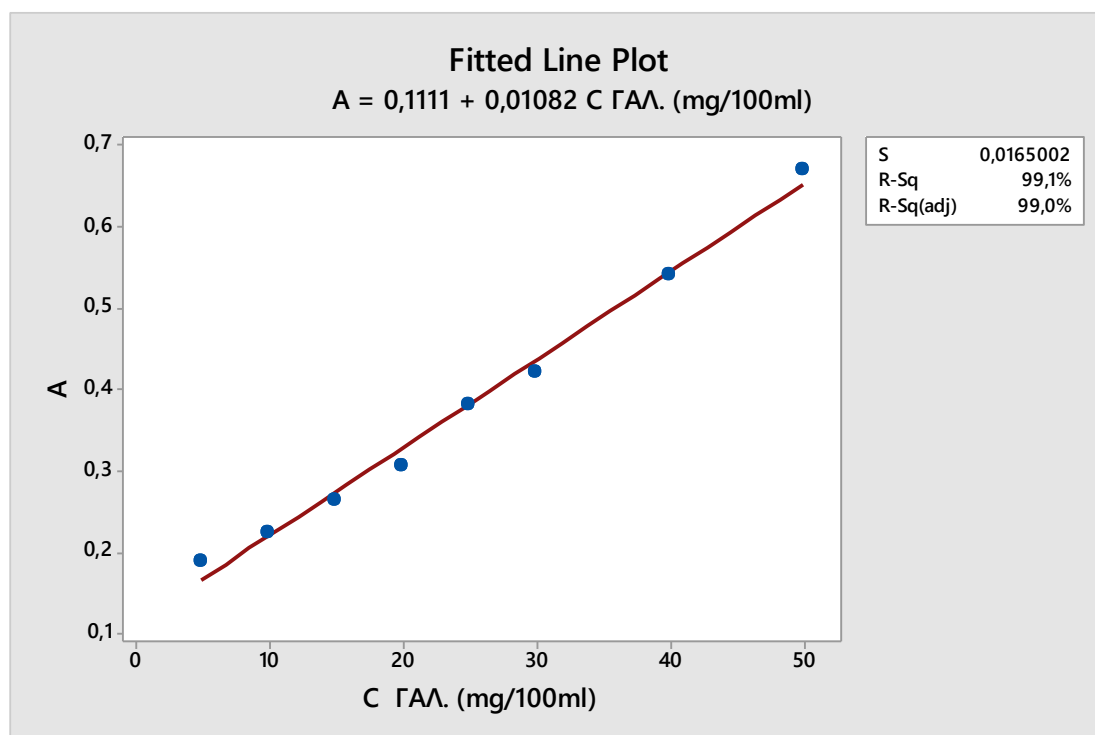
5 ml διαλύματος Na₂CO₃ 20% W/V

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 δείγμα 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 Πίνακας 2.1 . Παράλληλα η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τον μάρτυρα.

Πίνακας 2.1 Μετρήσεις γαλλικού οξέος

ΠΡΟΤΥΠΑ ΓΑΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ	A μέση τιμή
5	0,189
10	0,224
15	0,263
20	0,307
25	0,382
30	0,422
40	0,541
50	0,670



Εικόνα 2.1 Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος

Στη συνέχεια ετοιμάστηκαν τα δείγματα και μετρήθηκαν οι απορροφήσεις τους. Συγκεκριμένα σε ογκομετρική φιάλη των 25 ml μεταφέρθηκαν με την ακόλουθη σειρά τα εξής:
 0,250 ml οίνου (λευκού και ερυθρού με καφεϊκό οξύ)
 12,5 ml απεσταγμένου ύδατος
 1,25 ml αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu,
 και μετά από 3 min

5 ml διαλύματος Na₂CO₃ 20% W/V.

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 gallice/L.

Εξίσωση καμπύλης αναφοράς: $A = 0,1111 + 0,01082 C$ ΓΑΛ. (mg/100ml)

Άρα $x = A - 0,1111 / 0,01082$

δηλ. από την μετρούμενη απορρόφηση υπολογίζουμε τις πολυφαινόλες του αραιωμένου δείγματος εκφρασμένες σε mg γαλλικού οξέος / 100 ml. Για να βρούμε την ποσότητα των πολυφαινολών στα ερυθρά δείγματα, που αντιστοιχούν στα δείγματα πριν την αραιώση, πολλαπλασιάζουμε με τον συντελεστή 10. Τέλος υπολογίζουμε τις πολυφαινόλες του δείγματος εκφρασμένες σε mg γαλλικού /L.

Πίνακας 2.2 Μετρήσεις λευκού οίνου folin Ciocalteu

mg καφεικού οξέος /100 ml ΛΕΥΚΟΥ ΟΙΝΟΥ	A1	A2	A3	A±S	C1 (mg γαλ./100 ml)	C1 (mg gal./lt)
0 mg	0,468	0,466	0,469	0,467±0,00153	32,89	328,9
5 mg	0,613	0,614	0,612	0,613±0,00100	46,38	463,8
10 mg	0,714	0,713	0,715	0,714±0,00100	55,72	557,2

Πίνακας 2.3 Μετρήσεις ερυθρού οίνου folin Ciocalteu

mg καφεικού οξέος /100 ml ΕΡΥΘΡΟΥ ΟΙΝΟΥ	A1	A2	A3	A±S	C2 (mg γαλ./100 ml)	C2 (mg gal./lt)
0 mg	0,618	0,619	0,617	0,618±0,00100	468,4	4684
5 mg	0,721	0,722	0,720	0,721±0,00100	563,6	5636
10 mg	0,818	0,820	0,817	0,819±0,00153	654,2	6542

Επίσης, οι μετρήσεις από τα πρότυπα του καφεικού που παρασκευάσαμε, με σκοπό να δούμε την αναλογία του καφεικού με βάσει τις απορροφήσεις μας, είναι η εξής :

Πίνακας 2.4 Μετρήσεις προτύπων διαλυμάτων καφεϊκού οξέος

C (40 mg/100 ml)	A1	A2	A3	A±S	C(mg γαλ./100 ml)	C (mg gal./lt)
8 mg/100 ml	0,173	0,172	0,174	0,173±0,00100	3,45	34,5
10 mg/100 ml	0,213	0,214	0,215	0,214±0,00100	5,70	57
12 mg/100 ml	0,278	0,277	0,276	0,278±0,00100	9,11	91,1

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.3 Πείραμα με την μέθοδο DPPH

Κατασκευή προτύπου καμπύλης

Αρχικά κατασκευάστηκε πρότυπο διαλύματος DPPH/ CH₃OH 0,06M. Σε αναλυτικό ζυγό σε ποτήρι ζέσεως ζυγίστηκαν 15mg DPPH, 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.

Στην συνέχεια παρασκευάστηκε πρότυπου διάλυμα Trolox συγκέντρωσης 0,5 M. Σε αναλυτικό ζυγό σε ποτήρι ζέσεως ζυγίστηκαν 12,5 mg Trolox, διαλύθηκαν σε μεθανόλη και ακολούθως το περιεχόμενο του ποτηριού μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 25 ml και πραγματοποιήθηκε αραιώση μέχρι την χαραγή (0,5 M). Κατόπιν σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml μεταφέρθηκαν 10 ml από το παραπάνω διάλυμα Trolox και αραιώθηκαν μέχρι την χαραγή με διαλύτη μεθανόλη (0,05 M). Οι όγκοι επιλέχθηκαν έτσι ώστε το χρώμα του διαλύματος DPPH/CH₃OH να παραμένει μωβ, σαφώς πιο εξασθενημένο του αρχικού, αλλά να μην μετατρέπεται σε κίτρινο καθώς δεν καταναλίσκεται πλήρως το DPPH.

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

Σε πλαστικές κυψελίδες προστέθηκαν με την εξής σειρά τα παρακάτω διαλύματα: 3 mL του διαλύματος 0,06M DPPH/CH₃OH και στην συνέχεια οι όγκοι μεθανόλης και Trolox ανά 2 min, όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.2. Ακολούθησε ανάδευση και τα περιεχόμενα των φιαλιδίων παρέμειναν στο σκοτάδι για 30 min ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίδραση. Κατόπιν το περιεχόμενο κάθε κυψελίδας φωτομετρήθηκε στα 515 nm.

Για τα δείγματα των οίνων προστέθηκαν 3 mL του διαλύματος 0,06M DPPH/CH₃OH, 80 μL CH₃OH και τέλος 20 μL οίνου ανά 2 min και ακολούθησε φωτομέτρηση στα 515 nm.

Το control περιέχει 3 mL διαλύματος 0,06 M DPPH/CH₃OH και 0,1 mL CH₃OH.

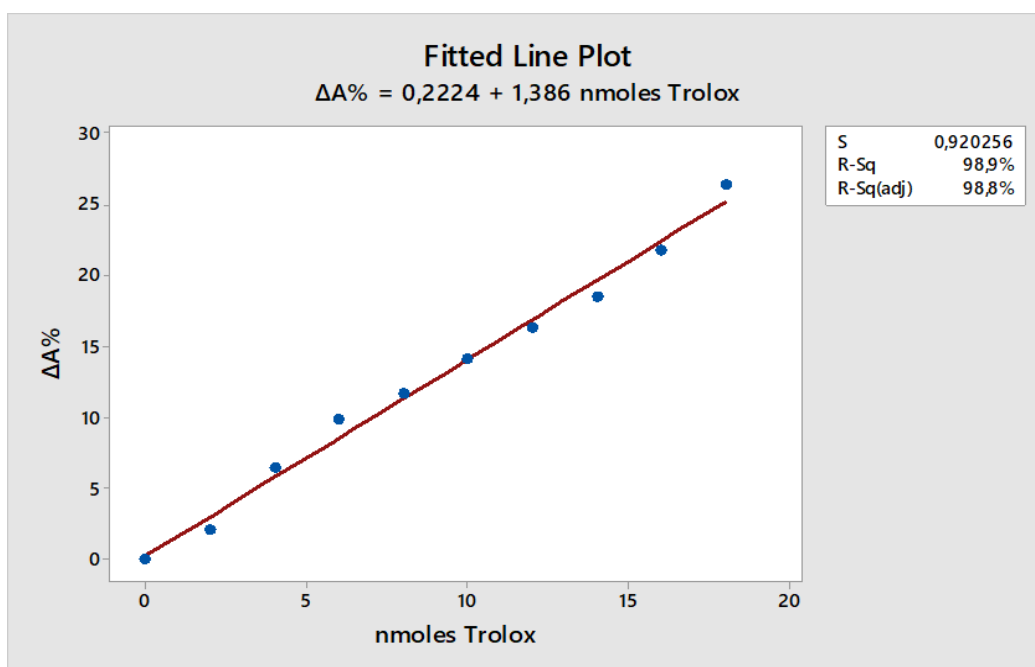
Ο μηδενισμός του οργάνου πραγματοποιήθηκε με μεθανόλη. Για κάθε ποσότητα nmol Trolox που προστέθηκαν, έγινε επανάληψη του πειράματος 3 φορές και ως τιμή της απορρόφησης λάβαμε τον μέσο όρο των τριών μετρήσεων.

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 2.5 Μετρήσεις προτύπων διαλυμάτων trolox

	Όγκος DPPH/CH ₃ OH 0,06 M	Όγκος CH ₃ OH	Όγκος διαλύματος Trolox	nmole Trolox	Απορρόφηση λ=515 t=30min	ΔΑ%
1	3 mL	100 μL	0 μL	0 nmol	0,497	
2	3 mL	90 μL	10 μL	2 nmol	0,487	2,01
3	3 mL	80 μL	20 μL	4 nmol	0,465	6,44
4	3 mL	70 μL	30 μL	6 nmol	0,448	9,86
5	3 mL	60 μL	40 μL	8 nmol	0,439	11,67
6	3 mL	50 μL	50 μL	10 nmol	0,427	14,08
7	3 mL	40 μL	60 μL	12 nmol	0,416	16,29
8	3 mL	30 μL	70 μL	14 nmol	0,405	18,51
9	3 mL	20 μL	80 μL	16 nmol	0,389	21,73
10	3 mL	10 μL	90 μL	18 nmol	0,366	26,36



Εικόνα 2.2 Πρότυπη καμπύλη trolox

Μετρήθηκε και η απορρόφηση των μαρτύρων:

Τα nmoles Trolox που αντιστοιχούσαν στον μάρτυρα, υπολογίστηκαν από την εξίσωση ευθείας $\Delta A\% = 0,2224 + 1,386 \text{ nmoles Trolox}$

Στη συνέχεια σε πλαστικές κυψελίδες προστέθηκαν κατά σειρά: 3 mL του διαλύματος 0,06 M DPPH/CH₃OH, κατόπιν 80 μL CH₃OH και τέλος 20 μL κατάλληλα αραιωμένου δείγματος οίνου ερυθρού και λευκού, ανά 2 min. Ακολούθησε ανάδευση και παραμονή στο σκοτάδι για μισή ώρα, ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίδραση. Κατόπιν τα δείγματα φωτομετρήθηκαν στα 515 nm. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε 3 φορές για κάθε δείγμα και ως απορρόφηση πήραμε τον μέσο όρο των τιμών των απορροφήσεων.

Πίνακας 2.6 Μετρήσεις λευκού οίνου με την μέθοδο DPPH

mg καφ./100 mL ΛΕΥΚΟ Υ ΟΙΝΟΥ	A1	A2	A3	A ±S	ΔA%	nmoles trolox/2 0 μl	nmoles/l	mM
0 mg	0,452	0,453	0,454	0,453± 0,001	8,85	6,16	308 ×10 ³	308 ×10 ⁻³
5 mg	0,405	0,404	0,406	0,405± 0,001	18,51	13,19	659,5×10 ³	659,5×10 ⁻³
10 mg	0,372	0,370	0,371	0,371± 0,001	25,3	18,10	905 ×10 ³	905×10 ⁻³

Πίνακας 2.7 Μετρήσεις ερυθρού οίνου με την μέθοδο DPPH

mg καφ/100 ml ΕΡΥΘΡ ΟΥ ΟΙΝΟΥ	A1	A2	A3	A ±S	ΔA %	nmoles trolox/2 0 μl	nmoles/l	mM
0 mg	0,481	0,480	0,482	0,481±0.0 01	3,42	22,15	1.107,5×1 0 ³	1.107,5×1 0 ⁻³
5 mg	0,468	0,470	0,469	0,469±0.0 01	5,83	39,69	1.984,5×1 0 ³	1.984,5×1 0 ⁻³
10 mg	0,457	0,459	0,458	0,458±0.0 01	8,24	57,23	2.861,5×1 0 ³	2.861,5×1 0 ⁻³

Πίνακας 2.8 Μετρήσεις προτύπων διαλυμάτων με την μέθοδο DPPH

ΔΙΑΛΥΜΑ ΤΑ ΚΑΦΕΙΚΟ Υ (40 mg/100 mL)	A1	A2	A3	A±S	ΔA%	nmoles trolox/ 20 μl	nmoles/l	mM
8 mg/100mL	0,395	0,396	0,394	0,395± 0,001	20,52	14,6	730×10 ³	730×10 ⁻³
10 mg/100mL	0,385	0,384	0,386	0,385± 0,001	22,50	16,1	805×10 ³	805×10 ⁻³
12 mg/100mL	0,370	0,371	0,369	0,370± 0,001	25,50	18,2	910×10 ³	910×10 ⁻³

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των δειγμάτων εκφρασμένη σε ισοδύναμα Trolox (mM), προκύπτει από τη σχέση: $C = 500 \cdot X / (20 \cdot 25)$, όπου X είναι η τιμή των nMole Trolox, που προκύπτει από την εξίσωση της καμπύλης αναφοράς.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.4 Πείραμα με την μέθοδο ABTS

Παρασκευή διαλύματος ριζικού κατιόντος ABTS.+

Σε ποτήρι ζέσεως των 100 mL τοποθετούνται 20 mL H₂O και προστίθενται 0,1801 g ABTS και 0,0331 g K₂S₂O₈. Ακολουθεί ανάδευση μέχρι πλήρους διαλυτοποίησης και εν συνεχεία το περιεχόμενο του ποτηριού μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 50,0 mL, όπου και συμπληρώνεται ο όγκος ως τη χαραγή με νερό, δίδοντας έτσι συγκέντρωση 7 mM σε ABTS και 2,45 mM σε K₂S₂O₈. Το διάλυμα διατηρείται στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία δωματίου για 16h, ώστε να προκύψει βαθύ κυανό διάλυμα. Τέλος ακολουθεί κατάλληλη αραιώση σε αυτό το διάλυμα, ώστε να προκύψει διάλυμα του ριζικού κατιόντος ABTS.+ με τιμή απορρόφησης στα 734 nm περί το 0,700.

- Πειραματική Πορεία

Σε πλαστικά κωνικά φιαλίδια τοποθετούνται 100 μL (10 μL οίνου +90 μL H₂O) κάθε αραιωμένου δείγματος οίνου (αραιώση 1/10 με νερό) και ανά 30 sec προστίθενται 2,4 ml του αραιωμένου διαλύματος του ριζικού κατιόντος του ABTS (ABTS+•) και ακολουθεί ανάδευση με vortex. Στη συνέχεια τα δείγματα επωάζονται σε σκοτεινό μέρος για 6 min και ακολουθεί καταγραφή της απορρόφησης των δειγμάτων στα 734nm. Η αυτή διαδικασία πραγματοποιείται 3 φορές (για κάθε δείγμα). Το control περιέχει 2,4 ml του αραιωμένου διαλύματος του ριζικού κατιόντος του ABTS, ενώ το δείγμα αντικαθίσταται από ίσο όγκο νερού (100 μL). Παράλληλα κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς trolox και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ισοδύναμα trolox.

- Δημιουργία καμπύλης αναφοράς.

Για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς trolox, παρασκευάζονται με διαδοχικές αραιώσεις από διάλυμα του trolox συγκέντρωσης 3,0 mM διαλύματα με συγκεντρώσεις 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 και 2,5 mM.

Συγκεκριμένα σε αναλυτικό ζυγό ζυγίστηκαν 0,0188 g trolox και κατόπιν μετεφέρθησαν σε ποτήρι ζέσεως, όπου και διαλύθηκαν σε μεθανόλη.

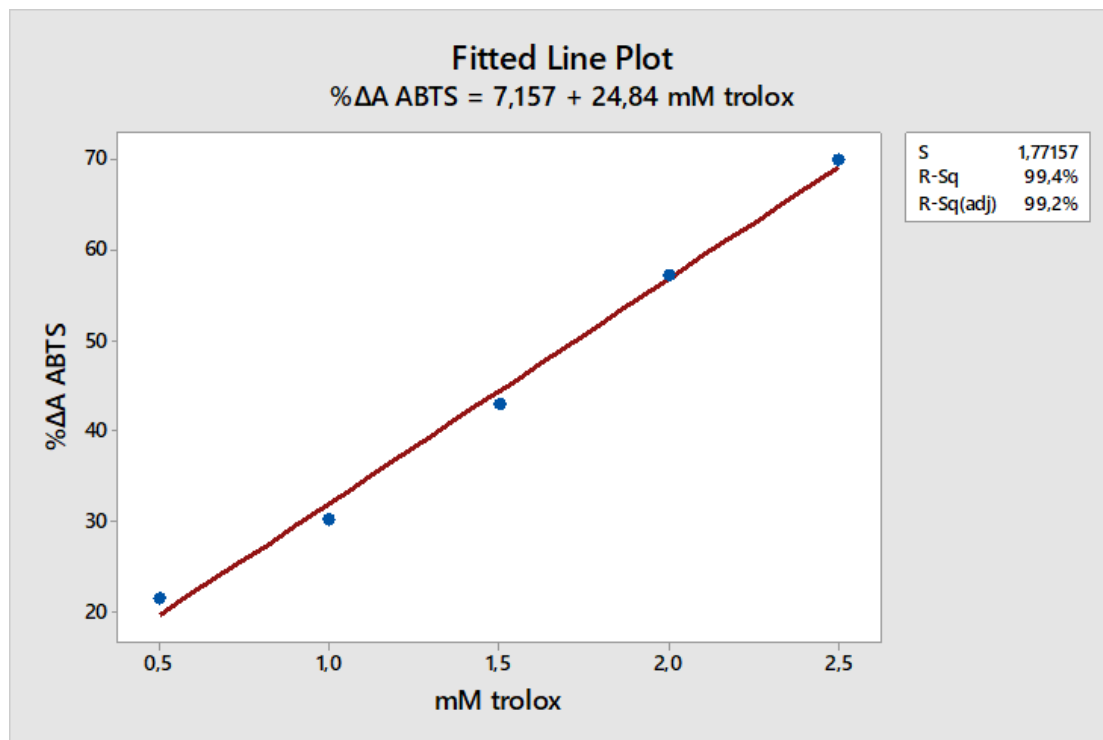
Ακολούθως το περιεχόμενο του ποτηριού ζέσεως, εισήχθη σε ογκομετρική φιάλη των 25,00 mL και πραγματοποιήθηκε αραιώση ως τη χαραγή με διαλύτη μεθανόλη, οπότε και παραλαμβάνεται διάλυμα trolox/ CH₃OH συγκέντρωσης 3,0 mM. Από αυτό λοιπόν, με κατάλληλες αραιώσεις παραλαμβάνονται τα πρότυπα διαλύματα των συγκεντρώσεων που προανφέρθησαν. Οι όγκοι του διαλύματος trolox επιλέχθησαν έτσι, ώστε να ισχύει η γραμμικότητα του νόμου Beer (Γραμμικό τμήμα καμπύλης βαθμονόμησης).

Έπειτα σε πλαστικά κωνικά φιαλίδια τοποθετούνται 100 μL κάθε πρότυπου διαλύματος Trolox και ανά 30 sec προστίθενται 2,4 ml του αραιωμένου διαλύματος του ριζικού κατιόντος του ABTS (ABTS+•) και ακολουθεί ανάδευση με vortex. Στη συνέχεια ακολουθεί επώαση σε σκότος για 6 min και αφού το περιεχόμενο των φιαλιδίων προστεθεί σε κυψελίδες, καταγράφεται με φασματοφωτόμετρο η τιμή της απορρόφησης στα 734nm. Το control περιέχει 2,4 ml του αραιωμένου διαλύματος του ριζικού κατιόντος του ABTS, ενώ το κάθε πρότυπο διάλυμα Trolox αντικαθίσταται από ίσο όγκο νερού.

Η διαδικασία πραγματοποιείται 3 φορές, για κάθε πρότυπο διάλυμα Trolox.

Πίνακας 2.9 Ποσότητες αντιδραστηρίων προτύπων διαλυμάτων Trolox και τιμές απορροφήσεων με τη μέθοδο ABTS

mM Trolox	A	%ΔA
0,5	0,534	21,47
1	0,476	30,20
1,5	0,387	43,08
2	0,290	57,35
2,5	0,204	70



Εικόνα 2.3 Πρότυπη καμπύλη trolox

Λαμβάνεται υπόψιν και η αραιώση του δείγματος οίνου σε 10πλάσιο όγκο με νερό. Άρα η συγκέντρωση των δειγμάτων εκφρασμένη σε ισοδύναμα trolox ,δίδεται απ' την εξής σχέση: $C=10 \cdot X$ (mM). Όπου X η τιμή mM trolox ,που προκύπτει απ' την παραπάνω εξίσωση.

Πίνακας 2.10 Μετρήσεις λευκού οίνου με τη μέθοδο ABTS

mgr καφ./100 μl ΛΕΥΚΟΥ ΟΙΝΟΥ	A1	A2	A3	A±T.A.	ΔA%	mM trolox
0 mgr	0,361	0,362	0,360	0,361±0,001	46,91	1,6
5 mgr	0,344	0,343	0,345	0,344±0,001	49,41	1,7
10 mgr	0,328	0,327	0,329	0,328±0,001	51,76	1,790

Πίνακας 2.11 Μετρήσεις ερυθρού οίνου με τη μέθοδο ABTS

mgr καφ./100 μl ΕΡΥΘΡΟΥ ΟΙΝΟΥ	A1	A2	A3	A±T.A.	ΔA%	mM trolox
0 mgr	0,444	0,445	0,443	0,444±0,001	34,70	11,08
5 mgr	0,422	0,423	0,421	0,422±0,001	37,94	12,39
10 mgr	0,409	0,410	0,408	0,409±0,001	39,85	13,16

Πίνακας 2.12 Μετρήσεις προτύπων διαλυμάτων με την μέθοδο ABTS

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΚΑΦΕΙΚΟΥ (40 mgr/100 ml)	A1	A2	A3	A±T.A.	ΔA%	mM trolox
8 mgr/100 ml	0,246	0,247	0,245	0,246±0,001	63,82	2,28
10 mgr/100 ml	0,225	0,226	0,224	0,225±0,001	66,91	2,41
12 mgr/100 ml	0,211	0,212	0,210	0,211±0,001	68,97	2,49

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στο κεφάλαιο αυτό παρατίθενται οι πίνακες με τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα των μετρήσεων της αντιοξειδωτικής ικανότητας για τον λευκό οίνο (πίνακας 3.1) , για τον ερυθρό οίνο (πίνακας 3.2) μετά την προσθήκη του καφεϊκού οξέος (5 και 10 mgr) και για τα πρότυπα διαλύματα καφεϊκού οξέος (πίνακας 3.3).

Στην συνέχεια εξάγονται συμπεράσματα για τα ποσοστά αύξησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας του οίνου , λόγω της αύξησης του καφεϊκού οξέος με τις δύο μεθόδους και τέλος γίνεται η τελική σύγκριση των δύο μεθόδων (DPPH, ABTS) .

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.1 Πίνακες - συγκεντρωτικά αποτελέσματα

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.1 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα προσδιορισμών αντιοξειδωτικής ικανότητας για τον λευκό οίνο.

ΛΕΥΚΟΣ ΟΙΝΟΣ	Σύνολο φαινολικών ουσιών F.C. (mgr/l)	DPPH (mM trolox)	ABTS (mM trolox)
5 mgr caff.-0 mgr caff. acid	134,9	0,3515	0,1
10 mgr caff.- 0 mgr caff. acid	228,3	0,597	0,2

Πίνακας 3.2 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα προσδιορισμών αντιοξειδωτικής ικανότητας για τον ερυθρό οίνο.

ΕΡΥΘΡΟΣ ΟΙΝΟΣ	F.C.	DPPH (mM trolox)	ABTS (mM trolox)
5 mgr caff.-0 mgr caff. acid	952	0,877	1,31
10 mgr caff.-0 mgr caff. acid	1.858	1,754	2,08

Πίνακας 3.3 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα προσδιορισμών αντιοξειδωτικής ικανότητας για το πρότυπο διάλυμα καφεϊκού οξέος.

ΠΡΟΤΥΠΑ ΚΑΦΕΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ	F.C.	DPPH (mM trolox)	ABTS (mM trolox)
8 mgr/100 ml	34,5	0,73	2,28
10 mgr/100 ml	57	0,805	2,41
12 mgr/100 ml	91,1	0,91	2,49

Στον πίνακα 3.1 για τον λευκό οίνο βλέπουμε ότι όταν αυξήθηκε κατά 100% η ποσότητα του καφεϊκού οξέος, τα φαινολικά σύμφωνα με την μέθοδο folin Ciocalteu, αυξήθηκαν κατά 69 % .

Όσον αφορά την μέθοδο DPPH, όταν αυξήθηκε κατά 100% η ποσότητα του καφεϊκού οξέος, η αντιοξειδωτική ικανότητα του οίνου αυξήθηκε κατά 69 % .

Τέλος, όσον αφορά την μέθοδο ABTS όταν αυξήθηκε κατά 100% η ποσότητα του καφεϊκού οξέος, αυξήθηκε κατά 100% και η αντιοξειδωτική ικανότητα του λευκού οίνου.

Όσον αφορά τον ερυθρό οίνο, πίνακας 3.2, παρατηρούμε ότι σύμφωνα με την μέθοδο folin Ciocalteu, όταν αυξήθηκε κατά 100% η ποσότητα του καφεϊκού οξέος, αυξήθηκε κατά 95% η συγκέντρωση των φαινολικών.

Όσον αφορά την μέθοδο DPPH, παρατηρούμε ότι είχαμε αύξηση 100% στην αντιοξειδωτική ικανότητα του οίνου, όταν αυξήθηκε κατά 100% η ποσότητα του καφεϊκού οξέος .

Επίσης, η μέθοδος ABTS έδειξε αύξηση 60% της αντιοξειδωτικής ικανότητας του οίνου όταν αυξήθηκε το καφεϊκό κατά 100% . Βέβαια η αύξηση αυτή ήταν πολύ μικρότερη συγκριτικά με την μέθοδο DPPH.

Τέλος, βλέπουμε γενικά ότι ο ερυθρός οίνος έχει περισσότερα φαινολικά από τον λευκό .

Όσον αφορά τον πίνακα 3.3, παρατηρούμε ότι όταν αυξήθηκε κατά 25% η συγκέντρωση του καφεϊκού στο νερό, τα συνολικά αντιοξειδωτικά (καφεϊκό οξύ) αυξήθηκαν κατά 65%. Σύμφωνα με την μέθοδο DPPH η αντιοξειδωτική ικανότητα του νερού αυξήθηκε μόνο κατά 10%, ενώ τέλος με την μέθοδο ABTS αυξήθηκε κατά 8%. Όταν επίσης αυξήθηκε η συγκέντρωση του καφεϊκού στο νερό κατά 50%, τα συνολικά αντιοξειδωτικά αυξήθηκαν κατά 165% και η αντιοξειδωτική ικανότητα του νερού με την μέθοδο DPPH αυξήθηκε κατά 13% και με την μέθοδο ABTS αυξήθηκε μόνο κατά 10%.

Έγινε και μία στατιστική ανάλυση paired t test, στα λευκά και τα ερυθρά δείγματά μας, με διάστημα εμπιστοσύνης 95%. Από την στατιστική ανάλυση των πειραματικών δεδομένων, τόσο στη μέθοδο DPPH, και ABTS βρήκαμε ότι τα δείγματα διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους, P-Value < 0,05.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.2 Συμπεράσματα

Στην μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δύο από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες και διαδεδομένες φασματοφωτομετρικές μεθόδους και συγκεκριμένα την DPPH και την ABTS , για να μετρηθεί η αντιοξειδωτική ικανότητα του λευκού και του ερυθρού οίνου . Έγινε πείραμα με τον λευκό και τον ερυθρό οίνο μόνο του και στην συνέχεια με την προσθήκη καφεϊκού οξέος.

Σύμφωνα , λοιπόν, με τα στατιστικά δεδομένα των πειραμάτων, η μέθοδος ABTS υπερτερεί κατά πολύ ποσοτικά όσον αφορά την αντιοξειδωτική ικανότητα του λευκού οίνου , ενώ η μέθοδος DPPH υπερτερεί στην αντιοξειδωτική ικανότητα του ερυθρού οίνου.

Επίσης, και με τις δύο παρατηρήθηκε η αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του οίνου με την προσθήκη καφεϊκού οξέος και συγκεκριμένα με την ABTS στον λευκό μετρήθηκαν μεγαλύτερες αυξήσεις , ενώ με την DPPH μετρήθηκαν οι μεγαλύτερες αυξήσεις στον ερυθρό οίνο [3] [26] .

Συμπερασματικά λοιπόν, και οι δύο μέθοδοι (DPPH, ABTS) αν και διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τις αρχές της ανάλυσης και τις συνθήκες της αντίδρασης, αλληλοσυμπληρώνονται όμως μεταξύ τους και έτσι μία μόνο μέθοδος δεν αρκεί για να δείξει όλα τα αντιοξειδωτικά που περιέχει ο οίνος.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ:

- ΑΡΘΡΑ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ :
 1. Dimitrina Zheleva-Dimitrova et al, *Pharmacognosy Magazine* | April 2010 | Vol 6 | Issue 22
 2. Ryuichi Arakawa et al, *J Am Soc Mass Spectrom* 2004, 15, 1228–1236
 3. Ebru Büyüktuncel et al, *Food and Nutrition Sciences*, 2014, 5, 1660-1667
 4. *Processing and Impact on Antioxidants in Beverages*, 2014
 5. Philip Molyneux, *Songklanakar J. Sci. Technol.*, 2004, 26(2) : 211-219
 6. M.S. Fernández-Pachón et al, *Analytica Chimica Acta* 513 (2004) 113–118
 7. ROBERTA RE et al, *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 26, Nos. 9/10, pp. 1231–1237, 1999
 8. Daniel Bajčan et al, *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences* · February 2013
 9. Patricia Hernández-Rodríguez et al, in *Bioactive Compounds, Health Benefits and Potential Applications*, 2019
 10. Sebastian E.W. Opitz et al, in *Processing and Impact on Antioxidants in Beverages*, 2014
 11. Carla Maria Oliveira et al, *Food Research International* 44 (2011) 1115–1126
 12. Sagar B. Kedare et al, *J Food Sci Technol* (July–August 2011) 48(4):412–422
 13. G. MARINOVA et al, *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 17 (No 1) 2011, 11-24
 14. Deepshikha Gupta et al, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* · February 2015
 15. *Am. J. Enol. Vitic.* 57:3 (2006)
 16. Leigh M Schmidtke et al , *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* · February 2011
 17. *Grape phenolic maturity; Determination methods and consequences on wine phenolic composition Ph Doctoral Thesis* , Directed by Dr. Fernando Zamora and Dr. Joan Miquel Canals Departament de Bioquímica i Biotecnologia
 18. Gaetke, L. M., & Chow, C. K. (2003). Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology*, 189(1-2), 147-163
 19. M.S.Fernández-Pachón et al, *Analytica Chimica Acta*, Volume 513, Issue 1, 18 June 2004, Pages 113-118.
 20. Heim, K. E., Tagliafero, A. R., & Bobiyla, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10), 572-584).
 21. Bondet V. et al. (1997), *Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH.Free Radical Method*, *LWT - Food Science and Technology*, Volume 30, Issue 6, September 1997, Pages 609-615
 22. Fan X. et al. (2020), *Guidelines for antioxidant assays for food components*, *Food Frontiers*. 2020; 1:60–69
 23. Andrew L. Waterhouse, et al, *Oxidation of Wine Phenolics: A Critical Evaluation and Hypotheses*, *ASEV 2005 Phenolics Symposium*, *Am. J. Enol. Vitic.* 57:3 (2006)
 24. Leigh M Schmidtke, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* · February 2011
 25. Ebru Büyüktuncel et al, *Food and Nutrition Sciences*, Vol.5 No.17(2014), Article ID:49522,8 pages.
 26. Chiara Di Lorenzo et al, *January 2017BIO Web of Conferences* 9:04008 DOI: 10.1051/bioconf/20170904008.

27. Arabela UNTEA et al, Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies 75(2)/ 2018.
28. ΠΑΠΑΔΗΜΗΤΡΙΟΥ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ-ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ, ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΠΑΛΑΙΩΣΗΣ ΣΤΙΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΕΡΥΘΡΩΝ ΟΙΝΩΝ, ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ, ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ, ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ», ΑΘΗΝΑ ΙΟΥΝΙΟΣ 2019
29. ΣΙΑΜΟΥΡΔΑΝΗ ΟΥΡΑΝΙΑ- Συγκριτική Μελέτη της in vitro αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλισμάτων γιγάρτων ποικιλιών σταφυλιών -ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΙΓΑΙΟΥ ΣΧΟΛΗ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
30. ΣΑΜΑΡΑΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ, Αποτίμηση αντιοξειδωτικής δράσης σε τοπικά κρασιά με συνδυασμό μοριακών τεχνικών, ΛΑΡΙΣΑ 2018 ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
31. ΠΟΛΙΤΗ ΒΑΣΙΛΙΚΗ , ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΕΝΔΗΜΙΚΟΥ ΒΟΤΑΝΟΥ ΤΟΥ ΤΑΥΓΕΤΟΥ ORIGANUM SCABRUM, ΑΝΩΤΑΤΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ, ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ, ΚΑΛΑΜΑΤΑ 2016
32. ΣΟΥΓΙΑ ΛΑΜΠΡΙΝΗ, Συγκριτική μελέτη παλαιωμένων brandy ως προς την φαινολική τους σύσταση και την αντιοξειδωτική τους ικανότητα» ΑΘΗΝΑ, ΜΑΡΤΙΟΣ 2022, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΟΙΝΟΥ, ΑΜΠΕΛΟΥ ΚΑΙ ΠΟΤΩΝ.
33. Τσακίρης Αργύρης, Οινολογία, Έρευνα & Ανάπτυξη, ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΨΥΧΑΛΟΣ
34. Σουφλερός, Ε. Η. (2000). Οινολογία : επιστήμη και τεχνογνωσία. Θεσσαλονίκη: 2000.
35. Σφλώμος, 2011

Άρθρα από το διαδίκτυο

36. https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%A6%CE%BB%CE%B1%CE%B2%CE%BF%CE%BD%CE%BF%CE%B5%CE%B9%CE%B4%CE%AE#%CE%A7%CE%B7%CE%BC%CE%B9%CE%BA%CE%AE_%CE%B4%CE%BF%CE%BC%CE%AE
37. <https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%9F%CE%BE%CE%B5%CE%B9%CE%B4%CE%BF%CE%B1%CE%BD%CE%B1%CE%B3%CF%89%CE%B3%CE%AE>