



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

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Πεπτιδικές Ενώσεις στον Οίνο**

**ΔΗΜΗΤΡΟΠΟΥΛΟΥ ΜΑΡΙΑ**

**ΑΜ: 18685086**

**Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: ΕΥΑΓΓΕΛΟΥ ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ**

**Αθήνα 2023**



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

**BACHELOR THESIS**

**Peptides in Wine**

**DIMITROPOULOU MARIA**

**Registration Number: 18685086**

**Supervisor: EVANGELOU ALEXANDRA**

**Athens, 2023**



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

**ΔΗΛΩΣΗ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ**

**Οι υπογράφωντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη διπλωματική  
εργασία με τίτλο:**

**«Πεπτιδικές Ενώσεις στον Οίνο»**

**και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.**

|   |  |
|---|--|
| <b>Ψηφιακή Υπογραφή<br/>Επιβλέποντα Καθηγητή<br/>(1ου Μέλους Επιτροπής)</b> |  |
| <b>Ψηφιακή Υπογραφή<br/>Καθηγητή<br/>(2ου Μέλους Επιτροπής)</b>             |  |
| <b>Ψηφιακή Υπογραφή<br/>Καθηγητή<br/>(3ου Μέλους Επιτροπής)</b>             |  |

## ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ/ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογράφουσα Δημητροπούλου Μαρία του Ιωάννη , με αριθμό μητρώου 18685086 φοιτήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστημών Οίνου Αμπέλου & Ποτών , δηλώνω υπεύθυνα ότι: «Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου». Επιθυμώ την απαγόρευση πρόσβασης στο πλήρες κείμενο της εργασίας μου μέχρι ..... και έπειτα από αίτηση μου στη Βιβλιοθήκη και έγκριση του επιβλέποντα καθηγητή\*

Η Δηλούσα

Δημητροπούλου Μαρία



## Ευχαριστίες

Ολοκληρώνοντας την παρούσα πτυχιακή διατριβή, η οποία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια ολοκλήρωσης του προπτυχιακού προγράμματος σπουδών του τμήματος Επιστημών Οίνου Αμπέλου και Ποτών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στα άτομα που με το δικό τους τρόπο συνέβαλλαν και βοήθησαν, ώστε να έρθει εις πέρας αυτή η προσπάθεια.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την καθηγήτριά μου Κα Ευαγγέλου Αλεξάνδρα, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε εξ αρχής αναθέτοντάς μου το συγκεκριμένο θέμα, την πολύτιμη καθοδήγησή της, τις υποδείξεις της, το αμείωτο ενδιαφέρον της και τη διαρκή υποστήριξη και συμπαράσταση της από την αρχή μέχρι το τέλος.

Στη συνέχεια, θέλω να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τις καθηγήτριες Κα Ντουρτόγλου Ευθαλία και Κα Χατζηλαζάρου Αρχοντούλα για την συνεργασία και τις πολύτιμες συμβουλές τους.

Αδιαμφισβήτητα οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου και ιδιαίτερα στους γονείς μου, Γιάννη και Ελένη, που με στηρίζουν με κάθε τρόπο και είναι δίπλα μου σε κάθε μου βήμα πιστεύοντας στις ικανότητές μου και ενθαρρύνοντάς με να επιτύχω τους στόχους μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη θεία μου Βασιλική που έφυγε πρόσφατα από τη ζωή και ήταν ισχυρό στήριγμα σε κάθε μου βήμα από την αρχή της πορείας μου, για αυτό θα ήθελα να της αφιερώσω και αυτή μου την προσπάθεια.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

### Contents

|   |    |
|---|----|
| <b>ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ</b> .....   | 1  |
| Ευχαριστίες.....  | 5  |
| ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....  | 6  |
| Κατάλογος εικόνων.....  | 8  |
| Κατάλογος πίνακα.....   | 9  |
| Κατάλογος σχημάτων.....   | 9  |
| <b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....   | 10 |
| <b>ABSTRACT</b> .....   | 12 |
| <b>Συντμήσεις - ακρωνύμια</b> .....   | 14 |
| <b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....   | 16 |
| <b>1° ΚΕΦΑΛΑΙΟ. ΠΕΠΤΙΔΙΑ ΚΑΙ ΟΙΝΟΣ</b> .....  | 17 |
| 1.1 Πεπτίδια – ορισμός και η παρουσία τους στη φύση.....  | 17 |
| <b>1.2 Οίνος</b> .....  | 19 |
| 1.2.1 Στάδια παραγωγής οίνου – σύντομη περιγραφή.....   | 19 |
| <b>1.2.2 Συστατικά οίνου</b> .....  | 21 |
| <b>2° ΚΕΦΑΛΑΙΟ. Σύνθεση πεπτιδίων</b> .....   | 23 |
| 2.1 Φυσική σύνθεση/παρουσία πεπτιδίων στον οίνο.....  | 23 |
| 2.2 Χημική σύνθεση πεπτιδίων.....   | 25 |
| <b>2.3 Ενζυμική σύνθεση πεπτιδίων</b> .....   | 29 |
| <b>3° ΚΕΦΑΛΑΙΟ. Πεπτίδια στον Οίνο - Ρόλος στην οινοποίηση</b> .....                                      | 32 |
| 3.1 Συμβολή των πεπτιδίων ως πηγή αζώτου.....   | 32 |
| 3.2 Ο ρόλος των πεπτιδίων στις φυσικοχημικές ιδιότητες και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου..... | 36 |
| <b>4° ΚΕΦΑΛΑΙΟ. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ</b> .....   | 39 |
| <b>4.1 Πεπτίδια που έχουν ανιχνευτεί σε σταφύλια και οίνους</b> .....                                     | 39 |
| 4.2 Γλουταθειόνη.....   | 47 |
| <b>5° ΚΕΦΑΛΑΙΟ. Μέθοδοι προσδιορισμού και ανάλυσης πεπτιδίων στον οίνο</b> .....                          | 54 |
| <b>5.1 Ηλεκτροφόρηση</b> .....  | 55 |
| <b>5.2 Χρωματογραφία</b> .....  | 57 |
| 5.2.1 Υγρή χρωματογραφία.....   | 57 |
| 5.2.2 Αέρια χρωματογραφία.....  | 66 |
| <b>5.3 Φασματομετρία μάζας</b> .....  | 68 |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>5.4 ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ (Metabolomics)/ ΠΕΠΤΙΔΟΜΙΚΗ (Peptidomics) ....</b> | <b>73</b> |
| <b>6° ΚΕΦΑΛΑΙΟ. Δράσεις πεπτιδίων οίνου .....</b>                      | <b>79</b> |
| <b>ΕΠΙΛΟΓΟΣ.....</b>   | <b>89</b> |
| <b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>  | <b>91</b> |

## Κατάλογος εικόνων

|   |    |
|---|----|
| <b>Εικόνα 1.</b> Σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού.....   | 17 |
| Εικόνα 2: Ο κύκλος σύνθεσης πεπτιδίου σε στεραιά φάση.....  | 27 |
| Εικόνα 3. Σύνθεση πεπτιδίων στη στεραιά φάση σχηματική απεικόνιση .....   | 27 |
| Εικόνα 4 Ενζυμική διάσπαση πρωτεΐνης προς σχηματισμό μικρότερων πεπτιδίων.....  | 30 |
| <b>Εικόνα 5.</b> Σχηματική απεικόνιση της αυτόλυσης των ζυμών σε αφρώδεις οίνο, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση πεπτιδίων..... | 34 |
| Εικόνα 6. Το τριπεπτίδιο γλουταθειόνης.....   | 47 |
| Εικόνα 7. Γλουταθειόνη- σχηματική απεικόνιση του πεπτιδίου στο χώρο. ....   | 48 |
| Εικόνα 8. Απεικόνιση της αντίδρασης γλουταθειόνης με ορθο-κινόνες.....  | 49 |
| Εικόνα 9. Απεικόνιση 2-S-γλουταθειονολ-καφταρικό οξύ.....   | 50 |
| Εικόνα 10. <b>Διαδικασία οξειδωσης της γλουταθειόνης – Δομές GSH και GSSG.</b><br>.....                                       | 51 |
| Εικόνα 11. Η εξέλιξη της εφαρμογής των μεθόδων αναλυτικής χημείας στην ανάλυση τροφίμων.....                                  | 55 |
| Εικόνα 12. Τυπική διάταξη Υγρού Χρωματογράφου Υψηλής Πίεσης.....  | 58 |
| Εικόνα 13. Αναπαράσταση τυπικού συστήματος αέριας χρωματογραφίας.....   | 67 |
| Εικόνα 14. Συνήθεις μέθοδοι διεξαγωγής δακτυλικών αποτυπωμάτων κρασιού με βάση τη φασματομετρία μάζας.....                    | 73 |



## Κατάλογος πίνακα

|  |    |
|--|----|
| Πίνακας 1. Σύνθεση ενός τυπικού ξηρού επιτραπέζιου οίνου .....                 | 21 |
| Πίνακας 2. Συγκεντρώσεις κύριων αζωτούχων συστατικών σε γλεύκος και οίνο ..... | 22 |
| Πίνακας 3: Συγκεντρωτικός πίνακας πεπτιδίων οίνου, προέλευση και δράση αυτών.. | 43 |

## Κατάλογος σχημάτων

|   |    |
|---|----|
| Figure 1. Οι τομείς δράσης των βιοενεργών πεπτιδίων ..... | 81 |
|---|----|

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο οίνος είναι ένας ζωντανός οργανισμός που εξελίσσεται και αλλάζει με το πέρασμα του χρόνου. Αποτελείται από πολυάριθμες ενώσεις, διαφόρων κατηγοριών που καθεμία συνεισφέρει στο τελικό προϊόν και στην διατήρησή του κατά τη διάρκεια του χρόνου. Τα πεπτίδια αποτελούν και αυτά μια κατηγορία ενώσεων του οίνου. Είναι αζωτούχες ενώσεις και δρουν ως δομικό συστατικό των πρωτεϊνών. Η δομή των ίδιων των πεπτιδίων αποτελείται από αλληλουχίες δύο ή περισσότερων αμινοξέων που ενώνονται με πεπτιδικούς δεσμούς και παρατηρείται αρκετά μεγάλη ποικιλία συνδυασμών. Στόχος της παρούσας βιβλιογραφικής μελέτης ήταν η συλλογή όλων των μελετών που έχουν γίνει τα τελευταία χρόνια πάνω στη μελέτη των πεπτιδίων που σχετίζονται στην οινοποίηση, μελέτες που αφορούν την ανίχνευσή τους, την ανάλυσή τους, το πώς επηρεάζουν τα φυσικοχημικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου, καθώς επίσης και η έρευνα ως προς τις πιθανές δράσεις που έχουν.

Στην παρούσα εργασία, αναφέρονται αρχικά ο τρόπος σχηματισμού των πεπτιδικών δεσμών, ο τρόπος σύνθεσής τους με βιολογική ή χημική μεθοδολογία, μαζί με τις υποκατηγορίες τους. Τα πεπτίδια τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει γνωστά και παρουσιάζουν εφαρμογή σε αρκετούς τομείς της υγείας, της κοσμητολογίας και των τροφίμων, εξαιτίας των θετικών αποτελεσμάτων που επιφέρουν. Έπειτα, ιδιαίτερη αναφορά γίνεται στο ρόλο και στη δράση των πεπτιδίων που εντοπίζονται σε οίνους και υποπροϊόντα αυτών, καθ' όλη τη διάρκεια της οινοποιητικής διαδικασίας έως και την κατανάλωση. Θετική είναι και η συνεισφορά τους στην ανθρώπινη υγεία, καθώς έχουν εντοπιστεί πεπτίδια με βιοενεργό δράση. Βασικοί τομείς που συνεισφέρουν είναι το καρδιαγγειακό σύστημα και η ενίσχυση της μνήμης, ενώ γίνεται λόγος και για συνεισφορά σε άλλους τομείς. Για τον καλύτερο προσδιορισμό των πεπτιδίων γίνεται ανίχνευση και ταυτοποίηση της πεπτιδικής αλληλουχίας με αρκετά πεπτίδια να είναι μέχρι σήμερα γνωστά. Το πιο μελετημένο και αναγνωρισμένο πεπτίδιο του οίνου είναι η γλουταθειόνη που δρα γενικά ενάντια στις οξειδώσεις του οίνου.

Για να είναι γνωστά τα χαρακτηριστικά των πεπτιδίων και να μπορούν να μελετώνται, γίνεται εφαρμογή ποικίλων τεχνολογιών, καθώς με το πέρασμα του χρόνου εξελίσσονται. Αν και η μελέτη των πεπτιδίων είναι δύσκολη λόγω της δυσκολίας απομόνωσής τους, οι τεχνικές που εφαρμόζονται είναι η υγρή χρωματογραφία, καθώς και οι υποκατηγορίες αυτής με πιο γνωστές τη χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC), η υγρή χρωματογραφία ανάστροφης φάσης (RP-HPLC), χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (SEC) και άλλες που παρατίθενται παρακάτω. Η αέρια χρωματογραφία

αποτελεί και αυτή μια εφαρμόσιμη μέθοδο ενώ, και οι 2 τρόποι χρωματογραφίας μπορούν να συνδυαστούν με φασματομετρία μάζας για την ταυτοποίηση ενώσεων. Μια πιο εξελιγμένη τεχνική αποτελούν η μεταβολομική και πεπτοδομική, που αποσκοπούν στη μέγιστη δυνατή ανίχνευση μεταβολιτών.

Τέλος, αναφέρονται σκέψεις για μελλοντικά βήματα που μπορούν να γίνουν στον τομέα μελέτης πεπτιδίων στον οίνο.

**Λέξεις κλειδιά:** πεπτίδια, γλουταθειόνη, αυτόλυση ζυμών, αζωτούχες ενώσεις οίνου, σύνθεση πεπτιδίων, βιοενεργά πεπτίδια, υγρή χρωματογραφία, μεταβολομική

## ABSTRACT

Wine is a living organism that evolves and changes over time. It consists of numerous compounds, of various categories that contribute to the final product and its availability over time. Peptides are also a category of wine compounds. They are nitrogenous compounds and act as a structural component of proteins. The structure of the peptides themselves consists of sequences of 2 or more amino acids joined by peptide bonds, and quite a wide variety of combinations is observed. In the present bibliographic study, the way of formation of the peptide bonds, the way of their synthesis by biological or chemical methods, together with their subcategories, are mentioned.

In recent years, peptides have become well-known and are applied in several areas of health, cosmetology and food, due to their positive results. Special mention is made of the role and action of peptides found in wines and their by-products, throughout the winemaking process up to consumption. Its contribution to human health is also positive, as peptides with bioactive activity have been identified. Key areas that contribute are the cardiovascular system and their anti-memory ability, while there is also talk of a contribution in other areas. In order to better determine the peptides, the peptide sequence is detected and identified, with several peptides being known to date. The most studied and recognized wine peptide is glutathione which generally acts against wine oxidations.

In order to know the characteristics of peptides and to be able to study them, various technologies are applied, as they evolve over time. Although the study of peptides is difficult due to the difficulty of their isolation, the techniques applied are liquid chromatography, as well as its subcategories with the most well-known high-pressure chromatography (HPLC), reversed-phase liquid chromatography (RP-HPLC), size exclusion chromatography (SEC) and others listed below. Gas chromatography is also a method used, while both chromatography methods can be combined with mass spectrometry for compound identification. A more sophisticated technique is metabolomics and peptidomics, which aim at the maximum possible detection of metabolites.

The small amount of peptides identified led to the need to create synthetic peptides, in order to study their action and their contribution in each case. In this

thesis, some considerations and proposals for the future application of peptides are presented.

**Keywords:** peptides, glutathione, yeast autolysis, wine nitrogen compounds, peptide synthesis, bioactive peptides, liquid chromatography, metabolomics

## Συντμήσεις - ακρωνύμια

2D-PAGE: Ηλεκτροφόρηση γέλης δύο διαστάσεων  
ACEI: Μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης I  
AMPs: Αντιμικροβιακά πεπτίδια  
Boc: Τριτ-βουτοξυκαρβονυλομάδα- προστατευτική ομάδα  
CD: Κυκλική διχρωμία  
CE: Ηλεκτροφόρηση  
CHCA: α-κυανο-4-υδροξυκινναμωνικό οξύ  
CHI: Χιτινάσες  
CPPs: Φωσφοπεπτίδια σύνθεσης ασβεστίου  
Da: Ντάλτον  
ELSD: Σύστημα ανίχνευσης σκέδασης του φωτός  
ESI: Ιοντισμός ηλεκτροψεκασμού  
Fmoc: Φθορενυλομεθοξυκαρβονυλομάδα- προστατευτική ομάδα  
FSCE: Ηλεκτροφόρηση με ελεύθερο διάλυμα  
FT: Μετασχηματισμός Fourier  
GAPDH: Αφυδρογονάση 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης  
GC: Αέρια χρωματογραφία  
GFC: Χρωματογραφία διήθησης γέλης  
GIT: Γαστραντερική οδός  
GPC: Χρωματογραφία διήθησης γέλης  
GRP: Θειοαιθέρας  
GSH: Γλουταθειόνη  
GSSG: Οξειδωμένη γλουταθειώνη  
HHL: Ιππουρυλοιστιδυλολευκίνη  
HOBT: Υδροξυβενζοτρίαζόλη  
HRGC: Αέρια χρωματογραφία υψηλής ευκρίνειας  
ICR: Συντονισμός ιόντων κυκλοτρονίων  
IDY: Αδρανοποιημένες ξηρές ζύμες  
IEC: Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής  
IEF: Ισοηλεκτρική εστίαση  
IPG: Ακίνητοποιημένες διαβαθμίσεις pH  
IT: Παγίδα ιόντων  
LC: Υγρή χρωματογραφία  
LfcinB: Λακτοφερρίκινη  
LLE: Εκχύλιση υγρού-υγρού  
MALDI: Φασματομετρία εκρόφησης με λείζερ  
mM: ΜιλιMolarity  
MORs: Ανταγωνιστές μ-οποειδών  
MS: Φασματομετρία μάζας  
NADPH: Φωσφορικό δινουκλεοτίδιο νικοτιναμίδης αδενίνης  
NMR: Πυρινικός μαγνητικός συντονισμός  
O. oeni: *Oenococcus oeni*  
OD: Οπτική πυκνότητα  
OPA: Ορθοφθαλδεΐδη  
OTA: Ωχρατοξίνη A  
PAFs: Σύνολο εξαπεπτιδίων  
pBOWs: Υποθετικοί βιοδείκτες οινικής προέλευσης

PDAD: Ανίχνευση διάταξης φωτοδιόδου  
PEP: Ανασταλτικά πεπτίδια προλυλενδοπεπτιδάση  
PEPT1: Μεταφορέας πεπτιδίων 1  
PGC: Στήλη πορώδους γραφίτη άνθρακα  
PPO: Πολυφαινολοξειδάση  
PR: Υγρή χρωματογραφία ανάστροφης φάσης  
PRPs: Πεπτίδια πλούσια σε προλίνη  
QC: Έλεγχος ποιότητας  
ROS: Reactive Oxygen Species- Δραστικές ρίζες οξυγόνου  
*S.c.: Saccharomyces cerevisiae*  
SDS-PAGE: Ηλεκτροφόρηση γέλης δωδεκακυλοθρικό νάτριο  
SEC: Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους  
SELDI: Εκρόφηση ιονισμού λέιζερ ενισχυμένης επιφάνειας  
SPE: Εκχύλιση στερεάς φάσης  
SPME: Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης  
TCS: Θερμοδυναμικά ελεγχόμενη σύνθεση πεπτιδίων  
TD: Θερμική εκρόφηση  
TFA: Τριφθορικό οξύ  
TLP: Thaumatin Like Proteins - Πρωτεΐνες που μοιάζουν με θαυματίνη  
TMS: Εστέρας τριμεθυλοσιλυλίου  
TOF: Time of Flight - Χρόνος πτήσης ιονισμού  
UV: Υπεριώδης ακτινοβολία  
UV-Vis: Φασματομετρία υπεριώδους- ορατού  
V. Vinifera: Vitis Vinifera  
YAN: Yeast Assimilable Nitrogen (Αφομοιώσιμο άζωτο)  
HPLC: Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο οίνος είναι ένα αλκοολούχο ποτό, που προκύπτει από τη ζύμωση των σταφυλιών. Το κρασί είναι αρκετά δημοφιλές από την αρχαιότητα έως τη σημερινή εποχή και κατέχει έναν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην καθημερινότητα των ανθρώπων είτε σε ευχάριστα είτε σε δυσάρεστα γεγονότα. Στον ελληνικό πολιτισμό παρουσιάζεται ως πρωτίστης σημασίας αγαθό, γεγονός που το επιβεβαιώνουν και οι πολυάριθμοι εορτασμοί προς το θεό Διόνυσο, τον οποίο είχαν χαρακτηρίσει ως τον θεό του αμπελιού και του οίνου, ενώ μια ιδιαίτερα φημισμένη γιορτή ήταν τα Διονύσια. Ιδιαίτερη θέση κατείχε το κρασί και στα πεδία των μαχών, καθώς συνηθιζόταν να προσφέρεται στους στρατιώτες ως ευφραντικό και για να έχουν καλύτερη απόδοση στη μάχη, το τέχνασμα αυτό παρατηρείται να μεταφέρεται μετέπειτα και στη νεότερη ιστορία. Αξιοσημείωτο είναι επίσης, πως ουκ λίγες είναι οι αναφορές για τον ιδιαίτερο τρόπο σερβιρίσματος του οίνου στα μεγάλα συμπόσια των ευγενών για τα οποία αντλούνται πληροφορίες από έργα τέχνης και απεικονίσεις σε αγγεία, με την καλλιέργεια της αμπέλου και την παραδοσιακή διαδικασία οινοποίησης. Αργότερα στη Βυζαντινή αυτοκρατορία έως και την σημερινή εποχή η σημασία του οίνου φανερώνεται από την παρουσία του στην ορθόδοξη χριστιανική λατρεία, διότι παρομοιάζεται με το αίμα του Χριστού στην τέλεση της Θείας Λειτουργίας. Από τη στιγμή, λοιπόν, που ο οίνος εδραιώθηκε στην Ελληνική και παγκόσμια κοινωνία όλο και περισσότερες έρευνες γίνονται για την καλύτερη κατανόησή του.

Με την εξέλιξη της επιστήμης ποικίλες αναλύσεις και έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί με σκοπό τον προσδιορισμό των ουσιών-ενώσεων που συμπεριλαμβάνονται σε αυτό, καθώς και το πως συνεισφέρουν στην τελική ποιότητα του παραγόμενου οίνου, τα φυσικοχημικά και οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά. Μια ομάδα ενώσεων που παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον και ερευνητικά δεν έχει διεξοδικά μελετηθεί είναι τα πεπτίδια. Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η συγκέντρωση όλων των βιβλιογραφικών αναφορών των τελευταίων χρόνων πάνω στην έρευνα που έχει γίνει για τα πεπτίδια που απαντώνται στην πορεία της οινοποίησης και η διερεύνηση του ρόλου τους στον οίνο.

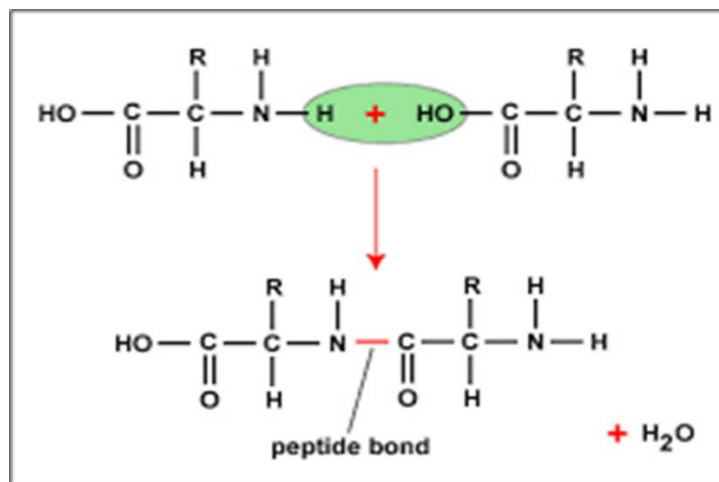


## 1° ΚΕΦΑΛΑΙΟ. ΠΕΠΤΙΔΙΑ ΚΑΙ ΟΙΝΟΣ

### 1.1 Πεπτίδια – ορισμός και η παρουσία τους στη φύση

Οι πρωτεΐνες κατέχουν πρωταρχική θέση ανάμεσα στο πλήθος των οργανικών και ανόργανων ενώσεων που είναι απαραίτητες για την ομαλή λειτουργία των έμβιων οργανισμών. Δομικό συστατικών των πρωτεϊνών είναι τα αμινοξέα, τα οποία ενωμένα σχηματίζουν πεπτιδικές αλυσίδες.

Τα πεπτίδια στη βιοχημεία και τη βιολογία, αναφέρονται ως ομάδα οργανικών ενώσεων που αποτελούνται από δύο ή παραπάνω αμινοξέα ενωμένα μεταξύ τους με πεπτιδικούς δεσμούς (αμιδικούς, -CONH-).



**Εικόνα 1.** Σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 1, η δημιουργία του πεπτιδικού δεσμού στην ουσία γίνεται μέσω αντίδρασης συμπύκνωσης. Ως γνωστόν, κάθε αμινοξύ αποτελείται από μια καρβοξυλομάδα (-COOH) και μια αμινομάδα (-NH<sub>2</sub>). Κατά τη συμπύκνωση, η καρβοξυλομάδα του προπορευόμενου ενώνεται με την αμινομάδα του επόμενου αμινοξέος και η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται έως την ολοκλήρωση της αλληλουχίας. Μέσω της ένωσης αυτής υπάρχουν δύο ελεύθερα άκρα, καθώς από το πρώτο αμινοξύ μένει ελεύθερη η αμινομάδα, ενώ από το τελευταίο μένει ελεύθερη η καρβοξυλομάδα.

Ανάλογα με τον αριθμό των αμινοξέων ένα πεπτίδιο χαρακτηρίζεται ως διπεπτίδιο (δύο αμινοξέα), τριπεπτίδιο (τρία αμινοξέα), τετραπεπτίδιο (τέσσερα αμινοξέα) κ.λπ. Κατά παραδοχή, μόρια που αποτελούνται από μέχρι περίπου 50 αμινοξέα θεωρούνται πεπτίδια, ενώ τα μεγαλύτερα πρωτεΐνες (μία ή και περισσότερες

πολυπεπτιδικές αλυσίδες). Γενικά, ο όρος ολιγοπεπτίδια ή πεπτίδια χαμηλού μοριακού βάρους, αναφέρεται σε πεπτίδια με 10 ή και λιγότερα αμινοξέα, ενώ τα πολυπεπτίδια ως όρος αναφέρεται για πεπτίδια με περισσότερα αμινοξέα. Το σημείο διαχωρισμού των πολυπεπτιδίων σε πρωτεΐνες δεν έχει καθοριστεί απόλυτα αν και οι πρωτεΐνες θεωρείται ότι αποτελούνται από τουλάχιστον 100 αμινοξέα ( $Da > 1000$ ). Συνεπώς, η διαφορά των πρωτεϊνών με τα πεπτίδια βασίζεται στο μέγεθος της αλληλουχίας των αμινοξέων, καθώς τα πεπτίδια αποτελούνται από μικρότερο αριθμό αμινοξέων, σε αντίθεση με τις πρωτεΐνες, που έχουν πολύ μεγαλύτερο Mr.

Στη φύση έχουν βρεθεί πολλά πεπτίδια με πλήθος διαφορετικών λειτουργιών. Μερικά από αυτά αποτελούν προϊόντα αποικοδόμησης πρωτεϊνών, άλλα σχετίζονται άμεσα με πολύ σημαντικές φυσιολογικές λειτουργίες (π.χ. ορμονική δράση), άλλα δρουν ως αντιβιοτικά (π.χ. πενικιλίνη) ή ακόμα και ζωικά ή φυτικά δηλητήρια (π.χ. πεπτίδια που έχουν βρεθεί σε μανιτάρια, μέδουσες και φίδια).

Όσον αφορά τα τρόφιμα, πλήθος πεπτιδίων έχουν βρεθεί σε τρόφιμα και πολλές μελέτες τα τελευταία χρόνια επικεντρώνονται στην ανάπτυξη περισσότερων λειτουργικών τροφίμων με στόχο την πρόασηψη της ανθρώπινης υγείας. Κατά την διαδικασία πέψης ορισμένων πρωτεϊνών απελευθερώνονται τα λεγόμενα βιοενεργά πεπτίδια, συνήθως έως 20 αμινοξέων αλληλουχίας, τα οποία εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος και ασκούν ευεργετική δράση στον οργανισμό. Τα πεπτίδια αυτά υπάρχουν σε ζωικά και φυτικά τρόφιμα ως ανενεργές μορφές, κρυμμένες στην αλληλουχία διαιτητικών πρωτεϊνών και έχουν διάφορες βιολογικές δράσεις (πεπτίδια οπιοειδή, αντιμικροβιακά, αντιθρομβωτικά, αντιυπερτασικά, ανοσορρυθμιστικά κ.ά.) Η πιο πλούσια πηγή βιοενεργών πεπτιδίων φαίνεται να είναι το γάλα. (Καραχοτζήτη Χ., 2017 MSc)

Στον τομέα της οινολογίας είναι γεγονός ότι οι πρωτεΐνες στους οίνους έχουν μελετηθεί σε εκτενέστερο βαθμό συγκριτικά με τα πεπτίδια, για τα οποία οι έρευνες είναι πολύ λιγότερες. Παρόλ' αυτά, έχει βρεθεί ότι πεπτίδια αποτελούν μέρος των αζωτούχων συστατικών της σάρκας του σταφυλιού, πεπτίδια υπάρχουν στο γλεύκος, στον παραγόμενο, έπειτα από τη ζύμωση οίνου, ενώ σχηματίζονται και κατά την παλαίωση του οίνου. Στους δε αφρώδεις οίνους, πεπτίδια φαίνονται να έχουν ικανότητες δημιουργίας αφρού και γαλακτωμάτων. Στα επόμενα κεφάλαια θα παρουσιαστεί διεξοδικά ο ρόλος των πεπτιδίων στην πορεία της οινοποίησης, ποιες πεπτιδικές αλληλουχίες έχουν ανιχνευθεί και με ποιες αναλυτικές τεχνικές.

## 1.2 Οίνος

### 1.2.1 Στάδια παραγωγής οίνου – σύντομη περιγραφή

Η παραγωγή του οίνου είναι μια φυσική διαδικασία που πραγματοποιείται ως φυσική εξέλιξη της ζύμωσης των σακχάρων του χυμού των σταφυλιών. Από τα αρχαία χρόνια, οι άνθρωποι παρατηρώντας αυτή τη διεργασία, προσπάθησαν να την εξελίξουν, αναπτύσσοντας έτσι σταδιακά την επιστήμη της οινολογίας. Πλέον κάθε οينوπαραγωγός μπορεί να εφαρμόζει τα δικά του μυστικά και τεχνικές, όμως ακολουθούν ένα πρωτόκολλο με βασικά στάδια. Οι 2 βασικές τεχνικές οينوποίησης είναι η λευκή και η ερυθρή οينوποίηση. Παρουσιάζουν αρκετά κοινά αλλά και διάφορες. Η ερυθρή οينوποίηση έχει περισσότερα στάδια, καθώς είναι επιθυμητή η εκχύλιση χρώματος και φαινολικών, ενώ στη λευκή οينوποίηση η εκχύλιση είναι ελάχιστες φορές επιθυμητή.

Εν συντομία, στη λευκή οينوποίηση, η αλκοολική ζύμωση γίνεται χωρίς την ύπαρξη στεμφύλων, δηλαδή σε καθαρό γλεύκος. Ως πρώτο στάδιο είναι η μεταφορά των σταφυλιών στο σπαστήρα, όπου γίνεται απορραγισμός και σπάσιμο των ραγών. Έπειτα, μέσω αντλιών ο σταφυλοπολτός μεταφέρεται σε πιεστήρια, όπου εφαρμόζεται πίεση διαφορετικών εντάσεων και παραλαμβάνονται κλάσματα γλεύκους από διαφορετικές πιέσεις. Πριν την έναρξη της πίεσης γίνεται προσθήκη πρόσθετων, όπως ο θειώδης ανυδρίτης. Ακολουθεί η προζυμωτική απολάσπωση του γλεύκους με μεθόδους όπως η επίπλευση ή η στατική απολάσπωση. Στη συνέχεια, σε δεξαμενές ζύμωσης με ελεγχόμενη θερμοκρασία γίνεται ο εμβολιασμός του γλεύκους με τα επιθυμητά στελέχη ζυμών. Μόλις ολοκληρωθεί η ζύμωση το γλεύκος υποβάλλεται σε κατεργασίες διαύγασης και θείωσης, ώστε να είναι προστατευόμενο από οξειδώσεις. Τέλος, ακολουθεί φιλτράρισμα του οίνου και η εμφιάλωσή του. Αξίζει να αναφερθεί πως στη λευκή οينوποίηση δεν πραγματοποιείται παραμονή του γλεύκους με τα στέμφυλα, καθώς δεν είναι επιθυμητή η εκχύλιση φαινολικών ουσιών. Λίγες φορές γίνεται προζυμωτική εκχύλιση για μικρό χρονικό διάστημα, με σκοπό να εκχυλιστούν αρωματικά συστατικά από τη φλούδα στο γλεύκος.

Ορισμένα από τα στάδια της ερυθρής οينوποίησης είναι ίδια με αυτά της λευκής, ωστόσο υπάρχουν και τροποποιήσεις. Βασικό χαρακτηριστικό της ερυθρής οينوποίησης είναι η ζύμωση του γλεύκους ενώ σε αυτό υπάρχουν στέμφυλα, ώστε να ληφθούν τα επιθυμητά χρωστικά, γευστικά και αρωματικά συστατικά του φλοιού. Έτσι, μετά τον εκρραγισμό και την προσθήκη διαφόρων πρόσθετων, το γλεύκος μένει μαζί με τα

στέμφυλα σε δεξαμενές εκχύλισης στους οινοποιητές, όπου γίνεται έναρξη της ζύμωσης ενώ παράλληλα εκχυλίζονται τα συστατικά του φλοιού στο γλεύκος. Η εκχύλιση ενισχύεται με ανάδευση ή διαβροχή του μίγματος. Μόλις ολοκληρωθεί η αλκοολική ζύμωση και ληφθούν τα επιθυμητά φαινολικά χαρακτηριστικά του γλεύκους το γλεύκος περνάει από το πιεστήριο, όπου γίνεται διαχωρισμός του από τα στέμφυλα σε διαφορετικά κλάσματα ανάλογα με τις πιέσεις που εφαρμόζονται. Επόμενο βήμα είναι η μεταφορά σε δρύινα βαρέλια ή δεξαμενές. Ανάλογα με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος μπορεί να γίνει μηλογαλακτική ζύμωση, όπου το μηλικό οξύ μετατρέπεται σε γαλακτικό «μαλακώνοντας» έτσι την οξύτητα του οίνου. Για να μειωθεί η ένταση των τανινών και για την εξέλιξη του οίνου, συνήθως γίνεται και παλαιώσή του σε δρύινα βαρέλια, όπου το ξύλο συνεισφέρει στα αρώματα του οίνου και στη μικροξυγόνωσή του. Αφού ολοκληρωθούν τα παραπάνω βήματα γίνονται οι απαραίτητες κατεργασίες στον οίνο και αν κριθεί αναγκαίο φιλτράρεται πριν εμφιαλωθεί.

Εκτός από τα λευκά και τα ερυθρά κρασιά υπάρχουν και οι ροζέ οίνοι που παράγονται από ερυθρωπά ή κόκκινα σταφύλια με εφαρμογή του πρωτοκόλλου της λευκής οινοποίησης. Μια ακόμα κατηγορία οίνων είναι η παρασκευή αφρωδών οίνων. Βασικό χαρακτηριστικό της κατηγορίας αυτής είναι η ύπαρξη διοξειδίου του άνθρακα (CO<sub>2</sub>). Επικρατέστεροι τρόποι παραγωγής αφρωδών οίνων είναι η μέθοδος της Καμπανιάς (ή Tradicionale) και η μέθοδος των αυτόκλειστων δεξαμενών.

Για την παραδοσιακή μέθοδο παρασκευής αφρώδους οίνου, τα βήματα που ακολουθούνται είναι τα παρακάτω. Ο τρύγος γίνεται χειροκίνητα και ακολουθεί πίεση των σταφυλιών χωρίς να προηγηθεί εκραγισμός. Εφόσον ληφθούν τα επιθυμητά κλάσματα, γίνεται στατική απολάσπωση, με πηκτινολυτικά ένζυμα. Επόμενο βήμα είναι η πρώτη αλκοολική ζύμωση που έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ενός ήρεμου ξηρού οίνου, του οίνου βάσης. Ακολουθεί μηλογαλακτική ζύμωση του οίνου βάσης και έπειτα φυσικοχημική σταθεροποίηση αυτού. Αφού γίνει ανάμειξη διαφορετικών οίνων βάσης για να δημιουργηθεί η Cuvée, προστίθενται σάκχαρα και ένα εμβόλιο ζυμών. Το τελικό μείγμα εμφιαλώνεται σε γυάλινες φιάλες και τοποθετείται οριζόντια για να γίνει η δεύτερη αλκοολική ζύμωση, όπου θα δημιουργηθεί και ο αφρός. Υποχρεωτικό βήμα είναι η ωρίμανση του οίνου στις φιάλες μαζί με τις βιολογικές τους λάσπες, ώστε να πραγματοποιηθεί αυτόλυση των βιολογικών ζυμών. Σταδιακά οι φιάλες φέρονται σε κατακόρυφη θέση συγκεντρώνοντας έτσι τις οινολάσπες στο λαιμό της φιάλης. Μέσω αυτής της τεχνικής αργότερα με εφαρμογή βιομηχανικού ψύχους οι βιολογικές λάσπες θα εγκλειστούν σε ένα «παγάκι» και θα αποβληθούν από τη φιάλη. Τέλος, προστίθεται

ποσότητα σακχάρων με τη μορφή σιροπιού και ακολουθεί η εμφιάλωση και ο πωματισμός με φελλό και μεταλλική ασφάλεια.

Στη μέθοδο των αυτόκλειστων δεξαμενών τα στάδια είναι απλούστερα, όμως ορισμένα βήματα είναι ίδια με αυτά της παραδοσιακής μεθόδου. Πιο αναλυτικά, ο τρύγος μπορεί να γίνει είτε μηχανικά είτε χειροκίνητα. Η πίεση των σταφυλιών μπορεί να γίνει είτε έχοντας προηγηθεί εκρραγισμός είτε όχι. Ακολουθεί στατική απολάσπωση και έπειτα πραγματοποιείται η πρώτη αλκοολική ζύμωση για την παραγωγή του οίνου βάσης. Μετά γίνεται μηλογαλακτική ζύμωση και πλήρης φυσικοχημικής σταθεροποίηση του οίνου βάσης. Διαφορετικοί οίνοι βάσης αναμειγνύονται για τη δημιουργία της Cuvée, όπου προστίθενται σάκχαρα και εμβόλιο ζυμών. Στη συνέχεια το μίγμα μεταφέρεται σε αυτόκλειστες δεξαμενές πίεσεως για να πραγματοποιηθεί η δεύτερη αλκοολική ζύμωση. Η ωρίμανση σε αυτή την τεχνική είναι προαιρετική. Αφού ολοκληρωθούν όλα τα παραπάνω γίνεται προσθήκη σακχάρων με τη μορφή σιροπιού και γίνεται διήθηση εν ψυχρώ και εμφιάλωση με εφαρμογή αντιπίεσης.

### 1.2.2 Συστατικά οίνου

Ο οίνος είναι ένα σύνθετο μίγμα και αποτελείται από διάφορες ενώσεις, που παρατίθενται στον Πίνακα 1 (Waterhouse *et al.*, 2016).

Πίνακας 1. Σύνθεση ενός τυπικού ξηρού επιτραπέζιου οίνου

| Συστατικά Οίνου   | Περιεκτικότητα                            |
|-------------------|---|
| Νερό              | 85 - 89%                                  |
| Αιθανόλη          | 9-13%                                     |
| Γλυκερόλη         | 0,5-1,5%                                  |
| Οργανικά οξέα     | 0,6-1,0%                                  |
| Σάκχαρα           | 0,1-0,5%                                  |
| Πολυφαινόλες      | 0,1-0,2% (ερυθρός)<br>0,02-0,05% (λευκός) |
| Πολυσακχαρίτες    | 0,05 – 0,1%                               |
| Μέταλλα           | 0,05-0,2%                                 |
| Πτητικά Συστατικά | <0,001%                                   |

Όσον αφορά τις αζωτούχες ενώσεις του οίνου και του γλεύκους, αποτελούνται από ανόργανο άζωτο (ιόντα αμμωνίου) και οργανικό άζωτο (αμινοξέα, πεπτιδία και πρωτεΐνες) (Πίνακας 2). Από το σύνολο του οργανικού αζώτου υπολογίζεται ότι το 0,1-1% αποδίδεται σε πρωτεΐνες, 35,1% σε πολυπεπτιδία και 45,8% σε αμινοξέα.

Το άζωτο είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη των ζυμών, το οποίο χρειάζονται για αρκετές διεργασίες. Το αμμώνιο και τα ελεύθερα αμινοξέα αποτελούν την κύρια πηγή αζώτου κατά την αλκοολική ζύμωση, και το σύνολο αυτό ονομάζεται αφομοιώσιμο άζωτο (Yeast Assimilable Nitrogen, YAN).

Πίνακας 2. Συγκεντρώσεις κύριων αζωτούχων συστατικών σε γλεύκος και οίνο (Waterhouse et al., 2016)

|                                       | <b>Συγκέντρωση στο γλεύκος</b> |           |                 | <b>Συγκέντρωση στον οίνο (mg/L)</b> |
|---------------------------------------|--------------------------------|-----------|-----------------|-------------------------------------|
|                                       | mg/L                           | mg/L ως N | Συμβολή στο YAN |                                     |
| Αμμώνιο, NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> | 100 ± 45                       | 79 ± 35   | Ναι             | Χαμηλότερη από του γλεύκους         |
| α-αμινοξέα (εκτός Pro)                | 843 ± 51                       | 135 ± 51  | Ναι             | -                                   |
| Προλίνη (Pro)                         | Μέχρι 4000                     | Μέχρι 500 | Όχι             | Παρόμοιες με γλεύκος                |
| Γλουταθειόνη (κύριο ολιγοπεπτίδιο)    | 15 – 100                       | 3 – 15    | Ναι             | 0-27                                |
| Πρωτεΐνες                             | 20 - 250                       | 3 -15     | Όχι             | 30 - 275                            |

Στο γλεύκος το αμινοξύ που βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση είναι η προλίνη (έως 4000 mg/L) και ακολουθεί η αργινίνη, η βαλίνη και η αλανίνη.

## 2<sup>ο</sup> ΚΕΦΑΛΑΙΟ. Σύνθεση πεπτιδίων

Τα πεπτίδια είναι φυσικά βιολογικά μόρια. Βρίσκονται σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς και παίζουν βασικό ρόλο σε κάθε είδους βιολογική δραστηριότητα. Όπως οι πρωτεΐνες, τα πεπτίδια σχηματίζονται (συντίθενται) φυσικά από τη μεταγραφή μιας αλληλουχίας του γενετικού κώδικα, του DNA. Τα ενδογενή πεπτίδια παράγονται σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων, όπως νευρικά κύτταρα (εφαρμογή σε αναλγητικά) ή ανοσοκύτταρα (ρόλος στη φλεγμονή και αντιμικροβιακά), ή σε διάφορους αδένες σε όλο το σώμα, όπως η υπόφυση και τα επινεφρίδια.

Παρακάτω, γίνεται αναφορά στο πώς υπάρχουν φυσικά τα πεπτίδια στον οίνο, καθώς και στο πώς μπορεί να γίνει η σύνθεση πεπτιδίων εργαστηριακά.

### 2.1 Φυσική σύνθεση/παρουσία πεπτιδίων στον οίνο

Για την καλύτερη κατανόηση των πεπτιδίων είναι σημαντικό να αναφερθεί αρχικά ο τρόπος σύνθεσής τους, καθώς και τα δομικά τους χαρακτηριστικά. Τι είναι όμως αυτό που οδηγεί στο σχηματισμό των πεπτιδίων και πώς παράγονται; Τα περισσότερα πεπτίδια προέρχονται από ακατέργαστες πρωτεΐνες και μικροοργανισμούς. Γενικά τα πεπτίδια υπάρχουν ή προκύπτουν με βιολογικές διεργασίες από το ίδιο το μέσο. Αυτό επιτυγχάνεται κυρίως μέσω της υδρόλυσης των πρωτεϊνών της πρώτης ύλης και από αυτόλυση μικροοργανισμών που συμμετέχουν στη διαδικασία της ζύμωσης. Οι μικροοργανισμοί που εμφανίζονται στην οινοποίηση είναι υπεύθυνοι για το σχεδιασμό πεπτιδίων, όπου μέσω πρωτεολυτικών συστημάτων διασπούν τις πρωτεΐνες σε πεπτίδια και μέσω των συστημάτων μεταφοράς τους, μεταφέρουν πεπτίδια μέσα και έξω από τους οργανισμούς.

Μέσω της πρωτεόλυσης γίνεται αναφορά στο σύνολο των αντιδράσεων αποδόμησης των πρωτεϊνικών συμπλόκων, με τη διάσπαση να επιτυγχάνεται μέσω της υδρόλυσης των πεπτιδικών δεσμών. Στο διαχωρισμό των πρωτεϊνών σπουδαίο ρόλο διαδραματίζουν οι πρωτεάσες που παράγονται από στελέχη και συνεισφέρουν στο σχηματισμό των πεπτιδίων. Μέσω της κατανόησης του πρωτεολυτικού συστήματος δίνεται η δυνατότητα πρόβλεψης των πεπτιδικών προφίλ και τους βιολογικούς μηχανισμούς μικροοργανισμών που ενισχύουν τον σχηματισμό των πεπτιδίων οίνου. Γενικά η παρουσία πεπτιδίων στον οίνο καθορίζεται από μια λεπτή εξισορρόπηση μεταξύ του σχηματισμού τους κατά τη ζύμωση και της πρόσληψής τους από ορισμένους μικροοργανισμούς (Zhou M., et al,2021). Το ποσοστό απελευθέρωσης

πεπτιδίων σε ένα βαθμό εξαρτάται από το στέλεχος της μαγιάς. Ωστόσο, ορισμένα βακτηριακά στελέχη γαλακτικού οξέος έχουν δείξει πρωτεολυτική δράση σε συνθήκες οινοποίησης (Zhou M., et al, 2021).

Η πλειοψηφία των πολυπεπτιδίων του οίνου προέρχεται από το σταφυλοπολτό, ενώ υπάρχουν και ορισμένα που εμφανίζονται κατά τη διάρκεια των διαφορετικών σταδίων οινοποίησης. Συντίθενται κατά το σχηματισμό του σταφυλιού, το οποίο μπορεί να υποβληθεί σε περιορισμένη πρωτεόλυση στα τελευταία στάδια ωρίμανσης του σταφυλιού ή κατά την οινοποίηση, ώστε να παραχθούν ποικίλα πολυπεπτίδια οίνου. (B. Ferreira R. B., et al, 2001). Στους αφρώδεις και ερυθρούς οίνους παρατηρείται σύνθεση κατά την παλαίωση. Η πεπτιδική σύνθεση εξαρτάται από την ποικιλία του σταφυλιού και την οινοποιητική διαδικασία. Μελέτες δείχνουν πως το πρωτεϊνικό κλάσμα διαφέρει σε διαφορετικές ποικιλίες σταφυλιών, καταλήγοντας έτσι στο συμπέρασμα πως η ίδια πρωτεάση ζύμης οδηγεί σε διαφορετικά κλάσματα γλευκών, όταν οι ποικιλίες του γλεύκους διαφέρουν. Όπως αναφέρεται και παρακάτω τα πεπτίδια των αφρώδων οίνων διαχωρίζονται με HPLC αντίστροφης φάσης, δείχνοντας πως η απελευθέρωση και η αποδόμηση των πεπτιδίων του κρασιού μέσω ζυμομυκήτων συμβαίνει ταυτόχρονα. Μελέτη των Moreno-Arribas et al, 1998 έδειξε ότι τα πεπτίδια που μελετήθηκαν σε αφρώδεις οίνους από διαφορετικές ποικιλίες σταφυλιών, η παραγωγή των οποίων έγινε υπό τις ίδιες συνθήκες και με παλαίωση πάνω από 26 μήνες, δεν διέφεραν σημαντικά. Συνεπώς, η ποικιλία σταφυλιών δεν αποτελεί καθοριστικό παράγοντα της πεπτιδικής σύνδεσης των πεπτιδίων αφρώδους οίνου (Moreno-Arribas M.V, et al, 1998).

Οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί για τον προσδιορισμό προέλευσης, συγκέντρωσης και σύνθεσης πεπτιδίων κρασιού είναι πολύ λίγες. Όπως έχει προαναφερθεί τα πεπτίδια αποτελούνται από διαφορετικά αμινοξέα που συνδέονται μεταξύ τους με πεπτιδικούς δεσμούς. Ανεξάρτητα από την ποικιλία του κρασιού και με τη μέθοδο ανάλυσης που έχει εφαρμοστεί τα αμινοξέα που φαίνεται να ανιχνεύονται σε κάθε πεπτιδικό κλάσμα οίνου είναι το ασπαρτικό οξύ και/ή η ασπαριγίνη και το γλουταμινικό οξύ και/ή η γλουταμίνη. Τα αμινοξέα της προλίνης, σερίνης, θρεονίνης, αλανίνης και γλυκίνης εμφανίζονται στα περισσότερα πεπτιδικά κλάσματα, ενώ σε μικρότερο βαθμό έχουν μελετηθεί η λυσίνη, η τυροσίνη, η βαλίνη, η λευκίνη, η ιστιδίνη και η ισολευκίνη. Συνήθως σε πεπτίδια 2-10 αμινοξέων, τα αμινοξέα που εμφανίζονται συχνότερα είναι η τυροσίνη, η προλίνη και η ισολευκίνη. Επιπροσθέτως, εξαιτίας της πρωτεολυτικής δραστηριότητας σε κάθε οινοπαραγωγικό στάδιο μπορεί να ερμηνευτεί το ευρύ φάσμα των πεπτιδίων που συνυπάρχουν στον οίνο κάθε στιγμή (Moreno-Arribas and Polo, 2009, Chapter 6B).



## 2.2 Χημική σύνθεση πεπτιδίων

Με σκοπό να μελετηθούν πεπτίδια που υπάρχουν στη φύση, αλλά και να παραχθούν νέα παράγωγα με πιθανές βιολογικές δράσεις, υπήρξε η ανάγκη εύρεσης τρόπων σύνθεσής τους εργαστηριακά. Γενικά, η σύνθεση πεπτιδίων είναι μια διαδικασία αρκετά πολύπλοκη, που απαιτεί την διαδοχή πολλών σταδίων και σε συγκεκριμένες συνθήκες. Για την σύνθεση των πεπτιδίων υπάρχουν διαθέσιμες διαφορετικές τεχνολογίες: η χημική σύνθεση σε διάλυμα ή σε στερεό υπόστρωμα, η χρήση ενζυμικής τεχνολογίας, η χημική σύζευξη τμημάτων πεπτιδίων-μικρών πρωτεϊνών (chemical ligation), η παραγωγή από ανασυνδισμένο DNA, η παραγωγή σε συστήματα έκφρασης χωρίς κύτταρα, παραγωγή σε διαγονιδιακά ζώα και φυτά.

Το μέγεθος του μορίου καθορίζει την καταλληλότερη τεχνολογία που θα εφαρμοστεί. Η τεχνολογία του ανασυνδισμένου DNA προτείνεται για τη σύνθεση μεγάλων πεπτιδίων και πρωτεϊνών, με τυπικό παράδειγμα την παραγωγή της ινσουλίνης. Η χημική σύνθεση είναι η πιο συνηθισμένη μέθοδος για την παραγωγή μικρού και μεσαίου μεγέθους πεπτιδίων 5-80 υπολειμμάτων. Η εφαρμογή της ενζυματικής σύνθεσης φαίνεται να είναι πιο περιορισμένη και έχει δυνατότητα σύνθεσης πολύ μικρών πεπτιδίων, ακόμα και διπεπτιδίων και τριπεπτιδίων.

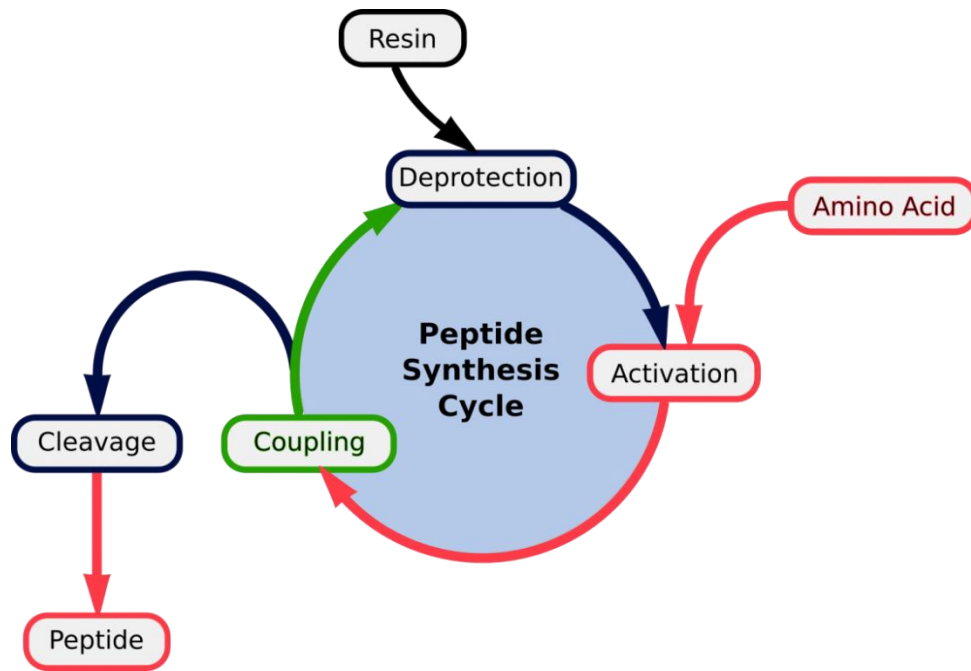
Συνήθως γίνεται συνδυασμός των δυο τελευταίων τεχνικών, ώστε να αξιοποιούνται κάθε φορά τα θετικά χαρακτηριστικά κάθε μεθόδου. Ως πιο συχνά εφαρμόσιμη και καλύτερη τεχνολογική επιλογή είναι η χημική μέθοδος, για τη σύνθεση πεπτιδίων μεσαίου μεγέθους παρά οι βιοτεχνολογικές μέθοδοι του ανασυνδισμένου DNA και της βιοκατάλυσης.

Η χημική σύνθεση των πεπτιδίων μπορεί να γίνει είτε σε διάλυμα είτε σε στερεά φάση. Η τεχνική της χημικής σύνθεσης σε διάλυμα πραγματοποιείται με όλα τα αντιδραστήρια και τα προϊόντα αντίδρασης να υπάρχουν στο μέσο, χρησιμοποιείται για τη σύνθεση μικρών πεπτιδίων. Η σύνθεση σε διάλυμα προηγήθηκε της σύνθεσης σε στερεή φάση, όμως αρκετά είναι τα μειονεκτήματα και οι δυσκολίες που παρουσιάζονται στην πορεία, καθώς σε κάθε βήμα της είναι αναγκαία η απομόνωση, ο καθαρισμός και η ταυτοποίηση των ενδιάμεσων προϊόντων σύνθεσης καθιστώντας την όλη διαδικασία επίπονη και χρονοβόρα. Αξίζει να αναφερθεί πως έχουν αναπτυχθεί και νέες στρατηγικές σύνθεσης σε διάλυμα, οι οποίες αφορούν το σχεδιασμό λειτουργικών ομάδων για τις πλευρικές αλυσίδες και τη συμπύκνωση θραυσμάτων με σκοπό τη σύνθεση μεγάλων μορίων (Perez Espitia P.J, et al, 2012).

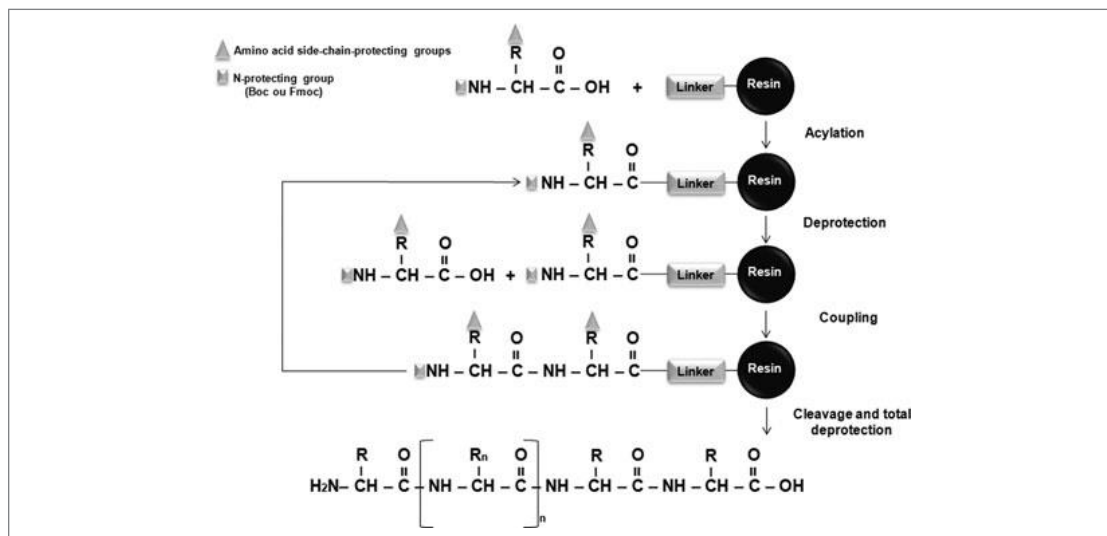
Το 1963 ο Merrifield εισήγαγε τη σύνθεση της στερεάς φάσης, (Solid Phase Peptide Synthesis, SPPS), μιας τεχνολογίας αρκετά σημαντικής μέχρι και σήμερα, με την οποία προσπεράστηκαν αρκετά προβλήματα σύνθεσης σε διάλυμα και με την οποία άνοιξε ο δρόμος για την ευρεία παρασκευή και μελέτη μεγάλου αριθμού πεπτιδίων, αλλά και μικρών πρωτεϊνών. Για την συνεισφορά του αυτή στον τομέα της πεπτιδικής χημείας ο Merrifield τιμήθηκε με το βραβείο Nobel Χημείας το 1985.

Στη χημική σύνθεση τα χημικά αντιδραστήρια χρησιμοποιούνται για την ενεργοποίηση του καρβοξυλίου του αμινοξέος, το οποίο μέσω πυρινόφιλης προσβολής θα ενωθεί με την α-αμινομάδα ενός άλλου αμινοξέος, προς δημιουργία του πεπτιδικού δεσμού. (Perez Espitia P.J, et al, 2012).

Με την τεχνική σύνθεσης σε στερεά φάση ή SPPS είναι δυνατό να παράγονται πεπτίδια σε μεγάλες ποσότητες πάνω σε στερεό υπόστρωμα αδιάλυτο στο μέσο αντίδρασης. Οι πεπτιδικές αλυσίδες που συνθέτονται σταθεροποιούνται σε ένα στερεό μέσο/μήτρα, από διαδοχικές προσθήκες αμινοξέων που συνδέονται με πεπτιδικούς δεσμούς μεταξύ της αμινομάδας του εισερχόμενου αμινοξέος και της καρβοξυλομάδας του αμινοξέος που έχει προηγουμένως δεσμευτεί στη μήτρα. Ακολουθεί μια επαναλαμβανόμενη διαδικασία μέχρι να συντεθεί το επιθυμητό μήκος της πεπτιδικής αλυσίδας (Guzmán F., et al, 2007). Το στερεό υπόστρωμα είναι μια πολυμερική ρητίνη που έχει μια λειτουργική ομάδα στην επιφάνειά του, που του επιτρέπει να σχηματίζει σταθερούς δεσμούς της πεπτιδικής αλυσίδας προς το αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται για την αποπροστασία της N-αμινομάδας. Γενικά η σύνθεση πεπτιδίων σε στερεά φάση συνίσταται στην ακυλίωση ενός αμινοξέος που θα συνδεθεί με ένα αδιάλυτο υπόστρωμα ρητίνης, μέσω ενός «μορίου-συνδέσμου» (linker). Μετά από αυτό η ομάδα προστασίας του αμινοτελικού άκρου αφαιρείται για να μπορέσει το επόμενο αμινοξύ της αλληλουχίας να συνδεθεί στο σύμπλοκο «πεπτίδιο linker – ρητίνη». Τέλος, χρησιμοποιείται αντιδραστήριο για την αποκοπή και απομάκρυνση του πεπτιδίου από τη ρητίνη, ενώ επίσης αφαιρεί τις προστατευτικές ομάδες πλευρικών αλυσίδων, που είναι σταθερές σε μη προστατευτικές συνθήκες της N-τερματικής ομάδας (Perez Espitia P.J, et al, 2012).



Εικόνα 2: Ο κύκλος σύνθεσης πεπτιδίου σε στερεά φάση. ([https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.antibodies-online.com%2Fresources%2F17%2F5034%2Fpeptide-synthesis-methods-and-reagents%2F&psig=A0vVaw1AiPwjVm22FpYZ33-5\\_Rch&ust=1686422756573000&source=images&cd=vfe&ved=0CBEQjRxqFwoTCKD81rzstv8CFQAAAAAdAAAAABAE](https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.antibodies-online.com%2Fresources%2F17%2F5034%2Fpeptide-synthesis-methods-and-reagents%2F&psig=A0vVaw1AiPwjVm22FpYZ33-5_Rch&ust=1686422756573000&source=images&cd=vfe&ved=0CBEQjRxqFwoTCKD81rzstv8CFQAAAAAdAAAAABAE))



Εικόνα 3. Σύνθεση πεπτιδίων στη στερεά φάση σχηματική απεικόνιση (Perez Espitia P.J., et al, 2012).

Όπως φαίνεται και στις Εικόνες 2 και 3, η σύνθεση πεπτιδίων σε στερεά φάση συνοπτικά απαιτεί τα ακόλουθα στάδια:

α) Επιλογή του κατάλληλου στερεού υποστρώματος (πολυμερούς) και συνήθως σύνδεση ενός ενδιαμέσου μορίου-συνδέσμου. Το πολυμερές θα πρέπει να έχει πλήθος ιδιοτήτων, όπως μηχανική αντοχή, ικανότητα διόγκωσης στους χρησιμοποιούμενους

διαλύτες, να γίνεται εύκολη διήθηση των υγρών, να είναι χημικά αδρανές και σταθερό σε συνθήκες σύνθεσης. Επίσης, να είναι προσιτό στους διαλύτες επιτρέποντας την διείσδυση των αντιδραστηρίων και την επιμήκυνση της πεπτιδικής αλυσίδας, να μην αλληλοεπιδρά με τη νεοσυντηθέμενη πεπτιδική αλυσίδα και να είναι ικανό να ενεργοποιείται κατάλληλα ώστε να περιέχει δραστικές ομάδες με τις οποίες θα μπορείς να συνδεθεί ομοιοπολικά η τελική καρβοξυλομάδα του C-τελικού αμινοξέος των υπό σύνθεσης πεπτιδικής αλυσίδας. Στο εμπόριο διατίθεται πλήθος πολυμερών για το σκοπό αυτό, με πιο διαδεδομένα τα πολυμερή πολυστυρενίου (π.χ. συμπολυμερές στυρενίου-διβινυλοβενζολίου (S-DVB) (Ευαγγέλου, MSc, 2001/PhD 2008).

β) Παροδική προστασία της α-αμινομάδας του κάθε υπό προσθήκη αμινοξέος με κατάλληλη ομάδα η οποία μειώνει την πυρηνοφιλία της και ταυτόχρονη παροδική προστασία των δραστικών ομάδων των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων, επειδή είναι δυνατόν να αντιδράσουν κατά τη διάρκεια της σύνθεσης προκαλώντας ανεπιθύμητα παραπροϊόντα. Συνήθως χρησιμοποιούνται δυο βασικά σχήματα προστασίας γνωστά ως Boc- και Fmoc- στρατηγική. Στην Boc-στρατηγική, χρησιμοποιείται η τριτοταγής βουτυλοκαρβονυλο-ομάδα (Boc) και συνδυάζεται με ομάδες τύπου βενζυλο (Bzl) για την προστασία των πλευρικών ομάδων των αμινοξέων (Guzmán F.,2007). Οι ομάδες Boc αφαιρούνται συνήθως με τριφθοροξικό οξύ (TFA), ενώ οι προστατευτικές ομάδες των πλευρικών αλυσίδων έχουν σχεδιαστεί ειδικά για να είναι σταθερές σε επαναλαμβανόμενους κύκλους αφαίρεσης Boc και αφαιρούνται με συγκεκριμένα αντιδραστήρια, σχετικά ισχυρότερα οξέα, όπως το υδροφθορικό οξύ HF (Perez Espitia P.J.,2012).

Στην Fmoc-στρατηγική, η ομάδα Fmoc (9-φλουορενυλομεθυλοκαρβονυλο-ομάδα) χρησιμοποιείται για την προστασία της N<sup>α</sup>-αμινομάδας και συνδυάζεται με τη χρήση της τριτ-βουτυλικής ομάδας για την προστασία των πλευρικών ομάδων των αμινοξέων (Guzmán F., et al, 2007). Κατά την Fmoc-στρατηγική τόσο η τελική αποκοπή του πεπτιδίου από την ρητίνη όσο και η απομάκρυνση της Fmoc-ομάδας γίνεται με χρήση μιγμάτων TFA, σε αντίθεση με την Boc-στρατηγική όπου γίνεται χρήση του τοξικού HF. Γενικά, υπερισχύει σε χρήση η Fmoc-στρατηγική σύνθεσης.(Perez Espitia P.J., et al, 2012).

γ) Ενεργοποίηση του καρβοξυλίου του N-τελικού αμινοξέος και ακολούθως σύζευξη με την ελεύθερη αμινομάδα του άλλου αμινοξέος προς σχηματισμό πεπτιδικού δεσμού. Για την ενεργοποίηση των καρβοξυλομάδων των αμινοξέων κατά την αντίδραση σύζευξης χρησιμοποιείται συνήθως η μέθοδος των καρβοδιιμιδίων (DIC) με παράλληλη προσθήκη αντιδραστηρίων όπως το υδροξυβενζοτρίαζόλιο (HOBt).

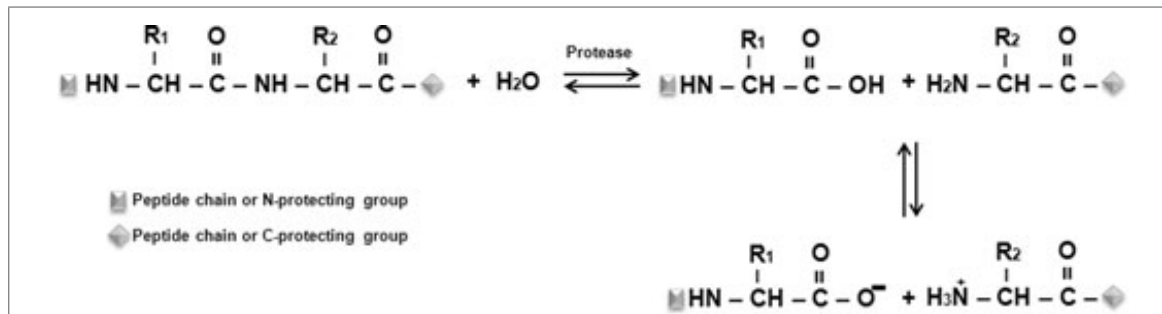
δ) Απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων, μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης, και αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη. Με την ολοκλήρωση της πεπτιδικής σύνθεσης πρέπει να γίνει διάσπαση του συμπαγούς στηρίγματος, όπου οι προστατευτικές ομάδες των πλευρικών αλυσίδων αφαιρούνται και το πεπτίδιο απελευθερώνεται. Η αφαίρεση αυτή γίνεται με τη χρήση ισχυρών οξέων που οδηγούν σε ανεπιθύμητες δευτερογενείς αντιδράσεις αλκυλίωσης σε ορισμένα αμινοξέα, που παράγονται από την απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων. Για να αποφευχθούν αυτές οι αντιδράσεις εφαρμόζονται συνδυασμοί διαλυτών που δρουν ως πυρινόφιλα και οξέων που επιτρέπουν τη διαδικασία προστασίας.

Συνοπτικά επομένως, για τη σύνθεση ενός πεπτιδίου σε στερεά φάση ως πρώτο βήμα απαιτείται η σύζευξη του C-τερματικού αμινοξέος της πεπτιδικής αλληλουχίας με τη στερεά μήτρα, έχοντας κατάλληλα προστατευμένη την Na-ομάδα του. Έπειτα γίνεται αποπροστασία της ομάδας αυτής (με TFA στη Boc-στρατηγική και με πιπεριδίνη στη Fmoc-στρατηγική) και προστίθεται προστατευόμενο στο επόμενο αμινοξύ. Τα στάδια αυτά της αποπροστασίας και σύζευξης επαναλαμβάνονται έως ότου γίνει η επιθυμητή σύνθεση αλληλουχίας. Στο τέλος το πεπτίδιο αποκόπτεται από τη ρητίνη και ταυτόχρονα οι προστατευτικές ομάδες των αμινοξέων αφαιρούνται και προκύπτει το πεπτίδιο είτε ως ελεύθερο οξύ είτε ως αμίδιο, αναλόγως με τη χημική φύση των λειτουργικών ομάδων στη στερεά μήτρα.

Η γλουταθειόνη είναι ένα τριπεπτίδιο του οίνου που έχει συντεθεί εργαστηριακά σε στερεά φάση και χρησιμοποιείται στην οινοποίηση (Soomets et al, 2005). Σε επόμενο κεφάλαιο γίνεται ιδιαίτερη αναφορά για το πεπτίδιο αυτό.

### **2.3 Ενζυμική σύνθεση πεπτιδίων**

Η τεχνική αυτή εφαρμόζεται για τη σύνθεση πεπτιδίων μικρού μήκους (2-8 αμινοξέων) και στη συμπύκνωση μεγάλων πεπτιδικών θραυσμάτων. Τα θετικά γνωρίσματα αυτής της τεχνικής είναι η καλή στερεοεκλεκτικότητα και η τοποεπιλεκτικότητα. Όμως, υπάρχουν κάποια αρνητικά χαρακτηριστικά, τα οποία είναι η δυσμενής θερμοδυναμική σύνθεση των πεπτιδίων στο νερό και η δευτερογενής υδρόλυση συνθετικών πεπτιδικών αλυσίδων που εμποδίζει τη χρήση τους στη πεπτιδική σύνθεση μεγάλων αλληλουχιών (Perez Espitia P.J., et al, 2012).



Εικόνα 4 Ενζυμική διάσπαση πρωτεΐνης προς σχηματισμό μικρότερων πεπτιδίων (Perez Espitia P.J., et al, 2012).

Κατά την ενζυματική σύνθεση των πεπτιδίων χρησιμοποιούνται οργανικοί διαλύτες ως μέσω αντίδρασης. Η σύνθεση δι- και τριπεπτιδίων παραμένει περιορισμένη με μικρές προσπάθειες να έχουν πραγματοποιηθεί για τη σύνθεση βιοδραστικών ολιγοπεπτιδίων, συγκριτικά με τα συμβατικά υδατικά συστήματα.

Συγκρίνοντας τους δυο τρόπους σύνθεσης πεπτιδίων που αναφέρθηκαν, τον χημικό και τον ενζυμικό, υπάρχουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα σε κάθε περίπτωση. Στη χημική σύνθεση στερεάς φάσης το πλεονέκτημα είναι πως το πεπτιδικό προϊόν μπορεί να διαχωριστεί εύκολα από παραπροϊόντα, αλλά υπάρχει το μειονέκτημα να πραγματοποιηθούν πιθανές αντιδράσεις ρακεμείωσης κατά τη διάρκεια της σύνθεσης, είναι απαραίτητη η προστασία των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων αυξάνοντας έτσι το κόστος των υποστρωμάτων και μειώνοντας την απόδοση ανάκτησης προϊόντων κατά την αποπροστασία. Παρόλα αυτά η χημική σύνθεση αποτελεί την καταλληλότερη τεχνολογία για πεπτίδια μεσαίου μεγέθους (έως 100 υπολείμματα), τα οποία απαντώνται στα περισσότερα πεπτίδια θεραπευτικής σημασίας.

Από την άλλη πλευρά, τα ένζυμα είναι ασταθείς καταλύτες και η μηχανική διαδικασία των αντιδράσεων αυτών απαιτεί προσεκτικό σχεδιασμό. Αυτό συνεπάγεται βελτιστοποίηση των σχετικών λειτουργικών παραμέτρων, όπως το pH, η θερμοκρασία, η οργανική συγκέντρωση διαλύτη και τέλος η αξιολόγηση της δραστηριότητας και σταθερότητας του βιοκαταλύτη υπό συνθήκες λειτουργίας. Η ενζυμική σύνθεση είναι λιγότερο ανεπτυγμένη τεχνολογία συγκριτικά με τη χημική. Ένας ακόμα περιορισμός της ενζυμικής σύνθεσης είναι το μέγεθος του πεπτιδίου. Ενζυμικά έχουν συντεθεί μόνο μικρά πεπτίδια με λιγότερα από 10 υπολείμματα και αυτά με μέτρια επιτυχία.

Συνοψίζοντας, ως πιο εφαρμόσιμη τεχνική θεωρείται η χημική σύνθεση στερεάς φάσης και είναι κατάλληλη για τη σύνθεση μεσαίου μεγέθους πεπτίδια. Ένας πιθανός συνδυασμός αυτών των δύο θα επιφέρει καλύτερα αποτελέσματα, καθώς οι θετικές

ιδιότητες κάθε τεχνολογίας μπορούν να χρησιμοποιηθούν συνδυαστικά για την επίτευξη του σκοπού (Guzmán F., et al, 2007).

## 3<sup>ο</sup> ΚΕΦΑΛΑΙΟ. Πεπτίδια στον Οίνο - Ρόλος στην οينوποίηση

### 3.1 Συμβολή των πεπτιδίων ως πηγή αζώτου

Η ύπαρξη των πεπτιδίων στην οينوποιητική διαδικασία είναι αδιαμφισβήτητη. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον για μελέτη παρουσιάζει ο ρόλος τους σε αυτή. Οι κύριες ενώσεις του αζωτούχου κλάσματος του κρασιού είναι τα ελεύθερα αμινοξέα, πρωτεΐνες, ιόντα αμμωνίου αλλά και τα πεπτίδια. Όπως έχει προαναφερθεί τα πεπτίδια είναι αζωτούχες ενώσεις, επομένως συνεισφέρουν κατά ένα ποσοστό στην ποσότητα του αζώτου που θα αφομοιωθεί από τις ζύμες. Το άζωτο είναι απαραίτητο θρεπτικό συστατικό κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του κρασιού. Αυξάνει την παραγωγή βιομάζας και διεγείρει το ρυθμό κατανάλωσης των σακχάρων από τους ζυμομύκητες. Από την άλλη, η έλλειψη του μπορεί να προκαλέσει κολλημένες ή υποτονικές ζυμώσεις. Ήδη από την πρώτη ύλη (σταφύλι) παρατηρείται ύπαρξη αζωτούχων ενώσεων και η περιεκτικότητά τους αυξάνεται με την ωρίμανση. Κατά τη συγκομιδή το 70% του οργανικού αζώτου αποτελείται από αμινοξέα, 3% από πρωτεΐνες και 2% από πεπτίδια. Ταυτόχρονα με ενζυματικές διεργασίες, οι ζυμομύκητες αποικοδομούν τις πρωτεΐνες σε πεπτίδια και σε αμινοξέα μέχρι να ολοκληρωθεί η ζύμωση (Wine Chemistry And Biochemistry, 2009). Κατά μέσο όρο η συγκέντρωση σε αζωτούχες ενώσεις που υπάρχουν στο κρασί είναι περίπου 120mg/l εκ των οποίων κατά προσέγγιση το 45,8% είναι ελεύθερα αμινοξέα, το 35,1% είναι πεπτίδια και το 0,1-1% είναι πρωτεΐνες. Γενικά τα πεπτίδια αντιπροσωπεύουν το 1/3 του ολικού αζώτου. Ωστόσο, η έρευνα πάνω σε αυτά είναι δύσκολη λόγω χαμηλής ποσότητας πεπτιδίων και λόγω παρουσίας και άλλων ουσιών, όπως πολυφαινόλες, σάκχαρα, οξέα μαζί με πρωτεΐνες και αμινοξέα (Zhou M., et al., 2021).

Το γλεύκος των σταφυλιών αποτελείται από πολλά θρεπτικά συστατικά απαραίτητα για την αλκοολική ζύμωση, σε αυτά εντάσσεται και το άζωτο. Το άζωτο στο μούστο υπάρχει με διάφορες μορφές, οι οποίες είναι: πρωτεΐνες, ελεύθερα αμινοξέα, πεπτίδια και αμμωνιακά ιόντα. Οι δυο πρώτες μορφές είναι και οι πιο μελετημένες, διότι αφομοιώνονται εύκολα από τη μαγιά, σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθεί πως τα μικρά πεπτίδια (<1kD) που υπάρχουν στο μούστο μπορούν να αντιπροσωπεύουν έως και το 10% του αφομοιώσιμου αζώτου. Ενώ, το κλάσμα του ολιγοπεπτιδίου αποτελεί το 17% του ολικού αζώτου. Στη ζύμωση του κρασιού η αφομοίωση των ολιγοπεπτιδίων μπορεί να οδηγήσει στην απελευθέρωση ορισμένων



αμινοξέων που στη συνέχεια καταναλώνονται μετά την εξάντληση των άλλων πηγών αζώτου (Becerra-Rodríguez et al, 2020). Επιπλέον, πειράματα σε συνθετικά μέσα που περιέχουν αμμωνία και ελεύθερα αμινοξέα που έχουν προκύψει από υδρόλυση ζύμης έχουν δείξει ότι το άζωτο που παρέχεται από πεπτίδια αποτελεί τελικά το 40% του κλάσματος πρωτεΐνης ζύμης κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης. Το γεγονός αυτό υπογραμμίζει τον σημαντικό αναβολικό ρόλο των ολιγοπεπτιδίων έναντι σε άλλες πηγές αζώτου, όπως το αμμώνιο που συνεισφέρει μόνο 20% αυτού του κλάσματος.

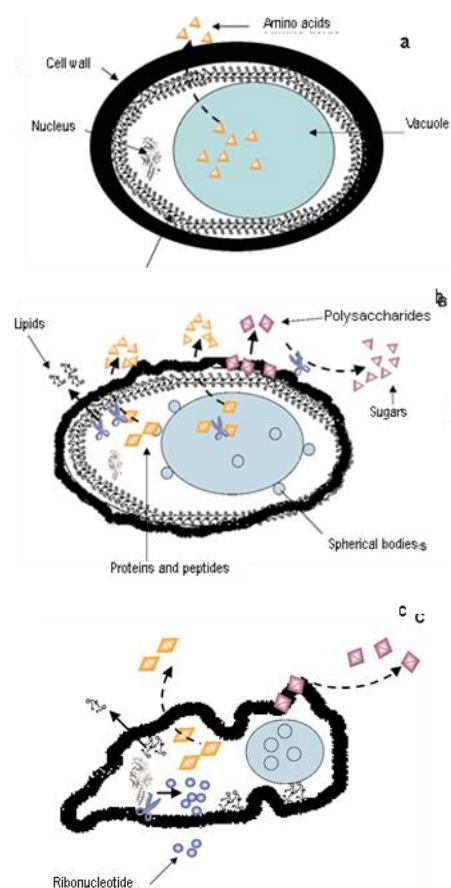
Αν και δεν έχει πραγματοποιηθεί πληθώρα ερευνών σχετικά με τα παραπάνω, είναι γνωστό πως μπορεί να γίνει αφομοίωση, καθώς στη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* (*S.c*), υπάρχουν διαφορετικοί μικροί μεταφορείς πεπτιδίων. Ως παράδειγμα έχουν εντοπιστεί δυο μεταφορείς δι- και τρι-πεπτιδίων κωδικοποιημένοι από τα γονίδια PTR2 και DAL5 και δυο μεταφορείς τέτρα- και πεντα-πεπτιδίου που κωδικοποιούνται από το OPT1 (είναι και μεταφορέας της γλουταθειόνης) και το OPT2. [Ένας μεγάλος αριθμός δειγμάτων κρασιού έχει αποκτήσει μέσω οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων, το γονίδιο FOT1-2, που εμπλέκονται στην πρόσληψη πεπτιδίων έως και 9 αμινοξέων, επεκτείνοντας τον αριθμό και τη φύση των μεταφερόμενων ολιγοπεπτιδίων] (Duc C., et al, 2020). Οι ζύμες κατά προτίμηση χρησιμοποιούν ολιγοπεπτίδια που οδηγούν στη μελλοντική χρήση των ελεύθερων αμινοξέων στο γλεύκος. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί πως η παρουσία ολιγοπεπτιδίων μειώνει τη διάρκεια της ζύμωσης, λόγω του υψηλότερου μεγίστου του ρυθμού ζύμωσης.

Αξιόλογο στοιχείο αναφοράς είναι πως στις φυσικές ζυμώσεις γλεύκους σταφυλιών με *Saccharomyces cerevisiae* οι μεταφορείς FOT έχουν ένα ευρύτερο φάσμα χρήσεων ολιγοπεπτιδίων σε σύγκριση με τα στελέχη που δεν είναι FOT, οδηγώντας σε υψηλότερη παραγωγή βιομάζας και καλύτερη απόδοση ζύμωσης (Becerra-Rodríguez C., et al, 2020).

Γενικά, η γνώση σχετικά με τον τρόπο λειτουργίας των διαφόρων μεταφορέων πεπτιδίων έχει προέλθει από πειράματα που γίνεται χρήση πεπτιδίων συνθετικής φύσης ως μοναδική πηγή αζώτου. Μέσω του τρόπου αυτού παρέχονται πληροφορίες για την ικανότητα των στελεχών ζύμης να αφομοιώνουν τα επιλεγμένα πεπτίδια. Αντιθέτως όμως δεν πληροφορούν για την κινητική των πεπτιδίων στα διάφορα στάδια της ζύμωσης σε πολύπλοκα μέσα πλούσια σε πεπτίδια, όπως ο μούστος (Arju G., et al, 2022).

Η διαδικασία της ζύμωσης εξελίσσεται σε διάφορα στάδια. Κατά το πρώτο στάδιο τα πεπτίδια αφομοιώνονται από τη ζύμη μαζί με τα ελεύθερα αμινοξέα. Κατά το τέλος της ζύμωσης απεκκρίνονται ελεύθερα αμινοξέα και μικρά πεπτίδια από τη μαγιά

στο κρασί. Η διαδικασία αυτή παρατηρείται και κατά τη διάρκεια της δεύτερης ζύμωσης που πραγματοποιείται στην περίπτωση των αφρώδων οίνων. Κατά το στάδιο μετατροπής του μούστου σε κρασί υπάρχει μείωση στο άζωτο που οφείλεται στην ύπαρξη αμινοξέων και πεπτιδίων. Ακόμα, οι διακυμάνσεις στις τιμές περιεκτικότητας σε πεπτιδικό άζωτο κατά τη διάρκεια της παλαίωσης πιθανώς είναι λόγω της αυτόλυσης της μαγιάς και της απόδοσής της σε ελεύθερα αμινοξέα (Moreno-Arribas V., et al, 1996).



**Εικόνα 5.** Σχηματική απεικόνιση της αυτόλυσης των ζυμών σε αφρώδεις οίνο, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση πεπτιδίων (HERVÉ A. and GUILLOUX-BENATIER M, 2006)

Η παλαίωση με μαγιά είναι μια διαδικασία που παρατηρείται τόσο σε ερυθρούς οίνους που παραμένουν με τις οινολάσπες, είτε σε αφρώδεις οίνους που μένουν με τη μαγιά για την πραγματοποίηση της δεύτερης ζύμωσης. Έτσι λοιπόν, προκύπτει πως η διαφορά μεταξύ της συνολικής περιεκτικότητας του αζώτου και του συνόλου των ελεύθερων νιτρικών με πολυπεπίδια και πρωτεΐνες δείχνει πως πάνω από το 80% του αζώτου που απελευθερώνεται αντιστοιχεί σε πεπτίδια μικρού μεγέθους. Συνοψίζοντας, λαμβάνοντας υπόψιν την πειραματική πορεία που αναφέρθηκε στη μελέτη Martínez-

Rodríguez AJ., et al, 2000 προκύπτει ότι κατά την αυτόλυση απελευθερώνονται εκτός από αμινοξέα και ενώσεις αζώτου αλλά και πολυπεπίδια με Mr 16.900 και 11.000 και άνω, και πεπίδια με Mr μικρότερο από 10.000. Αυτές οι ενώσεις μετασχηματίζονται με το χρόνο σε μικρότερα πεπίδια από τα ένζυμα, τα οποία μπορούν να τροποποιήσουν την ποιότητα του κρασιού (κατά τη διάρκεια της ζύμωσης), καθώς μια από τις ιδιότητές τους είναι και η εμφάνιση γλυκών και πικρών γεύσεων (Martínez-Rodríguez AJ., et al, 2000).

Λαμβάνοντας υπόψιν ότι η ζύμωση του γλεύκους μπορεί να περιέχει περισσότερα από ένα στελέχη ζυμομυκήτων, είναι πιθανό να γίνεται και διαφορετική κατανάλωση των αμινοξέων ανάλογα με το κάθε στέλεχος. Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε μεταξύ τριών στελεχών μη *Saccharomyces* (*Saccharomyces bacillaris*, *M.pulcherrima*, *Pichia membranifaciens*) και ενός *Saccharomyces Cereviciae*, σε μικτή ζύμωση, η ανάλυση του αφομοιώσιμου αζώτου (Yeast Assimilable Nitrogen, YAN) έδειξε ότι οι συγκεκριμένοι μη *Saccharomyces* έχουν συγκεκριμένο προφίλ κατανάλωσης αμινοξέων, καθώς η κυστεΐνη φαίνεται να προτιμάται ως πηγή αζώτου για όλους τους μη *Sccharomyces*. Αντιθέτως, σε άλλα αμινοξέα δεν δείχνουν όλες την ίδια προτίμηση κατανάλωσης, όπως είναι η ιστιδίνη, η μεθειονίνη, η θρεονίνη και η τυροσίνη που δεν καταναλώθηκαν από το *S.bacillaris*. Επίσης, αργή αφομοίωση ασπαρτικού οξέος παρατηρήθηκε από το *M. membranifaciens* (Comitini F., et al, 2021). Επομένως συμπεραίνουμε πως τα πεπίδια καταναλώνονται ως πηγή αζώτου και από στέλεχη *Saccharomyces* αλλά και από μη *Saccharomyces*.

Σε περίπτωση που μετρήσεις στον μούστο δείχνουν απουσία της απαραίτητης συγκέντρωσης αζώτου για την ανάπτυξη των ζυμομυκήτων, είναι απαραίτητη η προσθήκη θρεπτικών συστατικών. Μερικές φορές για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται και αυτολύματα ζύμης, που είναι πλούσια σε ελεύθερα αμινοξέα και πεπίδια. Κάθε στέλεχος ζύμης αφομοιώνει διαφορετικά συστατικά οπότε πρέπει να γίνει σωστή επιλογή του θρεπτικού υλικού για να επέλθουν τα βέλτιστα αποτελέσματα. Για τον πιο κοινό ζυμομύκητα τον *Saccharomyces* είναι γνωστό πως μπορεί να εσωτερικεύσει πεπίδια διαφορετικών μεγεθών μέσω πολλαπλής μεμβράνης μεταφοράς πεπτιδίων. Η μεταφορά δι- και τριπεπτιδίων διευκολύνεται από τα PTR2, Dal5p και μεταφορείς ολιγοπεπτιδίων μυκήτων (Fot1-3p) που υπάρχουν στη ζύμη.

### 3.2 Ο ρόλος των πεπτιδίων στις φυσικοχημικές ιδιότητες και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου

Εκτός από τη συνεισφορά των πεπτιδίων ως πηγή αζώτου των ζυμομυκήτων, έχει βρεθεί ότι συμβάλουν και στις φυσικοχημικές ιδιότητες του και τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά. Για παράδειγμα, πεπτίδια έχουν βρεθεί πως συμβάλλουν στις επιφανειοδραστικές και αισθητικές ιδιότητες του οίνου, καθώς φαίνεται να ευθύνονται για τις ποιοτικές διαφορές στα κρασιά και επηρεάζουν την όσφρηση, την οπτική εικόνα (χρώμα) και τη γεύση του κρασιού, όπως είναι η γλυκύτητα, η πικράδα (Πίνακας 3). Ορισμένα παραδείγματα πεπτιδίων που απομονώθηκαν από λευκό κρασί και επηρεάζουν τη γεύση είναι τα πεπτίδια IV, VI, FRR και SKTSPY με πικρή γεύση, το FK με όξινη αίσθηση και το KMN που προσδίδει αλμυρή αίσθηση (Zhou M., et al, 2021).

Οι πεπτιδικές ενώσεις μπορούν να παραχθούν εξωγενώς και αργότερα να ενσωματωθούν στη διαδικασία οινοποίησης ή να προσληφθούν απευθείας από το *S.c.*, από το μέσο ζύμωσης μετά την απελευθέρωσή τους μέσω λύσης ζυμομυκήτων μη *Saccharomyces*, έπειτα από διαδοχικές ζυμώσεις. Οι ουσίες αυτές ιδίως στα ερυθρά κρασιά μπορούν να προσφέρουν βελτίωση στο σώμα και στο στόμα, τη γλυκύτητα και τη στρογγυλότητα, την αρωματική αντοχή και την πρωτεϊνική και τρυγική σταθερότητα των οίνων. Ακόμα αλληλοεπιδρούν με τις τανίνες και μειώνουν τη στυπτικότητα των κρασιών και παράλληλα συνεισφέρουν με αντιοξειδωτικές δράσεις προστατεύοντας από οξειδώσεις και αλλοιώσεις. Η κατηγορία των πεπτιδικών ενώσεων που περιέχουν S και N, όπως είναι η γλουταθειόνη και άλλα πεπτίδια, έχουν το ρόλο αναγωγικών σε πολλές αντιδράσεις οξειδωσης και δρουν κατά της τοξικότητας των βαρέων μετάλλων και της οξειδωσης των λιπιδίων και των πολυφαινολών. Ασπίδα προστασίας αποτελεί και για τις αρωματικές ενώσεις και τις ανθοκυάνες, επιτρέποντας με αυτό τον τρόπο τη διατήρηση του αντιοξειδωτικού και αντιφλεγμονώδους δυναμικού τους. Ένας ακόμα ρόλος που τα χαρακτηρίζει είναι η αλληλεπίδρασή τους με τριτογενείς αρωματικές ενώσεις έχοντας ως επακόλουθο την μείωση της αντίληψης των ξυλωδών αρωμάτων σε κρασιά μακράς παλαιώσης. Επίσης ενθαρρύνουν τη μηλογαλακτική ζύμωση, μια διεργασία που με τη βοήθεια των γαλακτικών βακτηρίων μειώνουν τη συγκέντρωση του μηλικού οξέος, μαλακώνοντας έτσι την οξύτητά του. Η δευτερογενής αυτή ζύμωση επωφελείται από τα πεπτίδια, καθώς τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος χρησιμοποιούν μέρος του πεπτιδίου ως πηγή αζώτου (Vejarano R., 2020).

Η συνεισφορά τους έχει και συνέχεια, διότι προσροφούν ανεπιθύμητες και επικίνδυνες ενώσεις, όπως η ωχρατοξίνη Α (ΟΤΑ), ενώ στα αφρώδη κρασιά βελτιώνουν την ποιότητα του αφρού (Vejarano R., 2020). Πρόσφατα αναφέρθηκε πως διπεπτίδια έχουν συμβάλει στην αντιληπτή ποιότητα του εμπορικού Pinot Noir, και στα κρασιά Chardonnay συμβάλουν οι ενώσεις που περιέχουν S και N (Sáez V., et al, 2021).

Μια εξίσου σημαντική δράση των πεπτιδίων στην οινοποιητική διαδικασία είναι η μυκητοκτόνος δράση τους έναντι σε μύκητες που προσβάλλουν και αλλοιώνουν ποιοτικά το κρασί. Έτσι, τα αντιμικροβιακά πεπτίδια (Antimicrobial peptides, AMPs) είναι πεπτίδια χαμηλής μοριακής μάζας με αμφιπαθητικά χαρακτηριστικά και μπορούν να επηρεάσουν την ανάπτυξη αρκετών μικροοργανισμών μέσω της διαπερατότητας της πλασματικής μεμβράνης και αυξάνοντας τα ενεργά είδη οξυγόνου. Σε μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί έχουν δείξει πως ο μύκητας *Candida intermedia* LAMAP1790 μπορεί να παράξει αντιμικροβιακά πεπτίδια με μυκητοκτόνο δράση κατά του *Brettanomyces bruxellensis*, χωρίς να επηρεάζει τη ζύμη του *S.c*. Ωστόσο, δεν είναι ακόμα αποδεδειγμένο εάν αυτά τα πεπτίδια παρουσιάζουν βιοελεγκτική δράση σε αυτό το ζυμομύκητα ή και σε άλλους ζυμομύκητες αλλοίωσης. Στη μελέτη των Pena et al, 2020, προσδιορίστηκε ότι η έκθεση του *B. bruxellensis* σε πεπτίδια χαμηλής μάζας που περιέχονται στο υπερκείμενο καλλιέργειας του *C. intermedia* LAMAP1790 παράγει μια συνεχής αύξηση του ενεργού οξυγόνου (Reactive Oxygen Species ROS), χωρίς να παρατηρείται σημαντική επίδραση βλάβης της μεμβράνης. Μέσω αυτών των παρατηρήσεων δίνεται μια προσέγγιση στον αντιμυκητιακό μηχανισμό. Όλη η παραπάνω έρευνα βασίζεται σε εργαστηριακές μελέτες που αποδεικνύουν την συνεισφορά που θα μπορούσαν τα πεπτίδια να έχουν στη διαδικασία της οινοποίησης, ώστε να αντιμετωπιστεί ένας σοβαρός κίνδυνος αλλοίωσης από τους μύκητες. Στις αλληλεπιδράσεις μαγιάς-ζύμης κατά την αλκοολική ζύμωση το στέλεχος *S.c* CCM11885 παράγει αντιμυκητιακά πεπτίδια που ονομάζονται σακχαρομυκίνη και προκαλεί διαταραχή της κυτταρικής μεμβράνης και εσωτερικήυση των πεπτιδίων από τα *Hanseniaspora guilliermondii* και *B. Bruxellensis* (Peña, R., et al, 2020). Η σακχαρομυκίνη προέρχεται από το γλυκολυτικό ένζυμο γλυκεραλδεΰδη 3-φωσφορική αφυδρογονάση (GAPDH) και παρουσιάζει ευρέως φάσμα δράσης. Επίσης, παρουσιάζουν ενδιαφέρουσες αντιμυκητιακές ιδιότητες εναντίον των *H.guilliermondii*, *Kluyveromyces marxianus*, *L. thermotolerans* και *T.delbrueckii*. Αυτά τα AMPs έδειξαν αποτελεσματική αντιμικροβιακή δράση στο κρασί κατά δύο στελέχη *P. guilliermondii* και *B. bruxellensis* έχουν αρκετά καλή εφαρμογή και αποτελούν μια νέα μέθοδο βιοελέγχου των αλλοιωμένων ζυμών (Comitini F, et al, 2021).

Στην έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους Camille Duc et al, 2020, έγινε σύγκριση στο πως επιδρά η προσθήκη μιας κλασικής πηγής αζώτου με αυτή της προσθήκης πεπτιδίου τόσο σε κόκκινο όσο και λευκό γλεύκος που ζυμώθηκε με 18 στελέχη του *Saccharomyces cerevisiae* . Προέκυψε πως οι ανώτερες αλκοόλες που εξετάστηκαν παρήχθησαν σε μικρότερες ποσότητες με εξαίρεση την προπανόλη. Επίσης, με την παρουσία πεπτιδίων η 2-φαινυλαιθανόλη υποπαρήχθη, η συγκεκριμένη αλκοόλη παράγεται μέσω της οδού της φωσφορικής πεντόζης, η οποία οδηγεί σε υψηλή παραγωγή NADPH. Επίσης, η υπερπαραγωγή προπανόλης παρουσία πεπτιδίων φανερώνουν ότι η προπανόλη μπορεί να θεωρηθεί δείκτης ποιότητας και διαθεσιμότητας αζώτου. Αποδεδειγμένα από τη συγκεκριμένη μελέτη Duc, C., et al, 2020, με την παρουσία ολιγοπεπτιδίων προκαλείται μείωση της διάρκειας της ζύμωσης, λόγω του υψηλότερου μεγίστου ρυθμού ζύμωσης. Ακόμα, προέκυψαν διαφορές στη σύνθεση των ενώσεων που συνδέονται με τον κεντρικό μεταβολισμό του άνθρακα ή τα αρώματα (κυρίως αιθυλεστέρες) που υποδηλώνουν πως η προσθήκη πεπτιδίου προκαλεί σημαντικές αλλαγές στη διαχείριση της ενδοκυτταρικής δεξαμενής του NADPH (Duc, C., et al, 2020).

## 4<sup>ο</sup> ΚΕΦΑΛΑΙΟ. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ

### 4.1 Πεπτίδια που έχουν ανιχνευτεί σε σταφύλια και οίνους

Η προέλευση και ανίχνευση των πεπτιδίων είναι απαραίτητη προϋπόθεση για τη μελέτη τους και εξίσου σημαντική είναι η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός καθενός πεπτιδίου που ανιχνεύεται, ώστε να μελετηθεί η αλληλουχία του, η προέλευσή του και η συνεισφορά του. Ανάλογα με τις κατηγορίες των οίνων γίνεται η αντίστοιχη κατηγοριοποίηση των πεπτιδίων. Σε αυτό το σημείο πρέπει να σημειωθεί πως μπορούν να υπάρξουν κοινά πεπτίδια σε διαφορετικές κατηγορίες οίνου. Οι κατηγορίες που μελετώνται είναι οι λευκοί και ερυθροί οίνοι, τα αφρώδη κρασιά, ενώ σε μια ειδική κατηγορία κατατάσσονται οι οινολάσπες και προϊόντα αυτόλυσης.

Κατά την παραγωγή λευκών οίνων χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή, ώστε να προκύψει ένα άρτιο προϊόν, χωρίς οπτικές και γευστικές αλλοιώσεις. Η ύπαρξη των πεπτιδίων μπορεί να συμβάλλει σε αυτή την περίπτωση, λόγω των ιδιοτήτων που τα χαρακτηρίζουν.

Σε λευκούς οίνους για παράδειγμα έχουν ανιχνευθεί μικρού μοριακού βάρους πεπτίδια, τα οποία συνεισφέρουν στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου: που δίνουν πικρή γεύση IV, VI, FRR και SKTSPY, αλμυρή γεύση KMN και ξινή γεύση FK. Σε περαιτέρω ανάλυση ορισμένα από αυτά έδωσαν παραπάνω πληροφορίες για τη συμβολή τους. Πιο ειδικά το διπεπτίδιο IV, θεωρείται ως το πεπτίδιο που διεγείρει την πρόσληψη γλυκόζης. Επίσης το VI αναγνωρίστηκε ως ο ανθρώπινος αναστολέας της διπεπτιδυλικής πεντάσης IV ή αναστολέας DPPIV, που αποτελεί μέσο για τη θεραπεία του διαβήτη τύπου 2. Υπάρχει η πεποίθηση πως μια μέτρια κατανάλωση κρασιού μπορεί να δράσει ενάντια στο διαβήτη τύπου 2 (Zhou M, et al, 2021). Η πικρή γεύση των πεπτιδίων εξισώνεται με τη μέση υδροφοβία των συστατικών των αμινοξέων. Στο λευκό κρασί υπάρχουν αρκετά υδρόφοβα πεπτίδια που είναι πικρά (Gawel R, et al, 2018).

Από ένα λευκό κρασί απομονώθηκε ένα τριπεπτίδιο Lys-Met-Asn, που δίνει γεύση umami. Η γεύση αυτή δεν έχει περιγραφεί ως τυπική γεύση οίνου και έτσι η πραγματική συνεισφορά αυτού του πεπτιδίου στο κρασί δεν έχει απόλυτα τεκμηριωθεί, λόγω της μη ποσοτικοποίησης και του μη καθαρισμού του κατωφλιού αντίληψης (SÁENZ-NAVAJAS M.-P., et al, 2012). Σε λευκούς οίνους έχει ανιχνευτεί και γλουταθειόνη (GSH), η οποία φαίνεται να αυξάνει τη ελαιώδη αίσθηση στο στόμα, ενώ αφήνει μια καυστική επίγευση όταν προστεθεί στον οίνο. Η πικράδα των πεπτιδίων μπορεί εύκολα να

εξισωθεί με την υδροφοβικότητα των αμινοξέων που το αποτελούν. Το λευκό κρασί περιέχει αρκετά υδρόφοβα πεπτίδια που είναι πικρά αν και είναι άγνωστο αν η συγκέντρωση επαρκεί για να προκληθεί η αίσθηση ή αν πρέπει να συνδυαστούν (Gawel R., et al, 2018).

Τα παρακάτω πεπτίδια φαίνεται πως εξετάστηκαν για τις λειτουργικές τους ιδιότητες και την γευστική τους επίδραση. Αυτά είναι Ile-Arg, Ile-Val, Phe-Lys, Tyr-Lys, Val-Ile, Lys-Met-Asn, Phe-Arg-Arg και Ser-Lys-Thr-Ser-Pro-Tyr και αποδίδουν τις γεύσεις του πικρού, του ξινού και του umami. Μπορούν να λειτουργούν και ως οξειδωτικά, αντιμικροβιακά ή με επιφανειοδραστικές ουσίες, με ικανότητα αφρισμού και γαλακτωματοποίησης. Από τα παραπάνω πεπτίδια τα τέσσερα (Ile-Val, Val-Ile, Phe-Arg-Arg, Ser-Lys-Thr-Ser-Pro-Tyr), περιγράφονται ως πικρά. Το εξαπεπτίδιο περιέχει κυρίως υδρόφιλα υπολείμματα, με μόνο δύο υδρόφοβα την προλίνη και την τυροσίνη που βρίσκονται στο ο-τελικό άκρο. Το διπεπτίδιο Phe-Lys είναι ξινό, πιθανόν λόγω της ύπαρξης ιχθύνου οξικού οξέος, που προκύπτουν από τη σύνθεσή του. Το τριπεπτίδιο Lys-Met-Asn χαρακτηρίστηκε με umami γεύση πιθανών λόγω του ότι περιέχει υπόλειμμα Asn, ενώ τα Ile-Arg και Tyr-Lys ήταν άγευστα (Desportes, C, et al, 2001).

Εκτός από τη λευκή υπάρχει και η ερυθρή οينوποίηση, που και σε αυτή την περίπτωση συναντώνται πεπτίδια. Λόγος γίνεται για δύο ανασταλτικά πεπτίδια PEP με αλληλουχίες αμινοξέων VEIPE και YPIPF. Ακόμη έχουν ανιχνευτεί και πεπτίδια με ανασταλτική δράση του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης (ACEI) τα οποία είναι: LIPPGVPY, YYAPF, YYAPEDGIL, SWSF, WVPSVY και AWPFF.

Στην ερυθρή οينوποίηση όσο και στην παραγωγή αφρώδους οίνου υπάρχει το στάδιο της μηλογαλακτικής ζύμωσης, αλλά και της παλαίωσης με παραμονή του οίνου με οινολάσπες. Κατά την παραμονή του με τις οινολάσπες μπορεί να γίνει αυτόλυση των ζυμών αυξάνοντας τη συγκέντρωση σε πεπτίδια (Zhou M, et al, 2021). Οι οινολάσπες αντιπροσωπεύουν το 2-6% του παραγόμενου όγκου κρασιού και το 14-25% όλων των υποπροϊόντων οينوποίησης. Είναι το υπόλειμμα που σχηματίζεται στον πάτο των δοχείων που περιέχουν οίνο μετά από τη ζύμωση κατά την αποθήκευση ή μετά από απαραίτητες επεξεργασίες, αλλά και τα υπολείμματα που λαμβάνονται μετά από τη διήθηση ή φυγοκέντριση του προϊόντος. Στις οινολάσπες περιλαμβάνονται αρκετές ενώσεις μεταξύ των οποίων πρωτεΐνες κύτταρα ζύμης και λοιπά. Σε δείγματα οινολασπών έχουν βρεθεί πεπτίδια που διαθέτουν αντιυπερτασική επίδραση και αυτά είναι:

- FKTTDQQTRTTVA,
- NPKLVTIVT,



- TVTNPARIA,
- PAGELHP,
- LDSPSEGRAPE,
- LDSPSEGRAPGAD (Bravo F.I., et al, 2022).

Στη διαδικασία της αυτόλυσης απελευθερώνονται υδρολυτικά ένζυμα συμπεριλαμβανομένων των πρωτεασών που συμβάλλουν στο σχηματισμό του πεπτιδίου. Κατά τη διάρκεια της αυτόλυσης η μαγιά απελευθερώνει διαφορετικές ενώσεις που τροποποιούν τις οργανοληπτικές ιδιότητες του οίνου. Τα προϊόντα αυτόλυσης επηρεάζουν και τις ιδιότητες αφρισμού των αφρωδών οίνων. Η αυτόλυση της ζύμης χαρακτηρίζεται από την υδρόλυση των ενδοκυτταρικών βιοπολυμερών από ένζυμα ζύμης που ενεργοποιούνται μετά από κυτταρικούς θανάτους, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση προϊόντων χαμηλού μοριακού βάρους. Η αυτόλυση αποτελεί μια αργή διαδικασία σχετική με τον κυτταρικό θάνατο. Περιλαμβάνει υδρολυτικά ένζυμα που απελευθερώνουν πεπτίδια, αμινοξέα, πρωτεΐνες κλπ, στον οίνο. Κατά την παλαίωση παρατηρούνται αλλαγές στη σύνθεση του οίνου (Hervé A., GUILLOUX-BENATIER MICHÈLE, 2008).

Από το ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* ταυτοποιήθηκε ένα πεπτίδιο αναστολής ACEI, με αλληλουχία TPTQQS. Με περαιτέρω αυτόλυση ζύμης αυξήθηκε η συγκέντρωση του πεπτιδίου και ενισχύθηκε η ACEI (Zhou M, et al, 2021). Ο βασικός μηχανισμός αυτόλυσης βασίζεται στα εξής χαρακτηριστικά: τα υδρολυτικά ένζυμα απελευθερώνονται στον ενδοκυτταρικό χώρο λόγω της αποικοδόμησης των ενδοδομών των κυττάρων. Αυτά τα ένζυμα αναστέλλονται από συγκεκριμένους κυτταροπλασματικούς αναστολείς που αργότερα αποικοδομούνται, προκαλώντας την πρωτεολυτική ενεργοποίηση αυτών των ενζύμων. Έπειτα από την ενζυματική αποικοδόμηση των ενδοκυτταρικών μακρομορίων προκαλείται μια συσσώρευση προϊόντων υδρόλυσης. Όταν οι πόροι του κυτταρικού τοιχώματος είναι αρκετά μεγάλοι τα αυτολυτικά προϊόντα απελευθερώνονται στο εξωκυτταρικό περιβάλλον. Τέλος, μια περαιτέρω αυτολυτική αποικοδόμηση περισσότερων πολυμερισμένων ενώσεων σε χαμηλές ενώσεις μοριακού βάρους εμφανίζεται στο εξωκυτταρικό περιβάλλον. Οι κύριες ενώσεις που απελευθερώνονται κατά τη διαδικασία είναι τα πεπτίδια και τα αμινοξέα. Πεπτίδια υψηλού μοριακού βάρους κυρίως υδρόφοβα απελευθερώνονται στα πρώτα στάδια της διαδικασίας, έπειτα τα μεγάλα αυτά πεπτίδια υδρολύονται δημιουργώντας λιγότερα υδρόφοβα πεπτίδια, χαμηλότερου μοριακού βάρους (Martinez-Rodriguez A. J., and Encarnacion P., 2009). Οι Moreno-Arribas et al, έχουν δηλώσει πως η υδροφοβικότητα των χαρακτηριστικών πεπτιδίων θα μπορούσε να

εξηγήσει τις ιδιότητες του αφρού των αφρώδων οίνων (Hervé A., GUILLOUX-BENATIER MICHÈLE, 2008).

Η τελική συγκέντρωση πεπτιδίων στους αφρώδεις οίνους επηρεάζεται από διαφορετικές μεταβλητές, όπως η θερμοκρασία, ο χρόνος παλαίωσης, το στέλεχος ζύμης στη δεύτερη ζύμωση. Η σύσταση των πεπτιδίων του οίνου φανερώνει πως τα αμινοξέα που βρίσκονται σε υψηλότερα επίπεδα είναι η θρεονίνη και η σερίνη. Προέρχονται από αυτόλυση ζύμης αφού τα δύο αυτά αμινοξέα εμπλέκονται σε γλυκοσιδικούς δεσμούς μεταξύ ουσιών του κυτταρικού τοιχώματος (Martinez-Rodriguez A. J., and Encarnacion P., 2009).

Σε αφρώδεις οίνους που έχουν εξεταστεί έχουν ανιχνευτεί τα εξής διπεπτίδια: Arg-Ile, Ile-Arg, Ile-Val, Lys-Phe, Lys-Tyr, Phe-Lys, Tyr-Gln, Tyr-Lys, Val-Ile. Οι μετρήσεις συνήθως γίνονται σε διαφορετικές εσοδείες και οι αλλαγές της σύνθεσης προκύπτουν από τον τρύγο. Τα χαμηλού μοριακού βάρους πεπτίδια παρουσιάζουν αρκετές λειτουργικές ιδιότητες, όπως επιφανειακή, αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή δράση. Το πιο σημαντικό πεπτίδιο στις σαμπάνιες είναι το Ile-Arg ακολουθεί το Arg-Ile, Ile-Val και τέλος Tyr-Lys (De Person M., et al, 2004). Για να παραχθούν αφρώδεις οίνοι, απαιτείται επιλεγμένο στέλεχος μαγιάς. Η αυτόλυση είναι ένα μη αναστρέψιμο γεγονός που προκαλείται από τα ενδοκυτταρικά ένζυμα της ζύμης και λαμβάνει χώρα στο τέλος της στατικής φάσης ανάπτυξης. Η ποσότητα των πεπτιδίων που απελευθερώνονται στην αυτόλυση κατά την παλαίωση στους αφρώδεις οίνους μεταβάλλεται ανάλογα με την ποικιλία και το χρόνο παλαίωσης. Η φύση των πεπτιδίων αλλάζει με το χρόνο γήρανσης και μικραίνει όσο αυξάνεται ο χρόνος γήρανσης. Η αλλαγή στην περιεκτικότητα των πεπτιδίων φαίνεται να οφείλεται στην αρχική απελευθέρωση πεπτιδίων που ύστερα αποικοδομούνται (Hervé A., GUILLOUX-BENATIER MICHÈLE, 2008).

Πίνακας 3: Συγκεντρωτικός πίνακας πεπτιδίων οίνου, προέλευση και δράση αυτών.

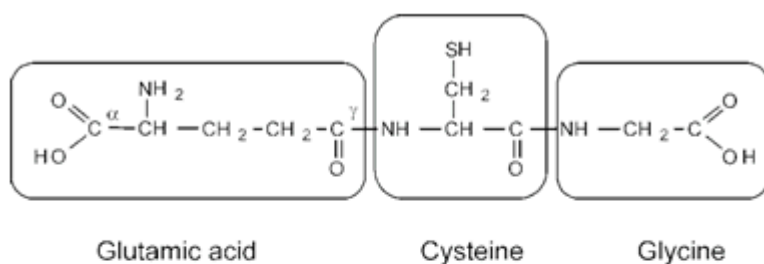
|    | Πεπτίδιο – Αμινοξική αλληλουχία |                                     | Γεύση / Δράση                      | Πηγή ανίχνευσης   | Παραπομπή                              |
|----|---------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|---|--|
| 1  | IR                              | Ile-Arg                             | Δεν έχει αναφερθείσα δράση-άγευστο | <i>Vitis Vinifera</i> , αφρώδεις οίνοι                          | Zhou et al, 2021<br>Person et al, 2004 |
| 2  | IV                              | Ile-Val                             | πικρό                              | <i>Vitis Vinifera</i> λευκοί και αφρώδεις οίνοι                 | Zhou et al, 2021<br>Person et al, 2004 |
| 3  | FK                              | Phe-Lys                             | ξινό                               | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ζύμη, λευκοί και αφρώδεις οίνοι | Zhou et al, 2021<br>Pilar et al, 2012  |
| 4  | YK                              | Tyr-Lys                             | Ελαφρώς γλυκό                      | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ζύμη, αφρώδεις οίνοι            | Person et al, 2004                     |
| 5  | VI                              | Val-Ile                             | πικρό                              | <i>Vitis Vinifera</i> , λευκοί και αφρώδεις οίνοι               | Zhou et al, 2021                       |
| 6  | KMN                             | Lys-Met-Asn                         | umami                              | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ζύμη, λευκοί οίνοι              | Zhou et al, 2021<br>Pilar et al, 2012  |
| 7  | FRR                             | Phe-Arg-Arg                         | πικρό                              | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , λευκοί και αφρώδεις οίνοι     | Zhou et al, 2021                       |
| 8  | SKTSPY                          | Ser-Lys-Thr-Ser-Pro-Tyr             | πικρό                              | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , λευκοί οίνοι                  | Person et al, 2004                     |
| 9  | LIPPGVPY                        | Leu-Ile-Pro-Pro-Gly-Val-Pro-Tyr     | ACE ανασταλτικό                    | Ερυθροί οίνοι   | Zhou et al, 2021                       |
| 10 | YYAPFDGIL                       | Tyr-Tyr-Ala-Pro-Phe-Asp-Gly-Ile-Leu | ACE ανασταλτικό                    | Ερυθροί οίνοι   | Zhou et al, 2021                       |
| 11 | YYAPF                           | Tyr-Tyr-Ala-Pro-Phe                 | ACE ανασταλτικό                    | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ζύμη, ερυθροί οίνοι             | Zhou et al, 2021                       |
| 12 | SWSF                            | Ser-Trp-Ser-Phe                     | ACE ανασταλτικό                    | Δεν βρέθηκε   | Zhou et al, 2021                       |
| 13 | WVPSVY                          | Trp-Val-Pro-Ser-Val-Tyr             | ACE ανασταλτικό                    | Ερυθροί οίνοι   | Zhou et al, 2021                       |
| 14 | AWPF                            | Ala-Trp-Pro-Phe                     | ACE ανασταλτικό                    | Ερυθροί οίνοι   | Zhou et al, 2021                       |
| 15 | VEIPE                           | Val-Glu-Ile-Pro-Glu                 | PEP ανασταλτικό                    | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , ερυθροί οίνοι                 | Zhou et al, 2021                       |

|    |                 |   |                            |  |                    |
|----|-----------------|---|----------------------------|--|--------------------|
| 16 | YPIPF           | Tyr-Pro-Ile-Pro-Phe                                 | PEP ανασταλτικό            | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , ερυθροί οίνοι                      | Zhou et al, 2021   |
| 17 | RI              | Arg-Ile   | Δεν έχει αναφερθείσα δράση | <i>Vitis Vinifera</i> , αφρώδεις οίνοι                               | Person et al, 2004 |
| 18 | KF              | Lys-Phe   | Δεν έχει αναφερθείσα δράση | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ζύμη, αφρώδεις οίνοι                 | Person et al, 2004 |
| 19 | KY              | Lys-Tyr   | Δεν έχει αναφερθείσα δράση | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ζύμη, αφρώδεις οίνοι                 | Person et al, 2004 |
| 20 | YQ              | Tyr-Gln   | Δεν έχει αναφερθείσα δράση | Αφρώδεις οίνοι   | Person et al, 2004 |
| 21 | Yeast (no wine) | Thr-Pro-Thr-Gln-Gln-Ser                             | ACE ανασταλτικό            | Απομόνωση από υδρόλυση πρωτεϊνών του <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Ni et al, 2012     |
| 22 | Glutathione     | Glu-Cys-Gly   | Αντιοξειδωτική δράση       |  | Pizzorno J, 2014   |
| 23 |                 | Leu-Leu-Leu   | Δεν έχει αναφερθείσα δράση | Ερυθροί οίνοι  | Saez et al, 2021   |
| 24 |                 | Gly-His   | Δεν έχει αναφερθείσα δράση | Ερυθροί οίνοι  | Saez et al, 2021   |
| 25 |                 | Tyr-Ala   | Δεν έχει αναφερθείσα δράση | Ερυθροί οίνοι  | Saez et al, 2021   |
| 26 |                 | Pro-Thr   | Δεν έχει αναφερθείσα δράση | Ερυθροί οίνοι  | Saez et al, 2021   |
| 27 | FKTTDQQTRTTVA   | Phe-Lys-Thr-Thr-Asp-Gln-Gln-Tyr-Arg-Tyr-Tyr-Val-Ala | Αντιπερτασική δράση        | Οινολάσπες-αυτόλυση  | Bravo et al, 2022  |
| 28 | NPKLVTIV        | Asn-Pro-Lys-Leu-Val-Thr-Ile-Val                     | Αντιπερτασική δράση        | Οινολάσπες- αυτόλυση   | Bravo et al, 2022  |
| 29 | TVTNPARIA       | Thr-Val-Thr-Asn-Pro-Ala-Arg-Ile-Ala                 | ACE ανασταλτικό            | Οινολάσπες -αυτόλυση   | Bravo et al, 2022  |

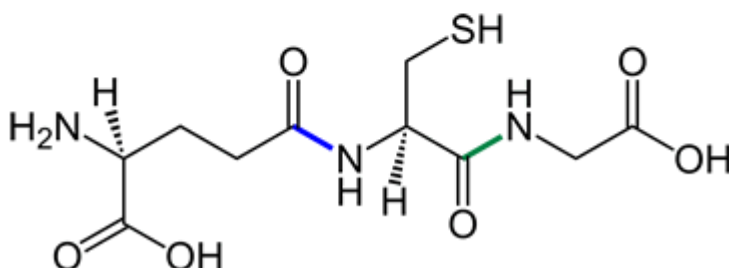
|    |               |   |  |                     |                     |
|----|---------------|---|--|---------------------|---------------------|
| 30 | PAGELHP       | Pro-Ala-Gly-Glu-Leu-His-Pro                         | ACE ανασταλτικό - μη αντιυπερτασική δράση. | Οινολάσπες-αυτόλυση | Bravo et al, 2022   |
| 31 | LDSPSEGRAPG   | Leu-Asp-Ser-Pro-Ser-Glu-Gly-Arg-Ala-Pro-Gly         | ACE ανασταλτικό                            | Οινολάσπες-αυτόλυση | Bravo et al, 2022   |
| 32 | LDSPSEGRAPGAD | Leu-Asp-Ser-Pro-Ser-Glu-Gly-Arg-Ala-Pro-Gly-Ala-Asp | Αντιυπερτασική δράση                       | Οινολάσπες-αυτόλυση | Bravo et al, 2022   |
| 33 |               | Ser-Asp-Cys-Asp-Ser                                 | Αντιοξειδωτικός ρόλος                      | Λευκοί οίνοι        | Romanet et al, 2020 |
| 34 |               | Asp – Met   |  | Λευκοί οίνοι        | Romanet et al, 2020 |

## 4.2 Γλουταθειόνη

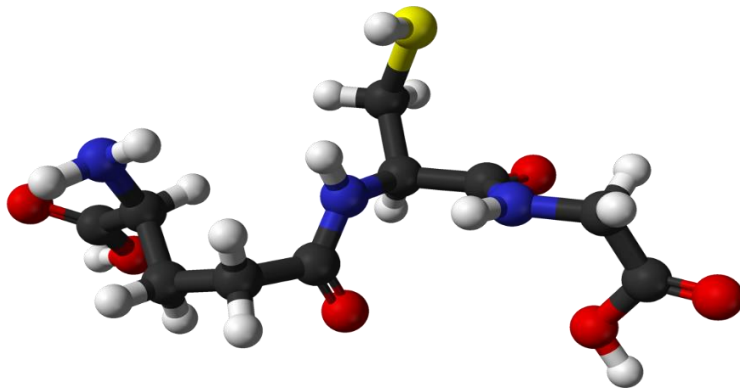
Η γλουταθειόνη (GSH) είναι ένα τριπεπτίδιο μη πρωτεϊνικής προέλευσης που υπάρχει στα σταφύλια και το κρασί και είναι το πιο μελετημένο πεπτίδιο στον οίνο. Είναι το μοναδικό πεπτίδιο του οποίου η προσθήκη επιτρέπεται ως οινολογική τεχνική με σκοπό να δράσει κατά της οξειδωσης. Πρώτη φορά αναφορά για την ύπαρξή της στα σταφύλια έγινε το 1989 από τους Cheynier et al. και αποτελείται από L-γλουταμίνη, L-κυστεΐνη και γλυκίνη (Εικόνες 6,7).



# GLUTATHIONE



Εικόνα 6. Το τριπεπτίδιο γλουταθειόνης. ([https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Ffreenutrition.co.uk%2Fnutritionists%2Fglutathione%2F&psig=AOvVaw1GbHCj7EzxZqVd3C4zuMMq&ust=1686435780772000&source=images&cd=vfe&ved=0CBEQjRxaFwoTCPC67P6ct\\_8CFQAAAAAdAAAAABAE](https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Ffreenutrition.co.uk%2Fnutritionists%2Fglutathione%2F&psig=AOvVaw1GbHCj7EzxZqVd3C4zuMMq&ust=1686435780772000&source=images&cd=vfe&ved=0CBEQjRxaFwoTCPC67P6ct_8CFQAAAAAdAAAAABAE)).



Εικόνα 7. Γλουταθειόνη- σχηματική απεικόνιση του πεπτιδίου στο χώρο.  
([https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fen.wikipedia.org%2Fwiki%2FGlutathione&psig=AOvVaw3i81AF8rp15dDHX1etCQqK&ust=1686435562653000&source=images&cd=vfe&ved=0CBEQjRxaFwoTCJCik5ect\\_8CFQAAAAAdAAAAABAR](https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fen.wikipedia.org%2Fwiki%2FGlutathione&psig=AOvVaw3i81AF8rp15dDHX1etCQqK&ust=1686435562653000&source=images&cd=vfe&ved=0CBEQjRxaFwoTCJCik5ect_8CFQAAAAAdAAAAABAR))

Αποτελεί ένα φυσικό αντιοξειδωτικό και προτείνεται ως πρόσθετο για την πρόληψη του ενζυματικού μαυρίσματος των οίνων. Προέρχεται από το σταφύλι αλλά και από το μεταβολισμό των ζυμομυκήτων. Σύμφωνα με τους Okuda και Yokotsuka το 1999 και τους Park et al. το 2000, η περιεκτικότητα σε γλουταθειόνη μειώνεται τις πρώτες ημέρες της ζύμωσης, ενώ στη συνέχεια αυξάνεται και φτάνει περίπου σε τιμές τα 0,2-5,1%mg/l. Η GSH στα σταφύλια μπορεί να αποτελεί πηγή αζώτου για τους ζυμομύκητες κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Επίσης, οι ίδιοι ζυμομύκητες συνθέτουν GSH σε σημαντικές ποσότητες κατά τη ζύμωση.

Οι Lavigne et al. (2007), διαπίστωσαν πως η ποσότητα της γλουταθειόνης που υπάρχει σε ένα κρασί στο τέλος της αλκοολικής ζύμωσης εξαρτάται από το στέλεχος της ζύμης και φαίνεται να παρουσιάζει μείωση με την αφαίρεση των οινολασπών και την παλαίωση σε βαρέλια. Είναι γνωστό πως στη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* η GSH αντιπροσωπεύει περίπου το 1% του ξηρού βάρους (Moreno-Arribas and M. Carmen Polo, Wine Chemistry and Biochemistry).

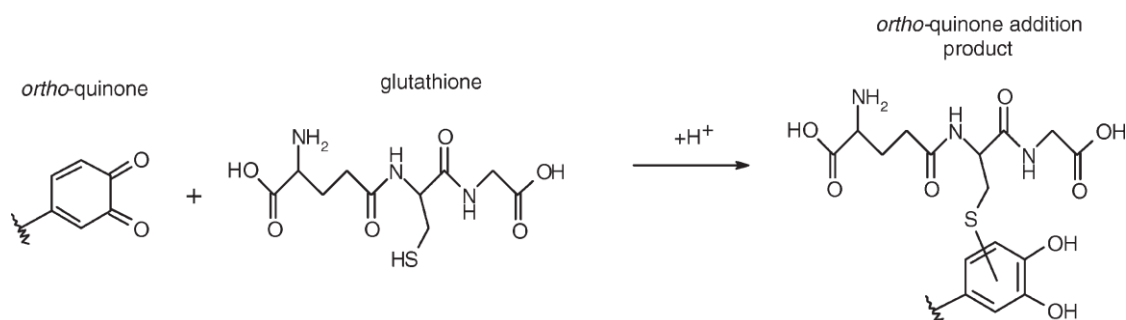
Κάνοντας λόγο για την ύπαρξη γλουταθειόνης στα σταφύλια φαίνεται πως η συγκέντρωση ποικίλει ανάλογα με την ποικιλία, την εποχή του τρύγου ή ακόμα και το terroir. Η σύνθεση της γλουταθειόνης γίνεται στο κυτοσόλιο και τους χλωροπλάστες των φυτικών κυττάρων της αμπέλου και η συγκέντρωσή της φαίνεται να αυξάνεται παράλληλα με το πέρας των ημερών ωρίμανσης. Όταν η σακχαροπεριεκτικότητα των σταφυλιών φτάσει στα 16° Brix η αύξηση της συγκέντρωσης της γλουταθειόνης φαίνεται να σταματά και να μένει σταθερή. Ακόμα, έχει αποδειχθεί πως η ποσότητα της γλουταθειόνης που παρατηρείται σε γλεύκος προερχόμενο από πρέμνα με χαμηλή



λίπανση είναι χαμηλότερη συγκριτικά με την ποσότητα σε γλεύκος από πρέμνα με υψηλότερη λίπανση. Άρα προκύπτει πως η GSH επηρεάζεται από τα επίπεδα λίπανσης και τα επίπεδα N των πρεμνών που προέρχονται. (Gawel et al, 2018).

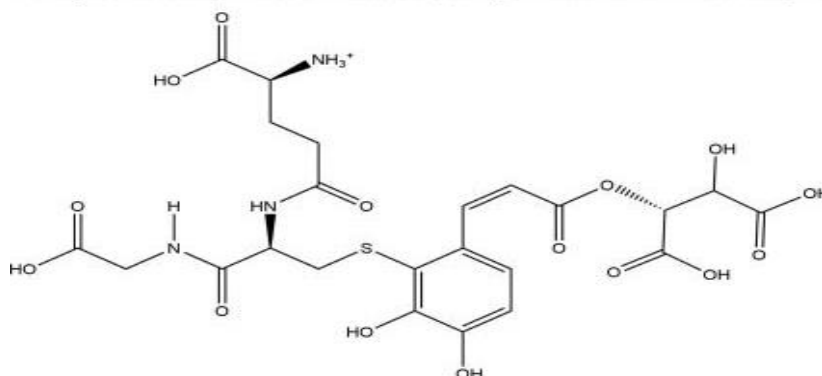
Στο γλεύκος η συγκέντρωση της γλουταθειόνης μεταβάλλεται ανάλογα με το στάδιο της οινοποιητικής διαδικασίας και υπάρχει είτε με τη μορφή μοριακής γλουταθειόνης (GSH) είτε ως δισουλφίδιο γλουταθειόνης (GSSG), (Εικόνα 10). Οι παράγοντες που την επηρεάζουν είναι η έκθεση σε O<sub>2</sub>, η δράση της τυροσινάσης αλλά και οι προζυμωτικές διεργασίες έως και πριν το στάδιο του πιεστηρίου. Ακόμα και το περιβάλλον που επικρατεί διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη συγκέντρωση της γλουταθειόνης, καθώς στις αναγωγικές συνθήκες η συγκέντρωσή της είναι μεγαλύτερη από ότι στις οξειδωτικές. Περνώντας στο στάδιο της παλαίωσης οι απολασπόμενοι οίνοι έχουν μικρότερη συγκέντρωση γλουταθειόνης, συγκριτικά με τους μη απολασπόμενους, καθώς οι οινολάσπες προστατεύουν την οξειδωσή της. Όσο περισσότερο ένας οίνος εκτίθεται στο O<sub>2</sub> τόσο μειώνονται τα επίπεδα GSH.

Όπως προαναφέρθηκε η GSH έχει αντιοξειδωτική δράση, καθώς αναστέλλεται η οξειδωτική αμαύρωση του οίνου. Τα υδροξυκιναμωνικά οξέα του κυτταροπλάσματος αλληλοεπιδρούν με το καταλυτικό ένζυμο οξείδωσης των στεμφύλων, την πολυφαινολοξειδάση (PPO). Όταν το O<sub>2</sub> έρθει σε επαφή με την PPO τα υδροξυκιναμωνικά οξέα μετατρέπονται σε ορθο-κινόνες. Αυτό επιτυγχάνεται, διότι η θειική της ομάδα δρα ως νουκλεόφυλο μόριο και αντιδρά με τον ηλεκτρονιόφιλο δακτύλιο της κινόνης του τρυγικού εστέρα (Εικόνα 8). Μέσω της αντίδρασης της GSH δημιουργείται το GRP (Grape Reaction Product) που είναι ένας θειοαιθέρας (2-S-γλουταθειονολ-καφταρικό οξύ, Εικόνα 9) που δεν οξειδώνεται από την PPO. Με αυτό τον τρόπο οι ορθοκινόνες δεσμεύονται από τη GSH σε άχρωμη μορφή εμποδίζοντας το οξειδωτικό καφέτιασμα. Ωστόσο, το GRP μπορεί να αποτελεί και υπόστρωμα δράσης της λακάσης σε περίπτωση ύπαρξης βοτρυτή (Gawel et al, 2018).



Εικόνα 8. Απεικόνιση της αντίδρασης γλουταθειόνης με ορθο-κινόνες (Sonni et al, 2011)

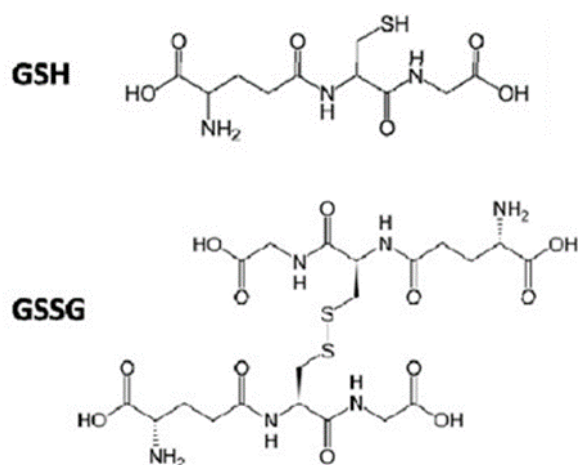
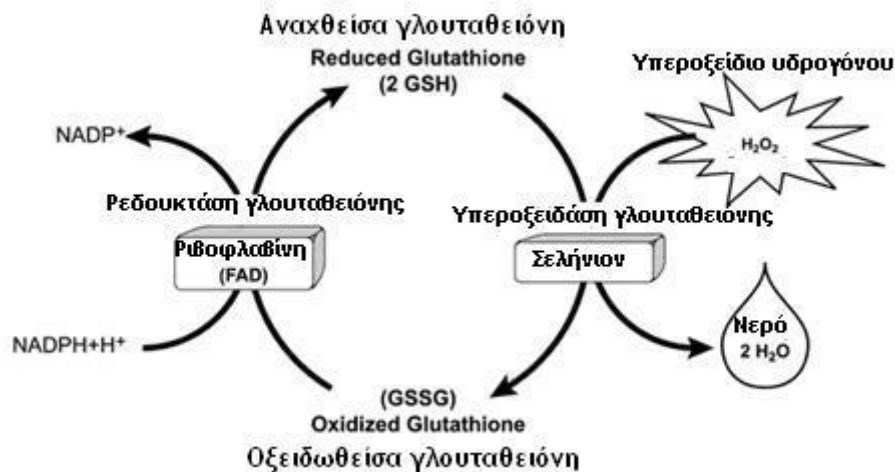
### 2-S-glutathionyl caftaric acid (Grape Reaction Product, GRP)



Εικόνα 9. Απεικόνιση 2-S-γλουταθειονολ-καφταρικό οξύ.

Εκτός από τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες της GSH, μπορεί να συνεισφέρει και στην αποτροπή της μείωσης της συγκέντρωσης αρκετών πτητικών ουσιών. Από πειραματικές έρευνες έχει προκύψει πως η γλουταθειόνη δρα προστατευτικά προς ορισμένους εστέρες και τερπένια στο στάδιο ωρίμανσης του οίνου. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην ύπαρξη ελεύθερων σουλφιδικής ομάδας (SH), που έχει οξειδοαναγωγικές και νουκλεόφιλες ιδιότητες. Η συνεισφορά της GSH παρατηρείται και στη διατήρηση του ποικιλιακού αρώματος ορισμένων οίνων, καθώς έχει τη δυνατότητα να προστατεύει τη δράση ορισμένων θειολών που συνεισφέρουν αρωματικά στον οίνο. Πιστεύεται πως υπεύθυνη για αυτά τα αποτελέσματα είναι η ύπαρξη στη γλουταθειόνη μιας ομάδα θειολών που δρα ανταγωνιστικά με τις αρωματικές θειόλες και δεσμεύει ορθοκινόνες, διατηρώντας αναλλοίωτα τα ποικιλιακά αρώματα (Πατρινός Σ., 2016).

Στα κύτταρα η γλουταθειόνη υπάρχει σε 2 καταστάσεις: την ανηγμένη GSH και την οξειδωμένη GSSG (Εικόνα 10).



Εικόνα 10. Διαδικασία οξειδωσης της γλουταθειόνης – Δομές GSH και GSSG.

(<https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fcurcumin.gr%2Fpage.php%3Fpid%3D85&psig=AOvVaw1CryPDv7Loz9pj6pGewOgT&ust=1686740939951000&source=images&cd=vfe&ved=0CBEQjRxqFwoTCMiKl-aNwP8CFQAAAAAdAAAAABAQ>), (Bertoni et al. 2019)

Η GSSG είναι δυο μόρια γλουταθειόνης ενωμένα μέσω δισουλφιδικού δεσμού. Η αναλογία GSH/GSSG καθορίζει την οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυττάρων (Pizzorno J, 2014). Η γλουταθειόνη μπορεί να περιέχεται και σε αδρανοποιημένες ξηρές ζύμες (IDY- Instant Dry Yeast ), όπου η γλουταθειόνη συσσωρεύεται ενδοκυτταρικά και έπειτα ελευθερώνεται στο μούστο. Έτσι η συνεργασία των GSH-IDY, προσφέρει αντιοξειδωτική δράση παρόμοια με αυτή της μοριακής GSH. Η αύξηση της περιεκτικότητας GSH των IDY κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας επιτυγχάνεται με τη ρύθμιση του μεταβολισμού, όταν υπάρχει κυστεΐνη στο μέσο καλλιέργειας. Η λειτουργικότητα των ενώσεων IDY που απελευθερώνονται κατά την οινοποίηση και ο αντίκτυπός τους στη σύνθεση των κρασιών μπορούν δυνητικά να εξαχθούν από αδρανοποιημένες ξηρές ζύμες εμπλουτισμένες με GSH μόλις προστεθούν στον οίνο. Οι παράγοντες που φαίνεται να τροποποιούν τα μεταβολικά αποτελέσματα των

κλασμάτων IDY είναι η ενδοκυτταρική συσσώρευση γλουταθειόνης όσο και το στέλεχος ζύμης (Bahut F. et al, 2019).

Προϊόν αντίδρασης της γλουταθειόνης με θειώδες άλας είναι το σουλφονικό ανάλογο της γλουταθειόνης η S-σουλφονική γλουταθειόνη (Glutathione S-sulfonate GSSO<sub>3</sub>H), που περιγράφηκε αρχικά στα λευκά και έπειτα στα ερυθρά κρασιά (Sáez V et al, 2021). Αποτελεί προϊόν της λύσης του δισουλφιδικού δεσμού της οξειδωμένης γλουταθειόνης, με τη χημική αντίδραση για το σχηματισμό του να προκαλείται από υψηλές ποσότητες O<sub>2</sub>. Η σουλφονική γλουταθειόνη αποτελεί ένα βιοδείκτη για τα κρασιά υψηλής ποιότητας, ενώ δεν είναι γνωστό αν έχει τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες της γλουταθειόνης. Η GSH στην αυτούσια μορφή της στους οίνους υψηλής ποιότητας προτιμάται από το διθειώδες ανιόν ως υπόστρωμα. Ενώ, εκτός από την αντιοξειδωτική της δράση αποτελεί και ενισχυτικό της γεύσης γλυκιά και αλμυρή γεύση (Sáez V et al, 2021).

Η ανηγμένη μορφή της γλουταθειόνης είναι βασικός μεταβολίτης για πολλαπλές λειτουργίες σε φυτά, τρόφιμα και ποτά. Οι ρόλοι που κατέχει είναι η δράση ως πηγή αναγωγικού σε πολλές αντιδράσεις οξειδωσης, που προστατεύει από την τοξικότητα των βαρέων μετάλλων ή λιπιδίων και από την οξείδωση των πολυφαινολών. Φαίνεται να δρα ως πυρινόφιλη ουσία που κάνει ζεύγη άμεσα με αντιδραστικά ηλεκτρόφιλα, επιφέροντας χημική και οξειδωτική σταθερότητα σε τρόφιμα και ποτά. Στα λευκά κρασιά η δράση της είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς διατηρείται ο ποικιλιακός χαρακτήρας και το χρώμα. Αξίζει να αναφερθεί πως με την προσθήκη GSH κατά την εμφιάλωση περιορίζεται η συσσώρευση ακεταλδεΐδης και διατηρείται η αρωματική πολυπλοκότητα και φρεσκάδα ακόμα και 12 μήνες μετά. Γενικά η προσθήκη GSH στα αρχικά στάδια της οινοποίησης έχουν ως επακόλουθο το υψηλότερο ποσοστό αντιοξειδωτικού μεταβολισμού συγκριτικά με τις πιο καθυστερημένες προσθήκες, άσχετα με την περίοδο του τρύγου. Από την έρευνα των Nikolantonaki et al., προκύπτει πως η γλουταθειόνη S-θειώδη σε οίνους που εμφιαλώνονται και αποθηκεύονται υπό οξειδωτικές συνθήκες φαίνεται πως κατά την παλαίωση μπορεί να γίνει λύση του δισουλφιδικού δεσμού (Nikolantonaki et al., 2018).

Μια άλλη ενδιαφέρουσα οινοποιητική τεχνική που έχει μελετηθεί πειραματικά από τους Sonni et al. (2011), είναι ο συνδυασμός γλουταθειόνης με ασκορβικό οξύ με σκοπό την επίτευξη καλύτερων αποτελεσμάτων έναντι στην οξείδωση και το καφέπιασμα. Η αρκετά υψηλή ποσότητα γλουταθειόνης παρέχει μια αρχική προστασία έναντι του οξειδωτικού χρωματισμού, όμως τελικά προκύπτει χρωματισμός. Με την παρουσία του ασκορβικού οξέος, οι υψηλές συγκεντρώσεις γλουταθειόνης

καθυστερούν την αποσύνθεση του ασκορβικού οξέος, χάρης την αναστολή των αντιδράσεων της φλαβονόλης του οίνου με τα προϊόντα αποδόμησης του ασκορβικού.

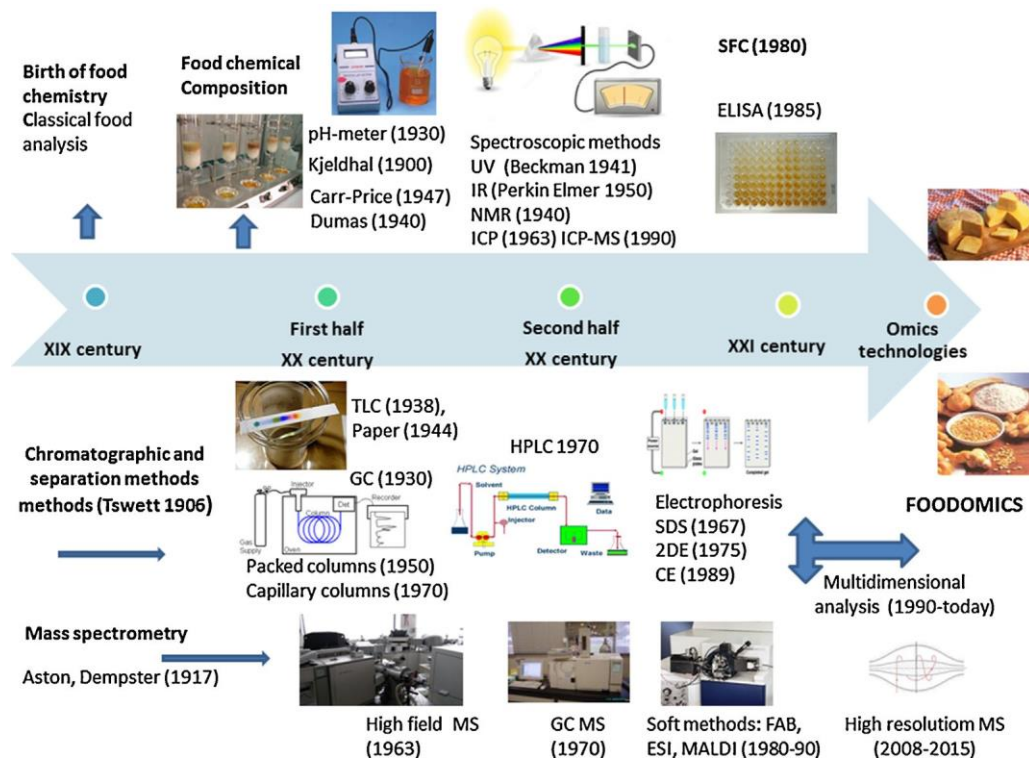
Η υψηλή συγκέντρωση γλουταθειόνης ανέστειλε τις πρόδρομες ουσίες των χρωστικών και ανέστειλε μόνιμα την παραγωγή των κατιόντων ξανθουλίου. Το αποτέλεσμα αυτό φανερώνει ότι η γλουταθειόνη έχει την ικανότητα να αποτρέπει το σχηματισμό οξειδωτικών χρωστικών και ορισμένων πρόδρομων ουσιών, όταν είναι σε επαρκείς συγκεντρώσεις αλλά οδηγεί στο σχηματισμό μιας νέας σειράς πολυμερών χρωστικών με την εξάντλησή τους. Αν και η γλουταθειόνη προστατεύει από τον χρωματισμό η p-κατεχίνη διατηρείται, ενώ τα προϊόντα αποδόμησης του καφεϊκού οξέος συσσωρεύονται. Ο συνδυασμός γλουταθειόνης-ασκορβικού οξέος έχει αθροιστική και προστατευτική δράση κατά του χρωματισμού. Η προστατευτική επίδραση της υψηλής συγκέντρωσης γλουταθειόνης στη p-κατεχίνη, σχετίζεται με την ικανότητά της να καθυστερεί την απώλεια ασκορβικού οξέος και να επηρεάζει την παραγωγή ξυλοσύνης για την επακόλουθη αντίδραση με p-κατεχίνη. Άρα, η γλουταθειόνη έχει την ικανότητα να καθυστερεί την αποικοδόμηση του ασκορβικού οξέος, ενώ σε μεγάλες συγκεντρώσεις θα μπορούσε να αποτρέψει τη συσσώρευση πρόδρομων χρωστικών, προερχόμενα από το προϊόν αποικοδόμησης του ασκορβικού. Με βάση την έρευνα των Sonni et al, ο συνδυασμός ασκορβικού και γλουταθειόνης προσφέρει μεγαλύτερη προστασία από οξειδωτικούς χρωματισμούς όταν υπάρχουν μαζί παρά χωριστά (Sonni F, et al, 2011).

## 5<sup>ο</sup> ΚΕΦΑΛΑΙΟ. Μέθοδοι προσδιορισμού και ανάλυσης πεπτιδίων στον οίνο

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η μελέτη των πεπτιδίων δεν είναι ιδιαίτερα εύκολη διαδικασία, λόγω των δυσκολιών διαχωρισμού, χαρακτηρισμού και ταυτοποίησής τους μέσα σε ένα πολύπλοκο μίγμα, όπως είναι το κρασί. Οι τεχνικές αναλυτικής χημείας τα στον τομέα των τροφίμων και ποτών συνεχώς εξελίσσονται, δίνοντας τη δυνατότητα πλέον την ανάλυση μορίων που παλαιότερα δεν ήταν δυνατή η μελέτη τους (Εικόνα 11). Μια πρώτη βασική προϋπόθεση για τη μελέτη των πεπτιδίων είναι ο διαχωρισμός αυτών από τα υπόλοιπα συστατικά, ο οποίος μπορεί να βασίζεται στις διαφορετικές φυσικές ή/και χημικές ιδιότητες των πεπτιδίων, όπως:

- το μοριακό βάρος,
- το φορτίο,
- η υδροφοβικότητα ή η υδροφιλικότητα και
- η διαλυτότητα (Zhou et al, 2021).

Οι κύριες τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό και την ανάλυση των πεπτιδίων στον τομέα της οινολογίας είναι η υγρή (LC) και αέρια (GC) χρωματογραφία σε συνδυασμό αρκετές φορές με την φασματομετρία μάζας (MS), ενώ τα τελευταία χρόνια αναπτύσσονται ιδιαίτερα και μέθοδοι μεταβολομικής (metabolomics/peptidomics). Ποικίλες έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί με εφαρμογές των παραπάνω μεθόδων. Έχουν χρησιμοποιηθεί διαφορετικές τεχνικές για τον χαρακτηρισμό των πρωτεϊνών ή των πεπτιδίων, όπως χρωματογραφία (HPLC), φασματομετρία μάζας ηλεκτροψεκασμού (ESI-MS), ηλεκτροφόρηση (SDS-PAGE), πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (STD-NMR), νεφελομετρία και θολερότητα και φασματοφωτομετρία φθορισμού (Pérez-Gregorio R, et al, 2020). Παρακάτω παρουσιάζονται χωριστά οι τεχνικές που εφαρμόζονται στους οίνους για την μελέτη πεπτιδίων.



Εικόνα 11. Η εξέλιξη της εφαρμογής των μεθόδων αναλυτικής χημείας στην ανάλυση τροφίμων. (Monica G, Pasquale F, 2016).

## 5.1 Ηλεκτροφόρηση

Οι ηλεκτροκινητικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται συχνά για την ανάλυση των πρωτεϊνών και κατά συνέπεια των πεπτιδίων. Στηρίζονται στην ιδιότητα των φορτισμένων μορίων να μετακινούνται σε ένα ηλεκτρικό πεδίο ανάλογα με το καθαρό τους φορτίο ή/και το μέγεθός τους. Μια τεχνική που εντάσσεται στην παραπάνω κατηγορία είναι η ηλεκτροφόρηση, όπου με δεδομένο pH οι πρωτεΐνες και τα πεπτίδια προσλαμβάνουν ένα καθαρό ηλεκτρικό φορτίο που εξαρτάται από τη σύσταση σε αμινοξέα. Τα φορτία κινούνται με διαφορετικούς ρυθμούς όταν υποβάλλονται σε ηλεκτρικό πεδίο. Αν στο μέσο μετανάστευσης υπάρχει μοριακό αποτέλεσμα, ο ρυθμός μετανάστευσης κάθε πολυπεπτιδίου προσδιορίζεται από ένα συνδυασμό καθαρού φορτίου και μοριακού μεγέθους. Η μετανάστευση βασισμένη μόνο στο μοριακό μέγεθος μπορεί να επιτευχθεί με μετουσίωση των πολυπεπτιδίων παρουσία δωδεκακυλοθειϊκού νατρίου (SDS), που δεσμεύει πρωτεΐνες με σταθερό ρυθμό και τους προσδίδει την ίδια αναλογία φορτίου προς μάζα.

Με αυτό τον τρόπο αποτρέπονται φαινόμενα φόρτισης και δίνεται η δυνατότητα να μετρηθεί το φαινομενικό  $M_r$  μιας δεδομένης πρωτεΐνης συγκρίνοντας

την ηλεκτροφορητική της κινητικότητα με αυτή των γνωστών τυπικών πρωτεϊνών. Αυτές οι μέθοδοι μπορούν να εκτελεστούν σε πυκνώματα πλακών ή τριχοειδών αγγείων. Μια άλλη τεχνική είναι η ηλεκτροφόρηση γέλης (Gel Electrophoresis), ιδιαίτερα χρησιμοποιούμενη για τις πρωτεΐνες του σταφυλιού και του κρασιού, όμως πεπτίδια δεν έχουν αναλυθεί ποτέ με αυτό το σύστημα. Επόμενη τεχνική είναι η ηλεκτροφόρηση γέλης δωδεκακυλοθειικού νατρίου (SDS-PAGE), είναι η κλασική ηλεκτροφορητική διαδικασία που εφαρμόζεται για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών του σταφυλιού και του οίνου βασιζόμενα στο μοριακό τους μέγεθος. Στη συνέχεια, υπάρχει και η ηλεκτροφόρηση εγγενούς γέλης πολυακρυλαμιδίου, όπου μπορούν να αξιοποιηθούν για το διαχωρισμό πρωτεϊνών σταφυλιού και κρασιού ανάλογα με το φορτίο και την ιδιότητα της μάζας του. Η τεχνική αυτή έχει χρησιμοποιηθεί και σε πρωτεΐνες μούστου για διαφοροποίηση ποικιλιών (Flamini 2008, Hyphenated techniques, κεφάλαιο 7).

Το 2000 οι Martinez Rodriguez & Polo εφάρμοσαν ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE με σκοπό να αξιολογήσουν την απελευθέρωση πολυπεπτιδίων οίνου με μοριακή μάζα 16.900-4.400 Da στο στάδιο αυτόλυσης του ζυμομύκητα. Επιπλέον, οι Desportes et al. (2000, 2001) χρησιμοποίησαν τριχοειδή ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδείς λωρίδες συντηγμένου πυριτίου με 25 mM, pH 2,5 και ως ρυθμιστικό διάλυμα λειτουργίας χρησιμοποιήθηκε φωσφορικό οξύ, ώστε να επαληθευτεί η καθαρότητα των συλλεγόμενων κορυφών έπειτα από το διαχωρισμό με HPLC (Moreno-Arribas & Polo, Wine Chemistry and Biochemistry).

Ένα εξίσου σημαντικό εργαλείο για το διαχωρισμό διαφορετικών συστατικών μιγμάτων αποτελεί η ηλεκτροφόρηση γέλης πολυακρυλαμιδίου 2 διαστάσεων (2D-PAGE), για το διαχωρισμό μιγμάτων σύνθετων πρωτεϊνών με διαφορετικά συστατικά. Έχει εφαρμοστεί για την ανάλυση πρωτεϊνών του σταφυλοπολτού, του φλοιού και ολόκληρου του σταφυλιού. Το 2D-PAGE με IPG-IEF μπορεί να εφαρμοστεί και στην ανάλυση πολυπεπτιδίων κρασιού. Τέλος, μια υποκατηγορία είναι η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (CE), όπου αξιοποιείται η ικανότητα των φορτισμένων μορίων, όπως πρωτεΐνες και πεπτίδια, να κινούνται σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, με το διαχωρισμό να λαμβάνει χώρα σε τριχοειδή σωλήνα. Τα πλεονεκτήματα είναι η αποτελεσματικότητα, οι σύντομοι χρόνοι μετεγκατάστασης, η υψηλή ανάλυση, η αυτοματοποίηση και η δυνατότητα ποσοτικοποίησης των διαχωριζόμενων πρωτεϊνών. Τα εκλούόμενα από τον τριχοειδές σωλήνα πεπτίδια και πρωτεΐνες συνήθως αποκαλύπτονται ως κορυφές με ανίχνευση UV ή και με απευθείας σύνδεση της εξόδου του τριχοειδούς με ένα φασματόμετρο μάζας. Ο πιο χρησιμοποιούμενος εξοπλισμός είναι τα τριχοειδή αγγεία



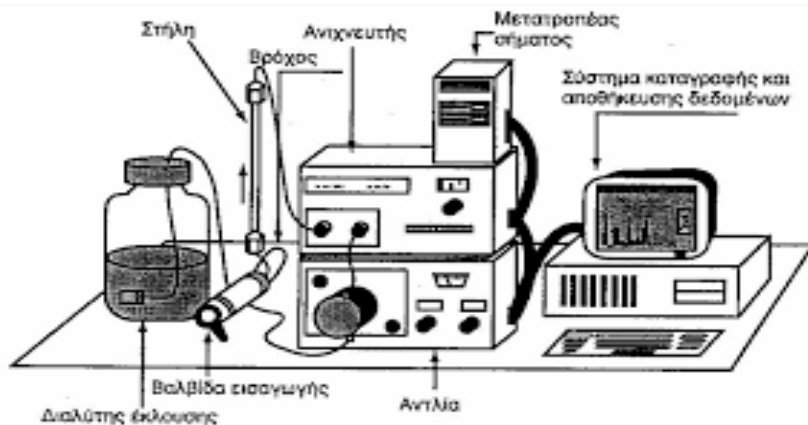
συντηγμένου πυριτίου, τα οποία μπορούν να καλυφθούν με πολυμερή διαφόρων τύπων, ώστε να αποφευχθεί η μη ειδική προσρόφηση πρωτεϊνών από ομάδες σιλανόλης (Hyphenated techniques, Κεφάλαιο 7).

## 5.2 Χρωματογραφία

Ως χρωματογραφία σύμφωνα με την Διεθνής Ένωση Καθαρής και Εφαρμοσμένης Χημείας ορίζεται, ως μια φυσική μέθοδος διαχωρισμού στην οποία τα συστατικά προς διαχωρισμό κατανέμονται ανάμεσα σε δύο φάσεις, εκ των οποίων η μία είναι στάσιμη (στατική φάση), ενώ η άλλη (κινητή φάση) κινείται σε μια συγκεκριμένη κατεύθυνση (Gary D. Christian et. al, Αναλυτική χημεία odysseus publishing, 2020). Η χρωματογραφία χωρίζεται σε δυο βασικές κατηγορίες την αέρια και την υγρή χρωματογραφία, ανάλογα με την φύση της κινητής φάσης (αέρια ή υγρή, αντίστοιχα). Η αέρια χρωματογραφία μπορεί να διαχωρίσει πτητικές ουσίες. Από την άλλη πλευρά η υγρή χρωματογραφία περιλαμβάνει τεχνικές, όπως ο αποκλεισμός μεγεθών (που ο διαχωρισμός βασίζεται στο μέγεθος των μορίων), ιοντοανταλλαγής (η διαφοροποίηση βασίζεται στο φορτίο), και υψηλής διακριτικής ικανότητας (HPLC, η διαφοροποίηση στηρίζεται στον καταμερισμό από μια υγρή φάση), (Christian et. al, 2020-Αναλυτική χημεία).

### 5.2.1 Υγρή χρωματογραφία

Η υγρή χρωματογραφία είναι μια αρκετά γρήγορη και ευαίσθητη τεχνική που παρουσιάζει ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών, με δυνατότητα προσδιορισμού ενώσεων που δεν είναι επαρκώς πτητικές ή σταθερές, ώστε να χωριστούν με την αέρια χρωματογραφία. Ιδιαίτερα γνωστή τεχνική της υγρής χρωματογραφίας είναι η HPLC ή αλλιώς υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (Christian et. al, 2020-Αναλυτική χημεία).



Εικόνα 12. Τυπική διάταξη Υγρού Χρωματογράφου Υψηλής Πίεσης (Πηγή: Τσουμαχίδου, MSc 2012)

Αποτελεί την πιο διαδεδομένη και χρησιμοποιούμενη μέθοδο για την ανάλυση των πεπτιδίων. Η υγρή χρωματογραφία ανάστροφης φάσης, RP-HPLC είναι η πιο διαδεδομένη τεχνική για τον διαχωρισμό και τον καθαρισμό των πεπτιδίων αλλά με σχετικά λίγες εφαρμογές (Moreno-Arribas M.V, et al, 2002). Προσφέρει ευελιξία, σύντομους χρόνους ανάλυσης, υψηλή ανάλυση, αποτελεσματικούς διαχωρισμούς και είναι κατάλληλη για διαδικασίες αυτοματισμού. Οι μηχανισμοί που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για το διαχωρισμό ποικίλουν και μπορούν να χρησιμοποιηθούν και συνδυαστικά, ορισμένοι από αυτούς είναι: η χρωματογραφία διήθησης γέλης (GPC), η χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής (IEC), χρωματογραφία αντίστροφης φάσης και αλληλεπίδρασης. Ωστόσο για το διαχωρισμό πεπτιδίων σε οίνους έχει χρησιμοποιηθεί μόνο η χρωματογραφία ανάστροφης φάσης. Η κινητή φάση που χρησιμοποιείται συνήθως, είναι ένα μείγμα νερού και ακετονιτριλίου, με τριφθοροξικό οξύ (TFA) ως αντιδραστήρια σύζευξης ιόντων, υπό συνθήκες διαβάθμισης. Πιο σπάνια γίνεται χρήση μιγμάτων μεθανόλης, ρυθμιστικών διαλυμάτων, φωσφορικών και τετραϋδροφουρανίου (Moreno-Arribas & Polo, 2009).

Για να γίνει αναλυτικός προσδιορισμός των πεπτιδίων από ένα τόσο σύνθετο μέσο, όπως το κρασί απαιτείται προετοιμασία του δείγματος καθώς, πριν γίνει οποιαδήποτε πεπτιδική ανάλυση και διαχωρισμός είναι σημαντική η απομόνωση των πεπτιδίων από τα υπόλοιπα συστατικά, όπως ενώσεις αζώτου υψηλού μοριακού βάρους και φαινόλες. Για να γίνει διαχωρισμός των πρωτεϊνών και των πεπτιδίων μπορούν να αξιοποιηθούν μοριακά χαρακτηριστικά όπως είναι:

- α) το μοριακό μέγεθος με χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (SEC),
- β) το καθαρό φορτίο με χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων (IEC),
- γ) την πολικότητα με χρωματογραφία ανάστροφης φάσης (RPC),

δ) την υδροφοβικότητα με χρωματογραφία πληροφορικής αλληλεπίδρασης (HIC), και

ε) την ικανότητα δέσμευσης συγκεκριμένων κοινωνικών ομάδων με χρωματογραφία συγγένειας (AC), (Flamini, Hyphenated techniques).

Για την απομόνωση πεπτιδίων από γλεύκη και οίνους, μία εκ των μεθοδολογιών που εφαρμόζονται είναι η υπερδιήθηση που επιτρέπει στα πεπτιδικά κλάσματα ενός συγκεκριμένου εύρους μοριακού βάρους να απομονώνονται από τα υπόλοιπα συστατικά, αναλόγως από την μοριακή μεμβράνη που χρησιμοποιείται. Αν πραγματοποιηθεί χρήση μεμβρανών αποκλεισμού έως 1000 Da, τα αμινοξέα και τα μικρά πεπτιδία θα απομονωθούν από τα υπόλοιπα συστατικά του οίνου που έχουν μεγαλύτερο μοριακό βάρος. Για τον διαχωρισμό των πεπτιδίων του κρασιού, η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η χαμηλή πίεση χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού σε στήλη Sephadex (Moreno-Arribas M.V. et al, 2002). Η χρωματογραφία χαμηλής πίεσης σε Sephadex LH20 οδηγεί σε ένα πρώτο διαχωρισμό των ενώσεων του οίνου. Επίσης, η χρήση PGC ως στατική φάση διευκόλυνε, λόγω του διαχωρισμού των πεπτιδίων από τις φαινολικές ενώσεις. Από την άλλη πλευρά το FSCE προσφέρει έναν μηχανισμό διαχωρισμού διαφορετικό από την HPLC και αντιπροσωπεύει μια απλή γρήγορη και αποτελεσματική μέθοδο ελέγχου της καθαρότητας των πεπτιδίων (Desportes C., et al, 2000).

Η χρωματογραφία χαμηλής πίεσης σε Sephadex LH20, επιτρέπει τον διαχωρισμό των πεπτιδίων σύμφωνα με το μοριακό τους μέγεθος. Η επιλογή του μεγέθους των πόρων της στήλης καθορίζεται από το εύρος των μοριακών βαρών των πεπτιδίων του δείγματος. Αυτή η μεθοδολογία χρησιμοποιείται για απομόνωση πεπτιδικών κλασμάτων γλυκών και κρασιών. Ο καθαρισμός των δειγμάτων από πιθανά υπάρχοντα μικρά ή μεγάλα μοριακά συστατικά, όπως είναι τα άλατα, τα οργανικά οξέα, οι υδατάνθρακες, οι φαινόλες και τα αμινοξέα, μπορεί να γίνει και μέσω έκλυσης πεπτιδίων, από την υδατική στήλη με διαλύματα οξικού οξέος ή χλωριούχου νατρίου ή μείγματα νερού και μεθανόλης ή νερού και αιθανόλης. Η τεχνική αυτή είναι ιδανική για ανάλυση πεπτιδίων χαμηλού μοριακού βάρους (<1000Da). Αυτές οι ενώσεις συνήθως εκλύονται στα χρωματογραφήματα μαζί με αμινοξέα, άρα είναι απαραίτητο να γίνει διαχωρισμός πριν την ανάλυση. Ως μέσω έκλυσης για το διαχωρισμό των πεπτιδίων από τα αμινοξέα έχει χρησιμοποιηθεί οξικό ρυθμιστικό διάλυμα. Στήλη SephadexG-10 με οξικό ρυθμιστικό διάλυμα έχει χρησιμοποιηθεί ως μέσο έκλυσης για το διαχωρισμό των πεπτιδίων σε δύο κλάσματα με Mr χαμηλότερο ή υψηλότερο από 700Da (Moreno-

Arribas M.V. et al, 2002), (Wine Chemistry and Biochemistry M. Victoria Moreno-Arribas M. Carmen Polo Editors).

Παρακάτω παρατίθενται ορισμένα παραδείγματα από τις χρωματογραφικές τεχνικές που έχουν εφαρμοστεί. Οι Acedo et al. χρησιμοποίησαν υγρή χρωματογραφία με χρήση στήλης χαμηλής πίεσης SephadexLH-20 σαν αρχικό βήμα για την κλασμάτωση των πεπτιδίων κρασιού, ενώ παρόμοιο πρωτόκολλο έχει εφαρμοστεί και από τους Desportes et al. Ακόμα έχει γίνει χρήση στήλης SephadexLH-20, με οξικό ρυθμιστικό διάλυμα ως μέσο έκλουσης για το διαχωρισμό των πεπτιδίων από τα αμινοξέα στο διαλυτό στην αιθανόλη κλάσμα κρασιού. Επίσης, σε αναλύσεις πεπτιδίων έχουν χρησιμοποιηθεί και στήλες C<sub>4</sub>, C<sub>8</sub> και C<sub>18</sub> ως στατική φάση στην υγρή χρωματογραφία. Η βουτυλ (C<sub>4</sub>) στατική φάση προτείνεται για μεγάλα και υδρόφοβα πεπτίδια ενώ στήλες C<sub>8</sub> και C<sub>18</sub> προτιμώνται για μικρά υδρόφιλα ή όχι τόσο υδρόφοβα πεπτίδια (Moreno-Arribas et al, 2002).

Μια ακόμα ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική είναι η υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (Reversed Phase-Liquid Chromatography, RP-LC). Στηρίζεται στη χρήση μιας υδρόφοβη στατικής φάσης και μιας πολικής κινητής φάσης. Κατά τον διαχωρισμό η έκλυση των πεπτιδίων πραγματοποιείται με βάση την υδροφοβικότητα και το μοριακό τους βάρος. Τα πεπτίδια χαμηλού μοριακού βάρους και υδροφοβικότητας λόγω της αλληλουχίας των αμινοξέων έχουν μικρό χρόνο συγκράτησης της στήλης και εκλούνται πρώτα (Acquah C., et al, 2019).

Σε μία από τις έρευνες για το διαχωρισμό των πεπτιδίων στο κρασί έγινε η εφαρμογή RP-LC μετά από το σχηματισμό πεπτιδικών παραγώγων με ορθοφθαλαλδεΐδη (OPA). Σε εργαστηριακή κλίμακα έχει αναπτυχθεί RP-LC χρησιμοποιώντας στήλη Nava-Pak C<sub>18</sub> υπό συνθήκες βαθμίδωσης για την ανάλυση πεπτιδίων με μοριακό βάρος μεγαλύτερο και χαμηλότερο από 700 Da από διαφορετικά γλεύκη, κρασιά και αφρώδεις οίνους (Moreno-Arribas M. V., et al, 2002). Συγκεκριμένα το 1996 οι Moreno-Arribas et al, μελέτησαν δείγματα μούστου οίνου βάσης και αφρώδεις οίνους των ποικιλιών Macabeo, Xarello, Chardonnay, Παρελλάδα. Τα δείγματα που μελετήθηκαν, είχαν παραμείνει 9, 12, 15 και 18 μήνες σε οινολάσπες. Η τεχνική RP-HPLC χρησιμοποιήθηκε για να διαχωριστούν υδρόφιλα και υδρόφοβα πεπτίδια και η τεχνική HPLC έχει χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό των πεπτιδίων. Σε αυτή την ερευνητική μελέτη στόχος των ερευνητών ήταν η ανίχνευση και διερεύνηση των συγκεντρώσεων των πεπτιδίων στα διαφορετικά δείγματα και σε διαφορετικές χρονικές περιόδους. Έχει προκύψει το συμπέρασμα πως υπάρχει αύξηση του λόγου του εμβαδού υδρόφοβων προς υδρόφιλων πεπτιδίων στα κρασιά. Πιθανότατα η

υδροφοβικότητα να σχετίζεται με την ποιότητα του αφρού και ίσως με την αύξησή της να δικαιολογείται και ο λόγος βελτίωσης της ποιότητας του αφρού με το πέρασμα του χρόνου στους αφρώδεις οίνους (Moreno-Arribas V., et al, 1996).

Επιπλέον, η υγρή χρωματογραφία έχει χρησιμοποιηθεί για το χαρακτηρισμό πεπτιδίων κρασιού και με άλλες αναλυτικές τεχνικές, με δυο τυπικά παραδείγματα να το επιβεβαιώνουν (Moreno-Arribas et al, 2002). Σύμφωνα με το πρώτο παράδειγμα οι Takayanagi και Yokotsuka το 1999, εφάρμοσαν χρωματογραφία διήθησης γέλης, ακολουθούμενη RP-HPLC, χρησιμοποιώντας στήλη Bondasphere C<sub>18</sub>, ώστε να διαχωρίσουν από κόκκινο κρασί Μοσχάτο Bailey 6 ανασταλτικά πεπτίδια της αγγειοτενσίνης I. Τα πεπτίδια που απομονώθηκαν είναι: LIPPGVPY, YYAPFDGIL, YYAPF, SWSF, WVPSVY, AWPf (Wine Chemistry and Biochemistry, Moreno-Arribas & Polo), (Takayanagi & Yokotsuka, 1999).

Το δεύτερο παράδειγμα αναφέρεται στη μελέτη των Desportes et al., 2000, σε δείγμα οίνου βάσης της ποικιλίας Chardonnay. Σκοπός ήταν η ανίχνευση πεπτιδίων που επηρεάζουν γευστικά τον οίνο. Τα πεπτίδια του οίνου που επηρεάζουν τη γεύση είναι συνήθως χαμηλής μοριακής μάζας. Συγκρίνοντας τα ήδη γνωστά πεπτίδια: Ile-Arg, Ile-Val, Phe-Lys, Tyr-Lys, Val-Ile, Lys-Met-Asn, Phe-Arg-Arg, Ser-Lys-The-Ser-Pro-Tyr, προέκυψε πως 3 από αυτά επηρεάζουν τη γεύση (πικρό, ξινό, umami). Έτσι, χρησιμοποίησαν RP-LC σε στήλη πορώδους άνθρακα με σκοπό την απομόνωση αρκετών μικρών πεπτιδίων κρασιού ( $M_r < 3.000$ ). Αρχικά το κρασί υπερδιηθήθηκε, ώστε να απομακρυνθούν οι ενώσεις με  $M_r > 3000$ , που αντιπροσωπεύουν κυρίως πρωτεΐνες και φαινολικά. Ενώ, τα μικρά μόρια απομακρύνθηκαν μερικώς με νανοδιήθηση. Μέσω των τεχνικών της υπερδιήθησης και της νανοδιήθησης πραγματοποιείται απομόνωση oligopeptidion με  $M_r < 3.000Da$ . Σε δείγματα πλούσια σε πεπτίδια η εφαρμογή HPLC σε πορώδη στήλη άνθρακα επέτρεψε την απομόνωση μικρών πεπτιδίων. Το HPLC μπορεί να συνδυαστεί με φασματομετρία μάζας όπου κάνει εφικτή τη δομική ταυτοποίηση των ενώσεων μετά το διαχωρισμό (Wine Chemistry and Biochemistry, Moreno-Arribas & Polo), (Desportes et al, 2000/2001), (Moreno-ArribasM. V., et al, 2002).

Για τον έλεγχο της καθαρότητας των συλλεγόμενων κλασμάτων από την HPLC έχει χρησιμοποιηθεί τριχοειδής ηλεκτροφόρηση με ελεύθερο διάλυμα (FSCE) (Wine Chemistry and Biochemistry, Moreno-Arribas & Polo), (Desportes et al, 2000/2001), (Moreno-ArribasM. V., et al, 2002). Σε νεότερη έρευνα των Desportes et al το 2001 έγινε ανάλυση λευκού οίνου βάσης της ποικιλίας Chardonnay, με σκοπό την απομόνωση πεπτιδίων χαμηλού μοριακού βάρους. Οι τεχνικές που εφαρμόστηκαν και σε αυτή τη μελέτη ήταν η HPLC σε στήλη πορώδους άνθρακα για το διαχωρισμό των

πεπτιδίων, έγινε έλεγχος καθαρότητας με FSCE , ακολούθησε η ανίχνευση με ηλεκτροφόρηση (CE) και τέλος έγινε έλεγχος αλληλουχίας με Edman. Το FSCE διαθέτει ένα μηχανισμό διαχωρισμού που βασίζεται στο μέγεθος και το φορτίο της διαλυμένης ουσίας σε δεδομένο pH. Μέσω της έγχυσης συνθετικών πεπτιδίων, κάτω από τις ίδιες συνθήκες διαχωρισμού, φάνηκε πως η ηλεκτροφορητική κινητικότητα θα μπορούσε να παρέχει ορισμένες πληροφορίες για τη σύνδεση των πεπτιδίων. Στα ηλεκτροφορήματα των μη καθαρών πεπτιδίων φάνηκε πως τα πεπτίδια εκλούστηκαν μαζί με άλλα πεπτίδια, νουκλειικές ενώσεις, φαινολικές ενώσεις ή αμινοξέα, μέσω της HPLC.

Τα υψηλότερα κλάσματα αναλύθηκαν περαιτέρω με HPLC και διαχωρίστηκαν με στήλη Porous graphitic carbon (PGC). Η επιλεγμένη στήλη διαχωρισμού για την HPLC δεν είναι μια παραδοσιακή στήλη οκταδεκυλίου C<sub>18</sub> αλλά μια PGC στήλη. Τα γραφικά φύλλα σχηματίζουν μια στατική φάση και είναι επίπεδα και ομογενή. Η ισχύς της προσρόφησης είναι ανάλογη της μοριακής επιφάνειας, γενικά έχει βρεθεί πως τα μόρια που μπορούν εύκολα να υιοθετήσουν μια επίπεδη διαμόρφωση διατηρούνται πιο ισχυρά στο PGC. Τα χρωματογραφήματα των συλλεγόμενων κλασμάτων σε PGC είναι εξαιρετικά πολύπλοκα. Μέσω αυτών των χρωματογραφημάτων φαίνεται να παρουσιάζονται πολυάριθμα πεπτίδια με μεγάλο εύρος πολυπλοκότητας και ουσίες που δεν σχετίζονται με πεπτίδια με Mr 3000, όπως αμινοξέα, οργανικά οξέα νουκλιικές ενώσεις και φαινολικές. Η στατική φάση παρουσιάζει το πλεονέκτημα του διαχωρισμού των πεπτιδίων από τις φαινολικές ενώσεις. Οι φαινολικές ενώσεις εκλύονται στο τέλος της βαθμίδας έκλουσης και τα πεπτίδια στην αρχή και στη μέση της βαθμίδας έκλουσης, λόγω της ικανότητάς της να διατηρεί έντονα τις αρωματικές ενώσεις. Η ιδιότητα αυτή επιτρέπει την αποφυγή της κάλυψης των πεπτιδικών κορυφών από φαινολικές κορυφές (Desportes C, et al, 2000).

Η τεχνική της ηλεκτροφόρησης FSCE (Ηλεκτροφόρηση με ελεύθερο διάλυμα) είναι μια κατάλληλη τεχνική για τη γρήγορη διαλογή και καθαρότητα του πεπτιδίου, μετά την κλασματική απομόνωση HPLC και πριν τον προσδιορισμό της πεπτιδικής αλληλουχίας (Desportes C., et al, 2001). Το FSCE χρησιμοποιεί ένα μηχανισμό διαχωρισμού διαφορετικό από αυτό της HPLC, ακόμα έχει πολύ μικρές απαιτήσεις δείγματος και buffer και είναι μια γρήγορη και απλή τεχνική που διαθέτει υψηλές δυνατότητες ανάλυσης. Το FSCE μπορεί να πραγματοποιήσει πρακτικούς διαχωρισμούς πεπτιδίων σε σύντομους χρόνους και επιτρέπει την ταχεία αξιολόγηση της καθαρότητας των συλλεγόμενων πεπτιδίων. Η καθαρότητα είναι απαραίτητη προϋπόθεση για τις δομικές έρευνες στην πεπτιδίων και φαίνεται πως η FSCE είναι μια καλή τεχνική μετά

την HPLC για επιλογή καθαρών πεπτιδίων και περαιτέρω ανάλυση. Μέσω των αποτελεσμάτων από το FSCE μπορούν να επιλεγθούν μερικά πιθανώς καθαρά πεπτίδια, ώστε να ταυτοποιηθούν προσδιορίζοντας την αλληλουχία των αμινοξέων τους (Desportes et al, 2000). Το αρνητικό χαρακτηριστικό της είναι πως είναι απαραίτητο τα πεπτίδια να διαφέρουν ως προς το φορτίο τους προκειμένου να διαχωριστούν εύκολα, διότι πεπτίδια παρόμοιου Mr που δεν περιέχουν αργινίνη, ιστιδίνη ή λυσίνη δεν θα διαχωριστούν καλά (Desportes et al, 2001).

Στις διάφορες υποκατηγορίες HPLC εντάσσεται και η χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (Size exclusion chromatography, SEC), όπου τα μόρια διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθός τους. Σε αυτή την κατηγορία ο κύριος όγκος της στατικής φάσης αποτελείται κυρίως από πόρους. Τα μόρια που είναι μεγαλύτερου μεγέθους από τους πόρους δεν μπορούν να περάσουν, έτσι αποκλείονται και εξέρχονται από τον αρχικό κενό όγκο έκλουσης. Από την άλλη πλευρά, τα μικρότερα από τους πόρους μόρια περνούν και εξέρχονται τελευταία, καθώς χρειάζονται περισσότερο χρόνο για να περάσουν το μέσο. Ανάλογα με το μέγεθος των πόρων διαχωρίζονται με αποτελεσματικότητα τα μόρια που έχουν μέγεθος σε ένα συγκεκριμένο εύρος. Τα μεγέθη που βρίσκονται εκτός αυτού του εύρους θα εκλουστούν μαζί με τις μεγαλύτερες ή μικρότερες ομάδες μορίων χωρίς να διαχωριστούν. Πιο ειδικά για να γίνει διαχωρισμός πρωτεϊνών και γενικότερα βιομορίων γίνεται χρήση υδατικών διαλυμάτων έκλουσης μέσω της τεχνικής χρωματογραφίας διήθησης γέλης (GFC) (Zhou M, et al, 2021).

Γενικά, η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (SEC) χρησιμοποιείται συχνά ως πρώτο στάδιο του διαχωρισμού των πεπτιδίων στο στάδιο της προκλασματοποίησης σε παρασκευασμένα κρασιά για τη λήψη του επιθυμητού μήκους αλυσίδας ή μοριακού βάρους πριν από το χαρακτηρισμό τους. Το SEC (μόνο ή μετά από υπερδιήθηση) χρησιμοποιήθηκε και για τη λήψη πεπτιδίων χαμηλής μοριακής μάζας καθώς και για την απομάκρυνση ανεπιθύμητων ενώσεων, όπως οι πολυφαινόλες (Zhou M, et al, 2021). Η τεχνική όπως αναφέρθηκε παραπάνω μπορεί να συνδυαστεί και με άλλες τεχνικές όπως η HPLC. Η απόδοσή του SEC-HPLC επηρεάζεται από ορισμένες παραμέτρους σχετικά με την απομόνωση και τον καθαρισμό των πεπτιδίων και τον ταυτόχρονο προσδιορισμό του μοριακού βάρους οι παράμετροι αυτοί είναι όγκος των πόρων η φύση της κινητής φάσης ιοντική ισχύς και ο τύπος της μήτρας στερεάς φάσης SEC, είναι απαραίτητες για την ελαχιστοποίηση ανεπιθύμητων υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ πεπτιδίων και αντιδράσεις πεπτίδιο στερεάς φάσης (Acquah C., et al, 2019).

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (RP-HPLC) όπως έχει προαναφερθεί, είναι ένα ισχυρό εργαλείο για καθαρισμό πεπτιδίων, και χρησιμοποιείται συχνά μετά από SEC. RP-HPLC μπορεί να συνδυαστεί με SEC, για ενισχυμένη ανάλυση των ενώσεων που υπάρχουν σε σύνθετα δείγματα. RP-HPLC έχει εφαρμοστεί με επιτυχία για τον καθαρισμό πεπτιδίων από σταφύλι κρασί, σάκε και κρασί από κινέζικο ρύζι (Zhou M, et al, 2021). Επιπλέον RP-HPLC μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για το διαχωρισμό πεπτιδίων που προέρχονται από την πρωτεολυτική πέψη των πρωτεϊνών του οίνου που διαχωρίζονται και αποβάλλονται από πρωτεολυτική πλάκα γέλης (Flamini, Hyphenated techniques, κεφάλαιο 7).

Σε έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί σχετικά με τον προσδιορισμό πεπτιδίων σε αφρώδεις οίνους μία από τις τεχνικές που έχουν εφαρμοστεί είναι η χρήση χρωματογραφίας ανάστροφης φάσης ζεύγους ιόντων (IP-RPLC) και φασματομετρία μάζας ηλεκτροψεκασμού (ESI-MS). Το 2004 οι De Person et al, εφάρμοσαν την παραπάνω τεχνική με σκοπό τον προσδιορισμό ορισμένων δι- και τριπεπτιδίων σε αφρώδεις οίνους χωρίς να απαιτείται προετοιμασία δείγματος. Τα διπεπτίδια που ανιχνεύτηκαν είναι: Arg-Ile, Ile-Arg, Ile-Val, Lys-Phe, Lys-Tyr, Phe-Lys, Tyr-Gln, Tyr-Lys, Val-Ile, ενώ απουσίαζαν τα τριπεπτίδια Phe-Arg-Arg και Lys-Met-Asn. Η ανάπτυξη του χρωματογραφικού συστήματος πραγματοποιείται με σύστημα ανίχνευσης της σκέδασης του φωτός (ELSD). Το ELSD είναι ένας φθηνός τρόπος για την ανάπτυξη χρωματογραφικών μεθόδων που μπορούν να μεταφερθούν απευθείας στο LC-MS. Η πειραματική ταυτοποίηση των πεπτιδίων σε διαφορετικούς αφρώδεις οίνους βασίστηκε στα φάσματα MS/MS και ο χρόνος κατακράτησής τους συγκριτικά με τα πρότυπα πεπτιδίων δοκιμάστηκε υπό τις ίδιες συνθήκες. Λόγω της υψηλής της εξειδίκευσης μειώνεται η ανάγκη για ισχυρά χρωματογραφικά συστήματα, όπου όλες οι ενώσεις ενδιαφέροντος έχουν διαχωριστεί πριν την ανίχνευση ελαχιστοποιώντας το χρόνο ανάλυσης. Γενικά το online LC-MS/MS είναι ένα χρήσιμο αναλυτικό εργαλείο για τον προσδιορισμό πεπτιδίων χαμηλού μοριακού βάρους σε διάφορες βιολογικές μήτρες (De Person M., et al, 2004).

Αφού απομονωθούν από το κρασί τα πεπτιδικά κλάσματα του Mr ενδιαφέροντος κυρίως με υπερδιήθηση ή SEC, ο διαχωρισμός τους γίνεται σε στήλη C<sub>4</sub> για μεγάλα και υδρόφοβα πεπτίδια σε C<sub>8</sub> ή C<sub>18</sub> για μικρά και πιο υδρόφιλα πεπτίδια. Λόγω αρκετών παρεμβολικών ενώσεων που απορροφούν σε αυτό το εύρος γίνεται παραγωγοποίηση των πεπτιδίων μετά τη στήλη με ορθο-φθαλαλδεΐδη (OPA), ενώ μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ανίχνευση φθορισμού (Flamini, hyphenated techniques).



Για την ανίχνευση των πεπτιδίων χρησιμοποιείται η απορρόφηση σε μήκος κύματος 200-220nm. Για πεπτίδια με αρωματικά υπολείμματα το μήκος ανίχνευσης είναι στα 254nm (σε πεπτίδια με αμινοξέα φαινυλαλανίνη τυροσίνη και τρυπτοφάνη) ή στα 280nm (τυροσίνη και τρυπτοφάνη). Συγκεκριμένα για το κρασί, πρέπει να ληφθεί υπόψιν πως αρκετές από τις ενώσεις του μπορεί να επηρεάζουν την απορρόφηση UV όταν χρησιμοποιούνται μικρότερα μήκη κύματος, έτσι εφαρμόζονται επιλεκτικότερες και πιο ευαίσθητες μέθοδοι ανίχνευσης. Ακόμα, μπορούν να σχηματιστούν παράγωγα πεπτιδίων που ανιχνεύονται σε μεγαλύτερα μήκη κύματος και είναι περισσότερο επιλεκτικά. Μια ιδιαίτερα χρήσιμη τεχνική ανίχνευσης είναι αυτή του φθορισμού. Εκμεταλλευόμενοι το φυσικό φθορισμό ορισμένων αμινοξέων, όπως η τυροσίνη και η τρυπτοφάνη. Έτσι μπορούν να ανιχνευτούν με φθορισμό πεπτίδια που περιέχουν αυτά τα αμινοξέα. Ωστόσο, αν τα πεπτίδια δεν φθορίζουν χρήσιμη λύση αποτελεί ο σχηματισμός παραγωγών με παράγοντες παραγοντοποίησης, όπως είναι το αντιδραστήριο OPA (ορθοφθαλδεΐδη). Ο σχηματισμός παραγωγών μπορεί να πραγματοποιηθεί τόσο πριν τη στήλη (pre-column derivatization) όσο και μετά τη στήλη (post-column derivatization). Η μετά τη στήλη αντίδραση OPA έχει το πλεονέκτημα εντοπισμού πρώτα των φυσικών πεπτιδίων με UV και έπειτα των παραγωγών με φθορισμό (Bartolomé b., et al, 1997).

Για την ταυτοποίηση μικρών πεπτιδίων έχει εφαρμοστεί HPLC αντίστροφης φάσης με ανίχνευση συστοιχίας φωτοδιόδου (PDAD) και έπειτα παραγωγοποίηση με ορθοφθαλδεΐδη (OPA). Οι φασματικές παράμετροι που λαμβάνονται από το PDAD επιτρέπουν την ταυτοποίηση υπολειμματικών αρωματικών αμινοξέων (συνήθως τυροσίνη, φαινυλαλανίνη και τρυπτοφάνη), που υπάρχουν στα πεπτίδια αλλά και ταυτοποίηση άλλων ενώσεων που εκκλύονται μαζί με τα πεπτίδια. Τα παραπάνω αμινοξέα παρουσιάζονται στο φάσμα UV-VIS με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά. Για το διαχωρισμό των πεπτιδίων εφαρμόζεται κυρίως υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης RP-HPLC και τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (CE). Το 1997 οι Bartolome et al., αναφέρουν τη χρήση μιας συστοιχίας ανίχνευσης φωτοδιόδου HPLC (HPLC-PDAD) και της παραγωγοποίησης OPA μετά τη στήλη, με σκοπό το χαρακτηρισμό μικρών πεπτιδίων λευκού οίνου. Η αρχική εφαρμογή πραγματοποιήθηκε σε ευρύ φάσμα τυπικών πεπτιδίων και στη συνέχεια εφαρμόστηκε επιτυχώς στον προσδιορισμό του πεπτιδικού κλάσματος (<700Da) των αφρωδών οίνων (cavas), με σκοπό την ταυτοποίηση του πεπτιδικού κλάσματος. Από τις φασματικές μετρικές παραμέτρους όπως: τα μήκη κύματος των φασματικών μέγιστων, το διάστημα κυρτότητας και τα μήκη κύματος της δεύτερης παραγωγού, μέσω των φασματικών

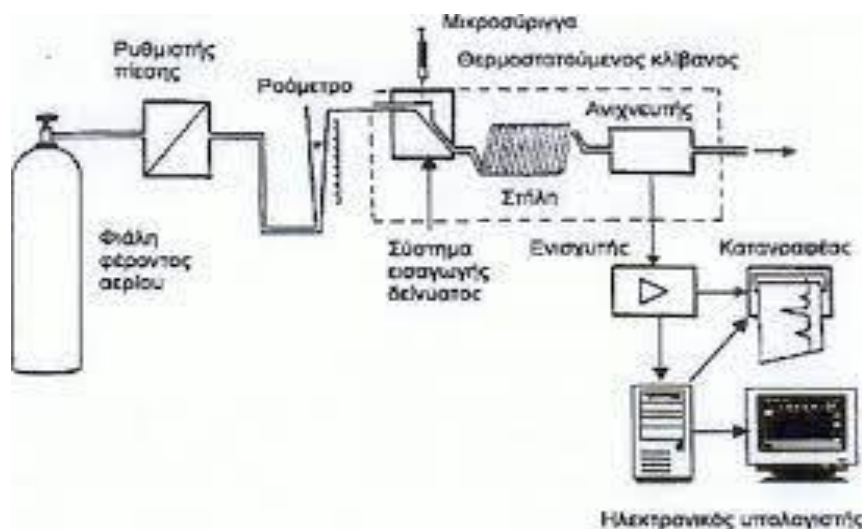
μέγιστων από το PDAD, είναι εφικτή η αναγνώριση των υπολειμματικών αρωματικών αμινοξέων που υπάρχουν στα πεπτίδια, καθώς είναι εφικτή η ταυτοποίηση άλλων ενώσεων του κρασιού που συνεκλούνται με πεπτίδια (Moreno-Arribas M. V., et al, 2002), (Bartolomé b., et al, 1997), (Moreno-Arribas & Polo, Wine Chemistry and Biochemistry).

Οι τελικές α-αμινομάδες των πεπτιδίων αντιδρούν ποσοτικά με αντιδραστήρια όπως η νινυδρίνη, ώστε να σχηματιστούν έγχρωμα παράγωγα ή αντιδρούν με οφθαλαλδεΐδη (OPA) και φλουορεσκαμίνη, για να σχηματιστούν φθορίζοντα παράγωγα. Μέσω αυτών των αντιδράσεων επιτυγχάνεται ο ποσοτικός προσδιορισμός των ολιγοπεπτιδίων στο κρασί και ανιχνεύονται κατά τη χρωματογραφική ανάλυση. Η περιεκτικότητα σε πολυπεπτίδια προσδιορίζεται με ανάλυση των αρωματικών αμινοξέων τυροσίνης και τρυπτοφάνης και επιτυγχάνεται με μέτρηση της απορρόφησης στα 280nm ή με μέτρηση του χρώματος των αντιδράσεων των αμινοξέων με ορισμένα αντιδραστήρια όπως το Folin-Ciocalteu. Οι παραπάνω αναλύσεις ισχύουν μόνο για αναλύσεις πεπτιδίων κρασιού έπειτα από μεγάλα στάδια καθαρισμού λόγω παρουσίας ελευθέρων αμινοξέων, παραγώγων στην περίπτωση του OPA, και παρουσίας φαινολικών ενώσεων, οι οποίες απορροφούνται στα 280nm και αντιδρούν με Folin-Ciocalteu. Οι παραπάνω μεθοδολογίες δεν δίνουν πληροφορίες για την ποσότητα και τη φύση των πεπτιδίων και έτσι χρησιμοποιούνται χρωματογραφικές ή ηλεκτροφοριστικές τεχνικές (Moreno-Arribas & Polo, Wine Chemistry and Biochemistry).

### 5.2.2 Αέρια χρωματογραφία

Η αέρια χρωματογραφία είναι μια τεχνική που βασίζεται στο διαχωρισμό ενώσεων στόχων που παρασύρονται από αέρια κινητή φάση, στη διαφορετική αλληλεπίδραση μεταξύ τους και της στατικής φάσης. Η σύζευξη του με το MS το καθιστά αρκετά ευαίσθητο εργαλείο. Το GS-MS δίνει ένα χαρακτηριστικό φάσμα που ονομάζεται υπογραφή ή δακτυλικό αποτύπωμα, είναι από τις πιο χρησιμοποιούμενες τεχνικές λόγω της υψηλής ικανότητας διαχωρισμού και αναπαραγωγικής ικανότητας. Στον τομέα του οίνου έχει χρησιμοποιηθεί ιδιαίτερα στις μελέτες ωμικής (omics), που κατά κύριο λόγο είναι μη στοχευμένες προσεγγίσεις. Συνήθως, μετά την αέρια χρωματογραφία ακολουθεί η ύπαρξη φασματογράφου μάζας υψηλότερης ανάλυσης, όπως το TOF (Time-of-flight), βελτιώνοντας έτσι την ευαισθησία και την ακρίβεια της αναγνώρισης GC-MS. Ωστόσο, με την GC-MS περιορίζεται η ανίχνευση πτητικών και

ημιπηκτικών ενώσεων που βρίσκονται συνήθως σε μικρότερο ποσοστό στο δείγμα. Το βασικό μειονέκτημα είναι ο χειρισμός του δείγματος πριν την ανάλυση, που στόχο έχει τη δημιουργία εκχυλισμάτων συμβατών με την τεχνική GC.



Εικόνα 13. Αναπαράσταση τυπικού συστήματος αέριας χρωματογραφίας ([https://www.google.com/url?sa=i&url=http%3A%2F%2Fnestor.teipel.gr%2Fxmlui%2Fbitstream%2Fhandle%2F123456789%2F14658%2FSTEG\\_TEGEP\\_00477\\_Medium.pdf%3Fsequence%3D1&psig=AOVAvw00zvhD3Hla7nIVoWJo811Z&ust=1686747362364000&source=images&cd=vfe&ved=0CBEOjRxqFwoTCkDt8tylwP8CFQAAAAAdAAAAABAd](https://www.google.com/url?sa=i&url=http%3A%2F%2Fnestor.teipel.gr%2Fxmlui%2Fbitstream%2Fhandle%2F123456789%2F14658%2FSTEG_TEGEP_00477_Medium.pdf%3Fsequence%3D1&psig=AOVAvw00zvhD3Hla7nIVoWJo811Z&ust=1686747362364000&source=images&cd=vfe&ved=0CBEOjRxqFwoTCkDt8tylwP8CFQAAAAAdAAAAABAd)).

Μερικές φορές χρειάζεται προεπεξεργασία του δείγματος για να ενισχυθεί η μεταβλητότητα και θερμική σταθερότητα του μεταβολικού ενδιαφέροντος. Μια ιδιαίτερα χρησιμοποιούμενη διαδικασία προεπεξεργασίας για την GC-MS, είναι η παραγωγοποίηση δείγματος και διεξάγεται για βελτίωση της χρωματογραφικής απόκρισης. Περισσότερο εφαρμόζεται η διαδικασία παραγωγοποίησης δύο σταδίων.

Από την άλλη πλευρά, η ανάλυση GC-MS απαιτεί κάθε φορά μια διαδικασία εκχύλισης προκειμένου να απομονωθούν οι μεταβολίτες και να ενισχυθεί η συγκέντρωσή τους. Η εκχύλιση των μεταβολιτών είναι ίσως το πιο κρίσιμο βήμα της μεταβολομικής και η απομόνωσή τους μπορεί να γίνει μέσω διαφορετικών τεχνικών εκχύλισης. Η επιλογή της κατάλληλης τεχνικής εξαρτάται από τη φύση και τις ιδιότητες των ενώσεων στόχων. Αν και η εκχύλιση υγρού- υγρού (LLE) έχει χρησιμοποιηθεί σε ορισμένες οίνο-μικές μελέτες οι μέθοδοι εκχύλισης που βασίζονται σε προσροφητικά όπως η εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) εφαρμόζονται συχνότερα στην GC-MS.

Η εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) αποτελεί μια αποτελεσματική μέθοδο απομάκρυνσης παρεμβατικών ουσιών και εμπλουτισμού των αναλυτών. Το SPE μπορεί να αντιμετωπίσει τα συγκεκριμένα μοριακά χαρακτηριστικά των αναλυτών στόχων και

είναι περισσότερο επιλεκτικό από το LLE. Μια μορφή του SPE, είναι η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (SPME), όπου μια ίνα είναι επικαλυμμένη με ένα λεπτό στρώμα προσροφητικού υλικού είναι ευρέως χρησιμοποιούμενη στην ανάλυση GC. Είναι βολικό στον συνδυασμό και στη χρήση με GC, λόγω της θύρας έγχυσης του αερίου χρωματογράφου που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για θερμική εκρόφηση (TD) αναλυτών από την ίνα. Το βασικό πλεονέκτημα των μικροσκοπικών εκδόσεων των τεχνικών είναι ότι αυτοματοποιούνται εύκολα από τις εμπορικές συσκευές αυτόματης δειγματοληψίας που ελέγχουν καλύτερα τη θερμοκρασία και την ανάδευση στη διαδικασία εκχύλισης, ενώ περιέχουν και περισσότερα αναπαραγώγιμα αποτελέσματα από χειροκίνητες συσκευές. Αν και το HS-SPME περιορίζεται στην ανάλυση πιο πτητικών ενώσεων, χρησιμοποιείται συνήθως στην GS-MS, γιατί είναι πιο γρήγορο και βολικό (Alanon M, et al, 2016).

Οι μελέτες για την ανάλυση των πεπτιδίων που έχουν πραγματοποιηθεί με αέρια χρωματογραφία είναι λιγότερες συγκριτικά με αυτές που έχουν γίνει με υγρή χρωματογραφία. Η πλειοψηφία αυτών συναντάται συνδυαστικά με τη μεταβολομική, που αποτελεί ένα ανερχόμενο κλάδο στις μεθόδους προσδιορισμού και ανάλυσης των πεπτιδίων.

### **5.3 Φασματομετρία μάζας**

Η φασματομετρία μάζας (MS) είναι μια αναλυτική τεχνική που στηρίζεται στο διαχωρισμό ιονισμένων μορίων (αέρια ιόντα), ανάλογα με την αναλογία φορτίου/μάζας. Ενώ εξ αρχής η MS δεν συνηθιζόταν για τον προσδιορισμό πρωτεϊνών και πεπτιδίων, μετέπειτα μέσω του συνδυασμού διεπαφών και συστημάτων ιονισμού έχουν προκύψει και νέες συζεύξεις CE-MS και LC-MS. Εφαρμογή γίνεται και για την ανάλυση της πρωτογενούς δομής των πεπτιδίων και των πρωτεϊνών. Η τεχνική αυτή έχει πολλά πλεονεκτήματα, καθώς χρειάζονται μικρές ποσότητες δείγματος, το οποίο δεν απαιτεί μεγάλη προετοιμασία και επιφέρει χρήσιμες πληροφορίες για ενώσεις χαμηλού Mr. Πιο στοχευμένα πάνω σε αυτά τα δεδομένα εστίασαν οι Weiss et al., που μελέτησαν την πρωτεϊνική σύνθεση σε 3 ποικιλίες λευκού οίνου και σε τι βαθμό επηρεάζει το θόλωμα (Moreno-Arribas et al, 2002). Η βασική αρχή λειτουργίας των τεχνικών MS είναι στην αναλογία φορτίου μάζας ( $m/z$ ) των μορίων που ιονίζονται από συγκρούσεις ηλεκτρονίων ακτινοβολίας λέιζερ ή από αλληλεπίδραση με ηλεκτρικά πεδία. Αρκετές μέθοδοι από την έχουν εφαρμοστεί σε συνδυασμό με άλλες τεχνικές για τη μελέτη πεπτιδίων και πρωτεϊνών οίνου (Flamini hyphenated techniques).

Τα βασικά μέρη ενός φασματομέτρου μάζας είναι η πηγή ιόντων (ανάλογα με το ποια ιόντα παράγονται), ο αναλυτής ιόντων (όπου γίνεται διαχωρισμός ιόντων και η αναλογία προσδιορίζεται με υψηλή ακρίβεια) και οι ανιχνευτές ιόντων. Τα δεδομένα MS καταγράφονται ως φάσματα μάζας, που είναι δισδιάστατα γραφήματα που εμφανίζουν την ένταση των ιόντων σε σχέση με το λόγο μάζας-υπερφόρτωσης ( $m/z$ ). Με τη μέτρηση του  $m/z$  γίνεται γνωστό το μοριακό βάρος. Μέσω αυτών γίνεται εφικτή η ανάλυση αέριων πολυπεπτιδίων, πρωτεϊνών, πολυσακχαριτών υψηλής ακρίβειας και σύνθετων λιπιδίων που καλύπτουν όλο το φάσμα συστατικών των τροφίμων. Ο ιοντισμός ηλεκτροψεκασμού (ESI) και η φασματομετρία εκρόφησης με λέιζερ (MALDI) αποτελούν τις δύο πιο κοινές τεχνικές για την MS (Gallo M, Ferranti P, 2015).

Οι πρωτεΐνες που υπάρχουν στο κρασί και τα σχετικά πεπτίδια τους διαθέτουν ένα χαρακτηριστικό δακτυλικό αποτύπωμα που προκύπτει από τη φασματομετρία μάζας (MS-FP), το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί, σε συνδυασμό με εργαλεία πληροφορικής και στατιστικής, για την ιχνηλασιμότητα και τον ποιοτικό έλεγχο στο οινοβιομηχανία. Παρά τις δυνατότητές του MS-FP για σκοπούς ελέγχου στο κρασί, των πρωτεϊνών ή και των πεπτιδίων αυτού δεν έχει ακόμη αξιοποιηθεί πλήρως. Το γεγονός αυτό οφείλεται σε πολλούς βασικούς παράγοντες. Η δυσκολία απομόνωσης του πρωτεϊνικού κλάσματος από το κρασί, που είναι μια σύνθετη μήτρα, είναι ένα πρόβλημα. Η συχνά εσφαλμένη χρήση εργαλείων πληροφορικής ή/και στατιστικής είναι ένα άλλο μειονέκτημα του MS-FP. Έτσι, σε ορισμένες δημοσιεύσεις τα δακτυλικά αποτυπώματα συνεισφέρουν στον έλεγχο του κρασιού, αλλά δεν έχει γίνει αναφορά για τον τρόπο διαχωρισμού των διαφορετικών ποικιλιών κρασιού. Τέλος, δεν έχουν γίνει κατανοητές ορισμένες βασικές έννοιες στην εφαρμογή αναλυτικών τεχνικών που βασίζονται σε MS εργαλείων που εμποδίζουν τη γενική εφαρμογή του MS-PF των κρασιών. Τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα του MS-FP για τον ποιοτικό έλεγχο του κρασιού, εστιάζοντας σε τρεις κύριες πτυχές είναι :

- (i) οι διαφορές χειρισμού του δείγματος που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση των πρωτεϊνών,
- (ii) οι διαφορές στις προσεγγίσεις που βασίζονται σε MS για τη λήψη του δακτυλικού αποτυπώματος και
- (iii) τα βασικά εργαλεία πληροφορικής και στατιστικής που χρησιμοποιούνται για την εξαγωγή πληροφοριών από τα φάσματα MS (Nunes-Miranda JD, et al, 2013).

Η απομόνωση των πεπτιδίων που υπάρχουν στο κρασί, είναι πιο περίπλοκη συγκριτικά με την περίπτωση των πρωτεϊνών. Η λήψη δακτυλικών αποτυπωμάτων από

πρωτεΐνες ή πεπτίδια, διαφέρει σημαντικά επειδή το επίπεδο των πληροφοριών που ανακτώνται είναι διαφορετικό. Ο αριθμός των κορυφών που λαμβάνονται εάν χρησιμοποιούνται οι πρωτεΐνες για το MS-FP είναι πολύ μικρότερο από αυτό που λαμβάνεται χρησιμοποιώντας τα πεπτίδια που προκύπτουν από τη διάσπαση των πρωτεϊνών. Γενικά, προτιμάται η χρήση των πεπτιδικών ενώσεων έναντι των πρωτεϊνών για τη λήψη δακτυλικών αποτυπωμάτων. Επιπλέον, το λευκό κρασί έχει εφαρμοστεί συχνότερα σε μελέτες δακτυλικών αποτυπωμάτων συγκριτικά με το κόκκινο. Το κόκκινο κρασί είναι πολύ πιο περίπλοκο από το λευκό κρασί, απαιτώντας περισσότερη επεξεργασία (Nunes-Miranda et al, 2013).

Για να γίνει λήψη του δακτυλικού αποτυπώματος μέσω της φασματομετρίας μάζας, μπορούν να εφαρμοστούν αρκετές τεχνικές ιοντισμού, δύο από τις πιο σημαντικές είναι η εκρόφηση με λέιζερ υποβοηθούμενη από μήτρα φασματομετρίας μάζας χρόνου πτήσης ιονισμού (MALDI TOF MS) και η φασματομετρία μάζας ιονισμού ηλεκτροψεκασμού (ESI-MS), χρησιμοποιείται συνήθως για την αναγνώριση αλληλουχιών πεπτιδίων. Ένας συνδυασμός τεχνικών που εφαρμόζεται συχνά είναι η υγρή χρωματογραφία με διαδοχική φασματομετρία μάζας ιονισμού ηλεκτροψεκασμού (LC-ESI-MS/MS) χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των πεπτιδικών προφίλ διαφορετικών τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων του κρασιού από ρύζι (Zhou M, et al, 2021).

Το ESI παράγει λίγα ιόντα θραυσμάτων με άφθονα μοριακά είδη και το δείγμα πρέπει να διαλύεται σε κατάλληλο αεραγωγό διαλύτη, ενώ το MALDI δίνει λίγο ή καθόλου κατακερματισμό με σπάνια μοριακά είδη και το δείγμα πρέπει να εφαρμοστεί σε κατάλληλη μήτρα. Εάν το βήμα προετοιμασίας του δείγματος είναι πλήρως αποσυνδεδεμένο από την ανάλυση MS, μπορεί να γίνει άμεση λήψη δακτυλικών αποτυπωμάτων είτε με ESI είτε με MALDI, και τα δύο έχουν τα ίδια πλεονεκτήματα όσον αφορά την ταχύτητα ανάλυσης και χειρισμού. Εάν το βήμα προετοιμασίας του δείγματος δεν είναι αποσυνδεδεμένο, τότε το ESI προσφέρει το μοναδικό πλεονέκτημα της υψηλότερης απόδοσης δείγματος. Η ανάλυση MALDI επιτρέπει την ανεξάρτητη βελτιστοποίηση του δείγματος χειρισμός, ενώ στο συνδυασμό LC-MS/MS απαιτείται ταυτόχρονη βελτιστοποίηση των συνθηκών LC και MS ή MS/MS. Ίσως το MALDI μπορεί να παρέχει φάσματα με λιγότερο περιττές πληροφορίες, ενώ στο ESI για το ίδιο πεπτίδιο η αναλογία μάζας προς φορτίο μπορεί να ποικίλλει πολύ και επομένως οι κορυφές  $m/z$  που ανήκουν στο ίδιο πεπτίδιο να διαφέρουν επίσης πολύ. Δακτυλικό αποτύπωμα με MALDI χρησιμοποιήθηκε για τη διαφοροποίηση των ερυθρών κρασιών. (Nunes-Miranda JD, et al, 2013).

Όταν χρησιμοποιούνται συστήματα ηλεκτροψεκασμού (ESI), υποβοηθούμενες από μήτρα εκροφητικού λέιζερ (MALDI) και MSStandem(MS/MS) λαμβάνονται δομικές πληροφορίες για την αλληλουχία αμινοξέων και πρωτεϊνών. Στο συνδυασμό ESI-MS το δείγμα διαλύεται σε ένα διαλύτη και διανέμεται στην πηγή ιονισμού του φασματομέτρου μάζας μέσω ενός μεταλλικό τριχοειδούς βέλους. Το ESI μπορεί να συνδεθεί εύκολα με τεχνικές LC, CE (Flamini hyphenated techniques).

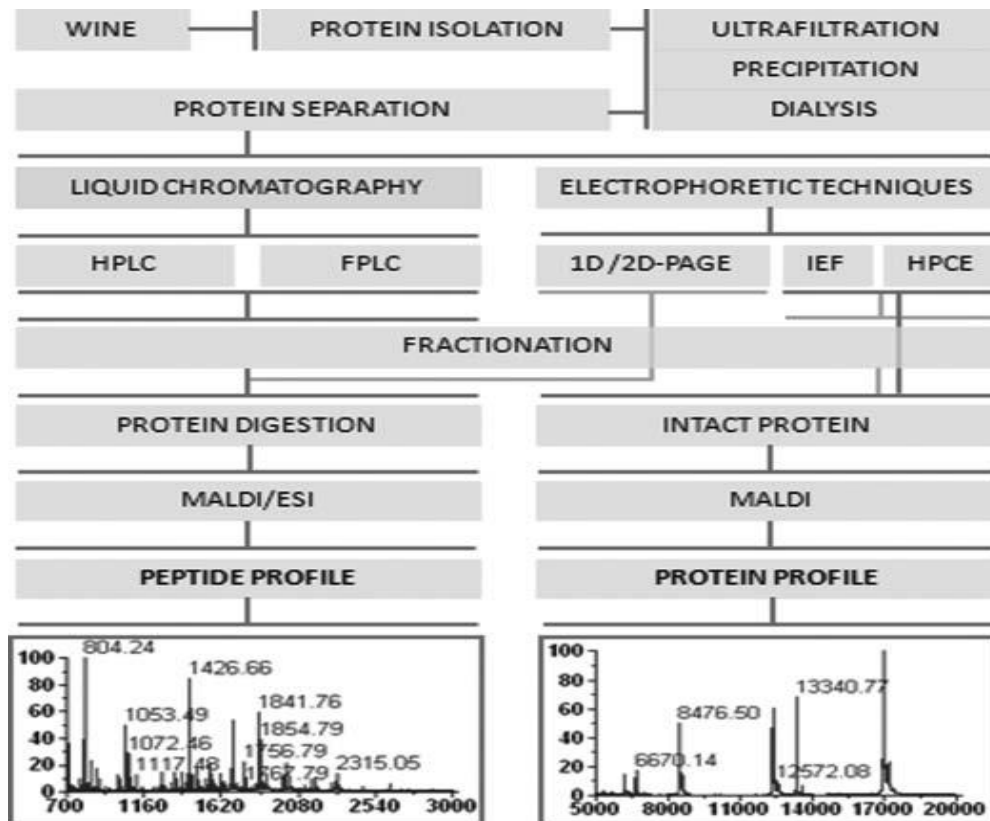
Παρακάτω αναφέρεται μια έρευνα που έχει πραγματοποιηθεί με την τεχνική MALDI. Οι Monteiro et al, (2001) τόνισαν την υψηλή ομοιογένεια μεταξύ πεπτιδίων που απομονώνονται από εκχυλίσματα πρωτεϊνών κρασιού. Ωστόσο, μια πιο λεπτομερής εξέταση ολόκληρου του κλάσματος πρωτεΐνης, με συνδυασμό τεχνικών, έδειξε ότι τα κρασιά που μελετήθηκαν αποτελούνται από έναν πολύ μεγάλο αριθμό (πολλές δεκάδες και, πιθανώς, πολλά άλλα) διακριτών πολυπεπτιδίων, που παρουσιάζουν παρόμοιες μοριακές μάζες. Αυτό μπορεί να αποτελέσει πρόβλημα για τη λήψη δακτυλικών αποτυπωμάτων από το direct-MALDI, καθώς διαφορετικά πεπτίδια θα δημιουργήσουν ίδιες κορυφές, καθιστώντας έτσι δυσκολότερη τη δυνατότητα διάκρισης, λόγω της απώλειας πληροφοριών που προκαλείται από το ύπαρξη κορυφών με την ίδια μάζα, δηλαδή η ίδια κορυφή  $m/z$  που ανήκουν σε διαφορετικά πεπτίδια. Επίσης το 2007 οι Carpentieri et al έχοντας διαφορετικά δείγματα ερυθρού οίνου εφάρμοσαν απευθείας MALDI για τη λήψη δακτυλικού αποτελέσματος, χωρίς να προηγηθεί επεξεργασία του δείγματος. Σκοπός ήταν η ανίχνευση βασικών ενώσεων ακόμη και σε ίχνη που μπορεί να διαφέρουν από εσοδεία σε εσοδεία (Nunes-Miranda JD, et al, 2013).

Το 2009 οι Chambery et al λαμβάνοντας 7 δείγματα λευκού οίνου που προερχόταν από την περιοχή της Καμπανίας εφάρμοσαν την τεχνική MALDI-TOF, με σκοπό τη λήψη αξιόπιστων πεπτιδικών αποτυπωμάτων. Η MALDI-TOF αποτελεί μια ταχεία μέθοδο για τη δημιουργία του προφίλ των πεπτιδίων που έχουν προκύψει από την πέψη των πρωτεϊνών οίνου. Για να ληφθεί το προφίλ από πρωτεολυτικά πεπτίδια γίνεται ανάλυση φασματομετρίας μάζας MALDI-TOF και βιοπληροφορική απεικόνιση ιοντικών σημάτων. Η χρήση προφίλ πεπτιδίων παρέχει καλής ποιότητας δεδομένα με ακριβείς μετρήσεις μάζας και είναι προσβάσιμα σε εκτεταμένο εύρος μοριακού βάρους πρωτεϊνών. Είναι γεγονός πως οι μεγαλύτερες πρωτεΐνες μπορούν να ανιχνευθούν πιο εύκολα, καθώς δημιουργούν μεγάλο αριθμό πεπτιδίων. Με αυτή την τεχνική αυξάνεται η πολυπλοκότητα του μείγματος και η ευαισθησία του MALDI-TOF βελτιώνεται σημαντικά για τα πεπτίδια συγκριτικά με τις πρωτεΐνες Το MALDI-TOF παρέχει καλή ακρίβεια μάζας και ευαισθησία, ενώ απαιτεί πολύ μικρό δείγμα για ανάλυση (Flamini βιβλίο hyphenated techniques), (Chambery A., et al, 2009).

Από την άλλη πλευρά όσο αφορά την τεχνική ESI-MS μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε απευθείας λειτουργία για να ληφθεί το δακτυλικό αποτύπωμα των κρασιών. Έχει προκύψει πως ο συνδυασμός των αρνητικών και θετικών χαρακτηριστικών του τρόπου λειτουργίας του ESI καθιστά εφικτή την παρακολούθηση πολλών ενώσεων σε λευκά και κόκκινα κρασιά. Το πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η απλότητά της επειδή δεν απαιτείται επεξεργασία του δείγματος. Οι Catharino et al. το 2006 στην έρευνά τους χρησιμοποίησαν δείγματα γλεύκους από 6 διαφορετικές ποικιλίες σταφυλιών που βρίσκονταν στο στάδιο της ζύμωσης και αντίστοιχα δείγματα κρασιού μετά το τέλος της μηλογαλακτικής ζύμωσης και τα ανέλυσαν με ESI-MS. Βρήκαν ότι τα διαγνωστικά ιόντα για το γλεύκος ήταν διαφορετικά από αυτά σε δείγματα κρασιού, επίσης ανιχνεύθηκαν και μικρές παραλλαγές για καθεμία από τις ποικιλίες σταφυλιών που μελετήθηκαν. Τέλος αξίζει να αναφερθεί πως τα δακτυλικά αποτυπώματα ESI-MS μπορούν να ανιχνεύουν κοινά διαγνωστικά ιόντα για το κρασί, καθώς και να αποκαλύπτουν διαφορές μεταξύ κρασιών που παρασκευάζονται από διάφορες ποικιλίες σταφυλιών (Catharino et al., 2006), (Nunes-Miranda JD, et al, 2013).

Είναι αναμενόμενο η διαδικασία της λήψης δακτυλικών αποτυπωμάτων πρωτεϊνών και πεπτιδίων να επηρεάζεται από ορισμένους παράγοντες, οι οποίοι είναι πρώτον η άφθονη παρουσία πρωτεϊνών που υπερτερούν στο φάσμα και αποτρέπουν και μειώνουν τα άφθονα πρωτεϊνικά σήματα. Δεύτερον, ο μεγάλος αριθμός των παρεμβαλλόμενων ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους, όπως οι πολυφαινόλες, τα άλατα, τα οποία επηρεάζουν την ένταση του σήματος αυξάνοντας τον χημικό θόρυβο στο φάσμα της μάζας. Ένας ακόμα παράγοντας που επηρεάζει είναι η χαμηλή συγκέντρωση των πρωτεϊνών στο κρασί που γίνεται στην προετοιμασία του δείγματος, ώστε να προκύψει καθαρό και συμπυκνωμένο εκχύλισμα εμπλουτισμένο με σημαντικές πρωτεΐνες (Nunes-Miranda JD, et al, 2013).





Εικόνα 14. Συνήθεις μέθοδοι διεξαγωγής δακτυλικών αποτυπωμάτων κρασιού με βάση τη φασματομετρία μάζας. (Nunes-Miranda et al, 2013).

#### 5.4 ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ (Metabolomics)/ ΠΕΠΤΙΔΟΜΙΚΗ (Peptidomics)

Μια ακόμα τεχνική είναι η μεταβολομική που στη βιοχημεία αποτελεί τη μελέτη των χημικών διεργασιών στις οποίες υπάρχουν μεταβολίτες. Ως μεταβολίτες ορίζονται συνήθως μικρά μόρια που παρατηρούνται ως ενδιάμεσα ή και τελικά προϊόντα στον κυτταρικό μεταβολισμό. Οι μελέτες μεταβολομικής προσφέρουν την ανάλυση όσο το δυνατόν περισσότερο μεταβολιτών για την πραγματοποίηση αμερόληπτης διάκρισης ή και ταξινόμησης σύμφωνα με την ποικιλία, την προέλευση, την εσοδεία και την ποιότητα. Για να καταστεί δυνατή η ενσωμάτωση όλων των σχετιζόμενων με τον χρόνο μεταβολικών αλλαγών στην ιστορία του κρασιού σε όλη την επεξεργασία του, για να εξασφαλιστεί η ποιότητα, η ταυτότητα και η νοθεία. Η μεταβολομική ορίζεται ως ο χαρακτηρισμός ολόκληρης της σύνδεσης μικρών μεταβολιτών, συνήθως κάτω από 1,5 kDa, ενός συγκεκριμένου συστήματος ή οργανισμού. Οι μεταβολίτες θεωρούνται τα τελικά προϊόντα του γονιδιώματος και της αλληλεπίδρασής του με το περιβάλλον και έχει βρει μεγάλη εφαρμογή στην επιστήμη των τροφίμων. Με τη χρήση της μεταβολομικής στον τομέα του οίνου, δόθηκαν νέες ευκαιρίες για την αξιολόγηση

ολόκληρης της διαδικασίας της αμπελοκαλλιέργειας και οινοποίησης από μια πιο ολιστική προοπτική για τη διασφάλιση της ποιότητας και της ιχνηλασιμότητας του οίνου (Alanon, M, et al, 2015).

Η διαδικασία της μεταβολομικής παρουσιάζει ιδιαίτερη εξέλιξη λόγω των αναγκών επίτευξης ενός ολοκληρωμένου χαρακτηρισμού οργανικών μορίων σε κάθε βιολογικό σύστημα. Στη μεταβολομική στόχος είναι η επίτευξη της μεγαλύτερης δυνατής μεταβολικής κάλυψης με μη επιτηρούμενο τρόπο συμπεριλαμβανομένων άλλων ενώσεων. Άρα, οι μετρούμενοι μεταβολίτες δεν είναι προκαθορισμένοι και ακολουθείται διαφορετική ροή εργασιών από αυτή της στοχευμένης ανάλυσης. Το 2020 οι Arapitsas et al, μελέτησαν 11 ερυθρά ιταλικά κρασιά από διαφορετικές περιοχές της Ιταλίας, στοχεύοντας στην καταγραφή του μεταβολισμού αυτών. Τα αποτελέσματα της έρευνας είχαν ενδείξεις σχετικά με την ομοιότητα των ποικιλιών ενώ αναδείχτηκε και ένας κατάλογος βιοδεικτών από τους οίνους (pBOWs). Αρκετοί από τους μεταβολίτες ανήκουν στις κατηγορίες των πολυφαινολών, των αμινοξέων, των διπεπτιδίων, των τριπεπτιδίων, των δεσμευμένων τερπενοειδών, σακχάρων και οργανικών οξέων. Στη μελέτη φαίνεται πως αρκετά δι και τρι πεπτίδια σημειώνονται δοκιμαστικά ως δείκτες (Arapitsas P, et al, 2020) και πιστεύεται ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διαφοροποίηση της ποιότητας των οίνων.

Η μεταβολομική έχει ήδη εφαρμοστεί στον τομέα παραγωγής κρασιού για μελέτη ερωτημάτων που κυμαίνονται μεταξύ των διαφορών στις ποικιλίες, την παρακολούθηση της διαδικασίας ζύμωσης και την καθοδήγηση της λήψης αποφάσεων για την οινοποίηση, καθώς και την εξερεύνηση αλλαγών αρώματος και γεύσης ανά χρονιά. Όσον αφορά την οινοποίηση, ένα σύγχρονο παράδειγμα που γνωρίζουμε αναφέρεται από τους Bokulich et al., που συνδύασαν τη μεταγραμμική κωδικοποίηση με μεταβολικά δεδομένα ενώ διερευνά και τη σχέση μεταξύ μικροβιώματος σταφυλιού και περιβάλλοντος. Έτσι, συνολικά η δυνατότητα συνδυασμού αυτών των προσεγγίσεων παραμένουν ανεκμετάλλευτες. Αν και αυτό είναι εν μέρει λόγω του απαγορευτικά υψηλού κόστους ορισμένων μεθόδων, είναι επίσης λόγω της παραμονής σημαντικών προκλήσεων που πρέπει να αντιμετωπιστούν πριν οποιαδήποτε από τις τεχνικές γίνει ρουτίνα (Sirén K, et al, 2019).

Ο οίνος είναι το προϊόν μιας μακράς διαδικασίας πολλών σταδίων ενώ παράλληλα δίνει ένα από τα πιο πλούσια και σύνθετα μεταβολικά δακτυλικά αποτυπώματα. Με την αποτελεσματική μελέτη του μεταβολισμού του οίνου έχουν χρησιμοποιηθεί ευρύτερα οι μη στοχευμένες αναλυτικές προσεγγίσεις. Τα τελευταία χρόνια, η προώθηση των μεθοδολογιών που βασίζονται στην υγρή και αέρια

χρωματογραφία (LC και GC) σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (MS) και φασματομετρία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) άνοιξε το νέο πεδίο έρευνας, τη μεταβολομική, που καθιστά δυνατή τη διεξαγωγή μετρήσεων μεγάλης κλίμακας εκατοντάδων ή και χιλιάδων μεταβολιτών σε μία σειρά με στοχευμένες ή μη στοχευμένες προσεγγίσεις. Σε μικρότερο βαθμό έχουν εφαρμοστεί για τον οίνο οι τεχνικές που βασίζονται στο μετασχηματισμό Fourier (FT) ή στις μεθόδους ηλεκτροφόρησης (CE). Ωστόσο, λόγω της χημικής πολυπλοκότητας του μεταβολισμού, που διαφέρει από τα τέσσερα νουκλεοτίδια με παρόμοιες χημικές ιδιότητες που χαρακτηρίζουν το μεταγραφικό, επί του παρόντος δεν είναι δυνατό να προσδιοριστεί το προφίλ ολόκληρου του φυτικού μεταβολισμού χρησιμοποιώντας ένα ενιαίο πρωτόκολλο εξαγωγής και μια ενιαία αναλυτική τεχνική. Ο μεταβολικός χώρος που καλύπτεται από μια μέθοδο μη στοχευμένης προσέγγισης μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με το αναλυτικό σύστημα, από δεκάδες κύριες ενώσεις σε ένα πείραμα NMR έως αρκετές εκατοντάδες ή χιλιάδες ενώσεις για πειράματα HRGC-MS ή HPLC-MS. Εξάλλου, φασματομετρία μάζας υπερυψηλής ευκρίνειας (φασματομετρία μάζας συντονισμού κυκλοτρονίων ιόντων μετασχηματισμού Fourier, FT-ICR-MS) καθιστά δυνατή την καταγραφή χιλιάδων σημάτων για μεταβολικό δακτυλικό αποτύπωμα (Savoi S, et al, 2021).

Μερικές από τις προαναφερόμενες τεχνικές έχουν εφαρμοστεί και σε συνδυασμό με MS, που είναι η πιο ευρέως εφαρμοσμένη τεχνολογία στη μεταβολομική, διότι δίνει ένα μίγμα ταχέων, ευαίσθητων, επιλεκτικών, ποσοτικών και ποιοτικών αναλύσεων παρέχοντας και την ικανότητα προσδιορισμού των μεταβολιτών. Τα φασματομέτρα μάζας λειτουργούν με σχηματισμό ιόντων διαχωρισμό ιόντων ανάλογα με την αναλογία μάζας/φορτίο για την ανίχνευση διαχωρισμένων ιόντων. Ιδιαίτερα αυξημένη ανάπτυξη και εκσυγχρονισμός της ανάλυσης φασματομετρίας φανερώνεται κυρίως στο χρόνο πτήσης (TOF) με τετραπολικά. Επίσης οι αναλυτές Q-TOF, ion-trap TOF (IT-TOF) και Orbitrap βελτιώνουν σημαντικά τις δυνατότητες αναγνώρισης αυτής της τεχνικής. Το IT-TOF προτιμάται συνήθως λόγω της ευαισθησίας και ταχύτητας σάρωσης. Αντιθέτως το TOF, το QTOF και το Orbitrap είναι ιδιαίτερα χρήσιμα στις αναλύσεις του οίνου λόγω της υψηλής ανάλυσης και ακριβείας της μάζας. Έτσι αποτελούν ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο για την αναγνώριση άγνωστων μεταβολιτών (Alanon M., et al, 2015).

Η φασματοσκοπία NMR είναι μια κύρια τεχνική για τις μεταβολομικές μελέτες του οίνου, καθώς είναι μια ταχεία, μη καταστροφική μέθοδος, που παρέχει υψηλή απόδοση και απαιτεί ελάχιστη προετοιμασία δείγματος. Για να πραγματοποιηθεί η ανάλυση τα

δείγματα, ακόμα και αν είναι προ συμπυκνωμένα, υποβάλλονται απευθείας σε ανάλυση NMR με προσθήκη δευτεριομένου διαλύτη ή λυοφιλοποιούνται, ώστε να απομακρυνθεί το νερό και έπειτα αραιώνονται σε διαλύτη NMR. Λόγω της σχεδόν ανύπαρκτης προεπεξεργασίας του δείγματος για την NMR φασματοσκοπία, οι προϋπάρχουσες ιδιότητες του δείγματος διατηρούνται. Οι στόχοι που αξιολογούνται μέσω του NMR είναι ο γεωγραφικός διαχωρισμός, η διάκριση ποικιλιών και εδαφών και η παρακολούθηση ζυμώσεων. Ένα παράδειγμα αποτελούν τα μεταβολικά προφίλ που προέκυψαν από ερυθρές ποικιλίες οίνου (Merlot, Cabernet Sauvignon και Cabernet Franc). NMR πραγματοποιήθηκε για την ταξινόμηση των οίνων σε σχέση με το κλίμα, επιδράσεις του εδάφους και της ποικιλίας (Alanon M., et al, 2015).

Το μέγεθος των ανιχνευόμενων ουσιών είναι mg/L, άρα είναι χρήσιμο για πολυμεταβολίτες υψηλής αφθονίας, ενώ για την κάλυψη μεταβολή των χαμηλότερων συγκεντρώσεων μπορούν να εφαρμοστούν εναλλακτικές προσεγγίσεις βασιζόμενες στην MS όπως: HPLC-MS, GC-MS, GC-TOF-MS, FT-MS (Alanon M., et al, 2015). Τα προφίλ που προκύπτουν από NMR είναι αντιπροσωπευτικά, αναλυτικά φάσματα που συγκρίνονται χρησιμοποιώντας στατιστικές τεχνικές όπως η αναγνώριση προτύπων. Η διαρκής σμίκρυνση των οργάνων, σε σημείο να είναι διαθέσιμο ως φορητές συσκευές, βεβαιώνει τη μελλοντική εξέλιξη και χρήση τους στο μέλλον (Gallo M, Ferranti P, 2016).

Λόγω της αναλυτικής ικανότητας των συσκευών MS, HPLC, GC, CE, SEC, PAGE να γίνεται διαχωρισμός υψηλής ανάλυσης, μπορεί να γίνει χαρακτηρισμός σε μοριακό επίπεδο όλων των συστατικών ενός πολύπλοκου δείγματος. Έτσι η MS μαζί με NMR και άλλες φασματοσκοπικές τεχνικές είναι ο πυρήνας τεχνολογιών omics. Οι τεχνικές MS, NMR είναι ένας μικρός αριθμός άλλων φασματοσκοπικών τεχνικών που σε συνδυασμό με μεθόδους διαχωρισμού αλλά και εργαλεία βιοπληροφορικής, αποτελούν τις βασικές αναλυτικές μεθοδολογίες στις οποίες βασίζονται τα πρώτομοικα και τα μεταβολικά (Gallo M, Ferranti P, 2016).

Εστιάζοντας στα πλαίσια του οίνου, προκύπτει πως η γεύση και η ποιότητα του κρασιού καθορίζονται από την αξιολόγηση πολλαπλών αισθητηριακών ερεθισμάτων, όπως το άρωμα, η γεύση και αίσθηση στο στόμα. Είναι επομένως σημαντικό να λαμβάνεται υπόψη η συμβολή όσο το δυνατόν περισσότερων μεταβολιτών όταν γίνεται προσπάθεια να συσχετίσει τη σύνθεση του κρασιού με την ποιότητα. Το κρασί έχει ένα πολύπλοκο χημικό προφίλ, με αναρίθμητους μεταβολίτες που καλύπτουν σχεδόν όλες τις χημικές κατηγορίες του πρωτογενούς και δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών, όπως αμινοξέα, λιπίδια, πεπτιδία, υδατάνθρακες, φαινολικά, οργανικά και ανόργανα

οξέα, ινδόλες, αμίνες, θειούχες ενώσεις και πτητικές ενώσεις. Οι παραπάνω μεταβολίτες παρατηρούνται σε διαφορετικά φάσματα συγκεντρώσεων από g/L έως ng/L, ωστόσο αρκετά δεν είναι ακόμα γνωστά. Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα της έρευνας των Vania Sáez et al., (Sáez V, et al, 2021), φαίνεται πως οι μεταβολίτες που περιέχουν N (κυρίως μικρά πεπτίδια) είναι πολλά υποσχόμενοι βιοδείκτες για τη διαφοροποίηση της ποιότητας των οίνων. Αξίζει να αναφερθεί πως για τη διερεύνηση των διαφορών μεταξύ των μεταβολομικών αποτυπωμάτων των ομάδων κρασιού, μπορεί να επιτευχθεί με ανάλυση ANOVA.

Στην κατηγορία των μεταβολομικών εστιάζοντας πιο ειδικά στην κατηγορία των πεπτιδίων υπάρχει η κατηγορία της πεπτιδομικής. Ο όρος *peptidomics* διατυπώθηκε στις αρχές του 2000 από τους Schulz-Knappe et al., υποδεικνύοντας την ομάδα όλων των πεπτιδίων που υπάρχουν σε ένα βιολογικό δείγμα. Η πεπτιδομική θεωρείται κλάδος της μεταβολομικής εφαρμόζοντας τις θεμελιώδεις τεχνικές της, όμως στοχεύοντας στην ταυτοποίηση των πεπτιδίων. Με την εξέλιξη της πεπτιδομικής παρατηρείται εφαρμογή της και στον κλάδο των τροφίμων και της διατροφής. Τα τελευταία χρόνια η πεπτιδομική έχει παρουσιάσει ιδιαίτερη ανάπτυξη στον τομέα των τροφίμων και των ποτών. Επομένως, ως πεπτιδομική τροφίμων ορίζεται το σύνολο των πεπτιδίων που υπάρχουν στα τρόφιμα ή παράγονται κατά την επεξεργασία, την αποθήκευση ή την πέψη αυτών. Χάρη στην εξελικτική πρόοδο της φασματομετρίας μάζας υψηλής ευκρίνειας και των τεχνικών αποδίδεται μια πιο λεπτομερής εικόνα για τα πεπτίδια των τροφίμων και των ποτών.

Οι τεχνικές της τροφο-πεπτιδομικής εφαρμόζονται με σκοπό την κατανόηση της πέψης των πρωτεϊνών στα τρόφιμα, για τη μελέτη της μικροβιακής συμβολής κατά την υδρόλυση των πρωτεϊνών στις τροφές, για ταυτοποίησης βιοδραστικών πεπτιδίων ακόμα αλλά και πεπτιδίων που προέρχονται από τρόφιμα βιοδείκτες. Ωστόσο απαιτούνται περαιτέρω ενέργειες για τη βελτίωση της ταυτοποίησης βραχέων πεπτιδίων και ανάλυση μεγάλων συνόλων δεδομένων.

Κατά τη γαστρεντερική πέψη των πρωτεϊνών απελευθερώνονται μεσαίου και μικρού μεγέθους πεπτίδια με πιθανή βιολογική δραστηριότητα. Λόγω της πρόσφατης ανάπτυξης των τεχνικών πεπτιδομικής υψηλής απόδοσης και της εφαρμογής της MS, κατορθώνεται η ταυτοποίηση πολλών πεπτιδίων που απελευθερώνονται κατά την πέψη των τροφών. Εντοπίζονται ορισμένοι περιορισμοί όσον αφορά την αναγνώριση πολύ βραχέων πεπτιδίων (μικρότερα από 5 αμινοξέα), πολυπεπτίδια μεγάλου μεγέθους και δισουλφιδικά διασυνδεδεμένα ετερο-ολιγομερή. Η μεθοδολογία *peptidomics* αντιπροσωπεύει μια καινούργια ειδική και ευαίσθητη τεχνική που μπορεί να προσφέρει

την ικανότητα παρακολούθησης της πεπτιδικής σύνθεσης των τροφίμων και ποτών, αλλά και πιθανές αλλαγές στην παραγωγική διαδικασία. Τη σημερινή εποχή η πεπτιδομική αποτελεί ένα ισχυρό και μεγάλης κλίμακας εργαλείο για τον εντοπισμό πεπτιδίων. Συμβάλλει και στον ποιοτικό έλεγχο της επεξεργασίας των τροφών και των ποτών, στην ασφάλεια τροφίμων αλλά και στο σχεδιασμό υγιεινών τροφών. Ωστόσο χρειάζεται περαιτέρω έρευνα για να μπορέσουν να καλυφθούν κενά που να δίνουν λύσεις στους προαναφερόμενους περιορισμούς (Martini S., et al, 2021).

Με την τεχνολογία της πεπτιδομικής οι Albuquerque et al.(2021) ταυτοποίησαν με MS-βάση πεπτίδια μετά από διάσπαση πρωτεϊνών με θρυψίνη. Τα πρωτεολυτικά ένζυμα ή αλλιώς πεπτιδάσες, όπως είναι και η θρυψίνη, είναι μια εναλλακτική λύση για τους παραδοσιακούς τελικούς παράγοντες, αν και οι παραδοσιακές τεχνικές οινοποίησης εξακολουθούν να είναι δύσκολο να ξεπεραστούν. Η MS- βάση πεπτιδομικών ή αλλιώς στρατηγική από πάνω προς τα κάτω δίνει τη δυνατότητα ανάλυσης πρωτεϊνών και πεπτιδίων χωρίς προηγούμενη επεξεργασία, δίνοντας ολοκληρωμένα στοιχεία για μεγαλύτερη εμβάθυνση στα δομικά χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών. Η παραπάνω τεχνική σε συνδυασμό με τη "θεωρία της περιορισμένης πρωτεόλυσης", στην οποία προστίθενται μόνο ορισμένες ειδικές πρωτεϊνικές περιοχές που υπάρχουν προσβάσιμες σε πρωτεολυτικά ένζυμα, στοχεύουν να εντοπίσουν θραύσματα πρωτεολυτικής πέψης και αν ευθύνονται για θέματα θολερότητας (Albuquerque et al., 2021).

## 6° ΚΕΦΑΛΑΙΟ. Δράσεις πεπτιδίων οίνου

Εκτός από τη φήμη του για τις ευφραντικές του ικανότητες, το κρασί μπορεί να αποτελεί έναν ευεργετικό παράγοντα για την υγεία, εξαιτίας ορισμένων συστατικών του. Μια κατηγορία που φαίνεται να συντελεί σε αυτό είναι και τα πεπτίδια του οίνου. Ως βιοενεργά πεπτίδια ορίζονται οι ενώσεις που μέσω της δράσης τους έχουν θετικό αντίκτυπο στη βελτίωση και την ομαλή λειτουργία του σώματος, της ανθρώπινης υγείας και γενικότερα του ανθρώπινου οργανισμού. Η σύστασή τους συνήθως αποτελείται από 3-20 διαφορετικά αμινοξέα, που βρίσκονται είτε ελεύθερα είτε εντός της αλληλουχίας μιας πρωτεΐνης, ονομαζόμενα και αλλιώς ως κρυπτογραφημένα. Τα κρυπτογραφημένα πεπτίδια ενεργοποιούνται μετά την απελευθέρωσή τους από την πρωτεϊνική αλληλουχία, συνήθως με την υδρόλυση της πρωτεΐνης (Karachotziti Christina 2017).

Πιο δραστικά εμφανίζονται τα πεπτίδια που είναι πλούσια σε προλίνη (PRPs- Proline-rich polypeptides), ενώ σε μικρότερη ποσότητα υπάρχει η κυστεΐνη. Εκτός από την πεπτιδική αλληλουχία η βιοενεργότητα μπορεί να εξαρτάται και από το μήκος της πεπτιδικής αλυσίδας. Τα μικρότερου μεγέθους πεπτίδια σχετίζονται με μικρότερο ρυθμό απορρόφησης, τα δι- και τριπεπτίδια απορροφούνται ανέπαφα, άρα είναι περισσότερο βιοενεργά συγκριτικά με μεγαλύτερα πεπτίδια (Pérez-Gregorio R., et al, 2020).

Για να απελευθερωθούν ή να παραχθούν βιοενεργά πεπτίδια υπάρχουν 3 πιθανοί μεθοδολογίες, οι οποίες είναι:

- α) μέσω της επεξεργασίας του δείγματος (in vitro),
- β) με μικροβιακή ζύμωση (in vivo) και
- γ) με γαστρεντερική χώνευση (in vivo).

Η επεξεργασία του δείγματος αποτελεί τον πιο σύνθετο τρόπο για την παραγωγή βιοενεργών πεπτιδίων μέσω υδρόλυσης πρωτεϊνών σε συνδυασμό με πεπτιδικά, βακτηριακά, μυκητιακά ένζυμα και διάφορες πρωτεάσες (χυμοθρυψίνη, πεψίνη και θερμολυσίνη). Με μικροβιακή ζύμωση φαίνεται πως προκύπτουν βιοδραστικά πεπτίδια, εξαιτίας της ζύμωσης. Πρωταγωνιστικό ρόλο κατέχουν οι ενδοκυτταρικές πεπτιδάσες (ενδο-πεπτιδάσες, αμινο-πεπτιδάσες, δι-πεπτιδάσες και τρι-πεπτιδάσες) και σε μελέτες αναφέρεται η παραγωγή διαφόρων κατηγοριών βιοδραστικών πεπτιδίων με ανοσορυθμιστική, αντιοξειδωτική και ανοσοκατασταλτική δράση. Τέλος, στη γαστρεντερική χώνευση με τη βοήθεια πρωτεολυτικών γαστρεντερικών ενζύμων του πεπτικού, επιτυγχάνεται απελευθέρωση πεπτιδίων από

πρόδρομες πρωτεΐνες με βιοδραστικές ιδιότητες (Karachotziti Christina 2017). Γενικά τα βιοενεργά πεπτίδια διαθέτουν πολλαπλές βιοδραστηριότητες, συμπεριλαμβανομένης της τροποποίησης της εντερικής ομοιόστασης, επηρεάζουν το εντερικό σύνδεσμο, τις ανοσολογικές αποκρίσεις του βλεννογόνου, φλεγμονές ή και τη μικροχλωρίδα του εντέρου (Bao X, Wu J, 2021). Μπορούν να ασκήσουν τη βιοδραστικότητά τους στο λεπτό και το παχύ έντερο. Όταν απελευθερωθούν από τις πρωτεΐνες τα βιοενεργά πεπτίδια πρέπει να παραμένουν ενεργά και αδιάσπαστα κατά την γαστρεντερική πέψη, ώστε να φτάσουν στην κυκλοφορία του αίματος. Μέσω του PEPT1 δεσμεύονται πεπτίδια με κοντές αλυσίδες δι- και τριπεπτίδια με υψηλή υδροφοβικότητα και ουδέτερο φορτίο. Τα ολιγοπεπτίδια μπορούν να απορροφηθούν από υποδοχείς και μη υποδοχείς στην ενδοκυττάρωση. Λόγω της ικανότητας σύνδεσης των πολυφαινολών με τα πεπτίδια επηρεάζονται οι μηχανισμοί μεταφοράς και ο ρυθμός απορρόφησης (Pérez-Gregorio R, et al, 2020).

Τα ένζυμα που αναφέρθηκαν παραπάνω είναι υπεύθυνα τις περισσότερες φορές για την παραγωγή γνωστών βιοπεπτιδίων, με χαρακτηριστικό παράδειγμα τη θρυψίνη που είναι υπεύθυνη για την παραγωγή του πεπτιδίου αναστολής του ενζύμου μετατροπής της αγγειοτενσίνης (ACE) και των φωσφοπεπτιδίων σύνθεσης ασβεστίου (CPPs). Ανάλογα με τον τομέα που δρουν τα πεπτίδια χαρακτηρίζονται και αντιστοίχως. Έτσι υπάρχουν βιοενεργά πεπτίδια που συμβάλλουν στο νευρικό σύστημα γνωστά ως οπιοειδή, άλλα που έχουν ανοσορυθμιστική δράση, αντιμικροβιακά πεπτίδια, αντιθρομβωτικά, αντιυπερτασικά, αντιοξειδωτικά, υπερχοληστερολαιμικά, αντικαρκινικά, αντιπολλαπλασιαστικά, ανοσοτροποποιητικά, αντιφλεγμονώδη, οστεοπροστατευτικά και πεπτίδια που προστατεύουν το ανοσοποιητικό σύστημα και μειώνουν την αρτηριακή πίεση. Επομένως, έχουν ευεργετικές ιδιότητες για το ανθρώπινο καρδιαγγειακό, νευρικό και ανοσοποιητικό σύστημα, αλλά και στο πεπτικό (Karachotziti Christina 2017).





Figure 1. Οι τομείς δράσης των βιοενεργών πεπτιδίων.

#### *Ανασταλτική δράση της PEP*

Σε οίνους έχουν βρεθεί ανασταλτικά πεπτίδια της προλυενδοπεπτιδάσης (PEP). Η προλυενδοπεπτιδάση είναι ένζυμο που διασπά την πεπτιδική αλυσίδα μετά το καρβοξυτελικό άκρο της προλίνης. Εμπλέκεται στην ωρίμανση και την αποικοδόμηση πεπτιδικών ορμονών και νευροπεπτιδίων όπως η ορμόνη διέγερσης των άλφα μελανοκυττάρων, η ορμόνη απελευθέρωσης της ωχρινοτρόπου ορμόνης (LH-RH), η ορμόνη απελευθέρωσης θυρεοτροπίνης, η αγγειοτενσίνη, η νευροτενσίνη, η ωκυτοκίνη, ουσία P και βαζοπρεσίνη. (Moreno-Arribas & Polo, Wine Chemistry and Biochemistry). Στον οίνο σε αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις συναντάται η προλίνη, γεγονός που ώθησε τους Takuaki Yanai et al., στη διεξαγωγή έρευνας σχετικά με την ύπαρξη αναστολέων PEP στον οίνο. Έχει βρεθεί πως ειδικοί αναστολείς PEP έχουν αντιαμνησιακά αποτελέσματα και ορισμένοι αναστολείς έχουν συντεθεί για φάρμακα κατά της αμνησίας. Στην έρευνα Takaaki et al. (2002), έγινε αναφορά αποτελεσμάτων σχετικά με τον καθαρισμό ανασταλτικών πεπτιδίων PEP από Cabernet Sauvignon και μελετήθηκε η καταστολή της αποδόμησης των νευροπεπτιδίων, αλλά και η ποσότητα των πεπτιδίων στα εμπορικά κρασιά. Έτσι, βρέθηκαν δύο ανασταλτικά πεπτίδια με αλληλουχίες αμινοξέων PepA (Val-Glu-Ile-Pro-Glu) και PepB (Tyr-Pro-Ile-Pro-Phe). Τα δύο αυτά πεπτίδια ανέστειλαν την PEP εξαρτώμενα ανάλογα με τη δοσολογία, με το PepA να αναστέλλει την PEP πιο γρήγορα από το PepB. Επίσης, προκύπτει από την ίδια έρευνα πως τα δύο αυτά πεπτίδια προερχόμενα από Cabernet Sauvignon, ανέστειλαν

την PEP και κατέστειλαν την αποικοδόμηση των νευροπεπτιδίων, βαζοπρεσσίνης, ουσίας P και θραυσμάτων 8-13 νευροτενσίνης, που εμπλέκονται στη μνήμη και την νευρική επικοινωνία (Yanai T, et al, 2003). Αν και στον οίνο υπάρχουν δυνατότητες απομόνωσης χρήσιμων για την υγεία πεπτιδίων, λίγες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί και οι πληροφορίες που υπάρχουν είναι περιορισμένες.

### *Ανασταλτική δράση της ACE*

Για την αντιμετώπιση προβλημάτων υγείας έχουν παραχθεί αρκετά φάρμακα συνθετικής φύσης. Ωστόσο, πολλά πεπτίδια όπως προαναφέρθηκαν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αντιμετώπιση προβλημάτων. Έτσι συγκρίνοντας πεπτίδια τροφίμων με συνθετικά φάρμακα δεν είναι λίγες οι περιπτώσεις που τα πρώτα θεωρούνται περισσότερο ήπια και ασφαλή. Έτσι, για τους παραπάνω λόγους τα βιοδραστικά πεπτίδια προερχόμενα από φυσικές πηγές ή τρόφιμα/ποτά έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον των ερευνητών. Η μαγιά αποτελεί μια καλή μικροβιακή πηγή με υψηλό ποσοστό πρωτεϊνικών ενώσεων, κάτι που την καθιστά ιδανική πηγή παρασκευής βιοδραστικών πεπτιδίων. Έχουν χρησιμοποιηθεί αρκετές μέθοδοι εξαγωγής για την εκχύλιση και παρασκευή βιοενεργών πεπτιδίων από πρωτεΐνες ζυμομυκήτων. Το κύριο θέμα προβληματισμού αποτελεί μόνο η χρονοβόρος εκχύλιση και η μικρή υδρολυτική ειδικότητα.

Οι παραπάνω τεχνικές έχουν εφαρμοστεί σε αρκετές έρευνες και μια από αυτές αποτελεί η έρευνα των He Ni et al (2012), όπου με εκχύλιση και υδρόλυση πρωτεϊνών μαγιάς *Saccharomyces cerevisiae* προέκυψε ένα εξαπεπτίδιο με υψηλή ανασταλτική δράση της ακετυλοχολινεστεράσης (ACE), που θα μπορούσε να συμμετάσχει στη σύνθεση φαρμάκων για την υπόταση. Η ACE είναι ένα μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης-I που είναι σημαντικό για τη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης, καθώς τα ανασταλτικά πεπτίδια ACE έχουν τη δυνατότητα να μειώνουν την αρτηριακή πίεση αναστέλλοντας τη δραστηριότητα του ACE. Η ιδιότητα αυτή οφείλεται στο γεγονός μετατροπής μιας ανενεργούς μορφής δεκαπεπτιδίου (αγγειοτενσίνη-I) σε ένα ισχυρό αγγειοσυσταλτικό οκταπεπτίδιο (αγγειοτενσίνη-II), με την απενεργοποίηση της καταλυτικής λειτουργίας της δραδουκινίνης που έχει κατασταλτική δράση. Το μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης-I, διπεπτιδυλική καρβοξυπεπτιδάση ανοίκει στην οικογένεια των M2 μεταλλοπρωτεασών και στην κατηγορία των πρωτεασών ψευδαργύρου που απαιτούν ψευδάργυρο και χλώριο για την ενζυμική ενεργοποίηση. Ιδιαίτερα μεγάλη σημασία κατέχει η επίδρασή τους στην αντιμετώπιση

καρδιακών προβλημάτων. Τα πεπτίδια φαίνεται πως έχουν ιδιαίτερη συμβολή στον τομέα της ACE.

Στην παραπάνω μελέτη, για τον προσδιορισμό της ανασταλτικής δράσης του ACE πραγματοποιήθηκε HPLC τροποποιημένη από μια φασματομετρική μέθοδο. Έπειτα στη συγκεκριμένη μελέτη ο προσδιορισμός της αλληλουχίας αμινοξέων έγινε με την αυτοματοποιημένη μέθοδο αποικοδόμησης Edman. Έτσι προέκυψε το εξής εξαπεπίδιο The-Pro-Thr-Gln-Ser, το οποίο συγκριτικά με άλλα πεπτίδια ανασταλτικά του ACE προερχόμενα από υδρολύματα πρωτεϊνών τροφίμων, έδειξε ψηλότερη ανασταλτική δράση. Ένα ακόμα χαρακτηριστικό που το διαφοροποιεί από τα άλλα ισχυρά ανασταλτικά πεπτίδια ACE και προκαλεί εντύπωση είναι υψηλή υδροφιλικότητά του, συγκριτικά με τα άλλα. Πιθανότατα αυτό το γεγονός να δημιουργεί μεγαλύτερη διαλυτότητα στο αίμα. Με μια σύντομη αναφορά γενικά ο λόγος που το παραπάνω γεγονός προκαλεί εντύπωση είναι, διότι τα πεπτίδια με υψηλή υδροφιλικότητα συνήθως έχουν ασθενική ή μηδενική δραστηριότητα. Λόγω αυτής το πεπτίδιο καθίσταται απρόσιτο στην ενεργό θέση ACE σύμφωνα με τον ανταγωνιστικό μηχανισμό, ενώ στην παρούσα περίπτωση τα τρία υπολείμματα στο C-άκρο είναι υδρόφιλα (Ni He, et al, 2012).

Παρόμοιες μελέτες με την προηγούμενη έχουν γίνει και αφορούν την παραμονή αφρώδους και ερυθρού οίνου με τις οινολάσπες (Alcaide, et al, 2008). Κατά την παραμονή τους με οινολάσπες οι ζυμομύκητες ξεκινούν να αυτολύονται απελευθερώνοντας αζωτούχες ενώσεις στο μέσο, όπως τα πεπτίδια. Μέσω αυτής της αυτόλυσης του *Saccharomyces cerevisiae* απελευθερώνονται πεπτίδια που μπορούν να παρουσιάζουν δραστηριότητα ACE-I, που οφείλεται κυρίως στα υδρόφοβα πεπτίδια. Στους αφρώδεις οίνους η πεπτιδική σύνθεση εξαρτάται από τη μαγιά που χρησιμοποιήθηκε κατά τη δεύτερη ζύμωση και από την πρωτεϊνική σύνθεση του οίνου βάσης. Ανασταλτική ACE δραστηριότητα μπορούν να παρουσιάζουν και πεπτίδια που απομονώθηκαν από κόκκινο κρασί. Είναι γνωστό πως η δράση του ACE επηρεάζεται αρνητικά από την αλκοολική ζύμωση, χωρίς να είναι γνωστό αν επηρεάζεται από άλλους παράγοντες, όπως ο χρόνος ωρίμανσης σε οινολάσπες ή η μηλογαλακτική ζύμωση.

Για να προσδιοριστούν τα ελεύθερα αμινοξέα και τα πεπτίδια εφαρμόστηκε η συμβατική μέθοδος με νινυδρίνη βασισμένη στην αντίδραση της αμινομάδας με ένα μίγμα νινυδρίνης/Sn. Η απορρόφηση μετρήθηκε στα 570nm. Για τον προσδιορισμό της ανασταλτικής δράσης του ACE εφαρμόστηκε η μέθοδος που περιγράφεται από τους Cushman & Cheung (1971) και τροποποιήθηκε από τους Hernandez-Ledesma, Martin-

Alvarez και Pueyo το 2003. Η μεθοδολογία βασίζεται στον ποσοτικό προσδιορισμό του ιππουρικού οξέος, που σχηματίζεται από την αντίδραση της ιππουρολοιστιδυλολευκίνης (HHL) με ACE παρουσία και απουσία του αναστολέα, η απορρόφηση μετρήθηκε στα 228nm.

Όσο αφορά τους αφρώδεις οίνους κατά τη δεύτερη ζύμωση το πεπτιδικό άζωτο μειώνεται, διότι η ζύμη το χρησιμοποιεί ως πηγή αζώτου. Μετά όμως τη δεύτερη ζύμωση παρατηρείται αύξηση, καθώς είναι οι κύριες ενώσεις που απελευθερώνονται κατά την αυτόλυση στο στάδιο της παλαίωσης σύμφωνα με την παραδοσιακή μέθοδο παραγωγής. Αυτά τα πεπτίδια που προκύπτουν βοηθούν στην αύξηση δραστηριότητας ACEI των οίνων. Με άλλα λόγια τα υδρόφοβα πεπτίδια σχηματίζονται και υδρολύονται ταυτόχρονα.

Κατά την ερυθρή οινοποίηση παρατηρείται αρκετές φορές το στάδιο της μηλογαλακτικής ζύμωσης ή της παραμονής του οίνου με τις οινολάσπες για παλαίωση. Η δεύτερη περίπτωση παρουσιάζει αρκετές ομοιότητες με την παραμονή αφρωδών οίνων με οινολάσπες. Τα μηλογαλακτικά βακτήρια υδρολύουν τα πεπτίδια σε αμινοξέα για να καλύψουν τις διατροφικές τους ανάγκες με αποτέλεσμα την μείωση του πεπτιδικού αζώτου. Γενικά προκύπτει πως η συγκέντρωση πεπτιδίων σε οίνο που έχει οινολάσπες είναι μεγαλύτερη συγκριτικά με αντίστοιχο οίνο χωρίς οινολάσπες (Alcaide, et al, 2008). Στους ερυθρούς οίνους υπάρχουν άλλες ενώσεις μεγαλύτερων συγκεντρώσεων συγκριτικά με λευκά κρασιά που μπορούν να έχουν δράση ACEI. Η συγκέντρωση πεπτιδίων μειώθηκε κατά την μηλογαλακτική ζύμωση, αν και στα στάδια της παλαίωσης υπήρξε αύξηση. Κατά τη διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης, τα μηλογαλακτικά βακτήρια καταναλώνουν υδρόφιλα πεπτίδια, ενώ υπάρχει και η υδρόλυση των πρωτεϊνών που οδηγεί στο σχηματισμό περισσότερων υδρόφοβων πεπτιδίων. Όμως κατά την παλαίωση γίνεται ενζυμική αποικοδόμηση των υδρόφοβων πεπτιδίων και προκαλείται αύξηση των υδρόφιλων (Alcaide, et al, 2008).

Μιας και έγινε αναφορά στα γαλακτικά βακτήρια και τη μηλογαλακτική ζύμωση, πρωταγωνιστικό βακτήριο είναι συνήθως το *Oenococcus oeni*, το οποίο με την πρωτεολυτική του δράση ευνοεί την απελευθέρωση πεπτιδίων μέσω βιολογικών δραστηριοτήτων. Γενικά η παρουσία του *O. oeni* που υφίσταται μετά την αυτόλυση του ζυμομύκητα παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών και αύξηση της συγκέντρωσης των ελεύθερων πεπτιδίων μετατροπής της αγγειοτενσίνης I του ανασταλτικού ενζύμου (ACE-I) και αυτών με αντιοξειδωτικές ικανότητες. Σε άλλες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί έχει προκύψει πως μετά από μια επιταχυνόμενη αυτόλυση ζυμομύκητα, προκαλείται αύξηση της αντιοξειδωτικής δράσης, ενώ σε

ορισμένες περιπτώσεις μειωνόταν η δραστηριότητα του ACE-I. Πιθανότατα τα πεπτίδια που απελευθερώνονται από πρωτεΐνες του σταφυλοχυμού εμφανίζουν υψηλότερη δραστηριότητα ACE-I συγκριτικά με πεπτίδια που απελευθερώνονται από την αυτόλυση ζυμομύκητα.

Σε γενικές γραμμές προκύπτει πως τα πεπτίδια προερχόμενα από γλεύκος ή αυτόλυση μαγιάς έχουν ευεργετικές βιολογικές δραστηριότητες. Όταν τα πεπτίδια προέρχονται από φυσική πηγή πρωτεΐνης έχουν υψηλότερη αντιυπερτασική δράση συγκριτικά με αυτά από αυτόλυση ζύμης. Όσο αφορά την παρουσία του πρωτεολυτικού συστήματος O.oeni X2L, εμφανίζει μεγάλη αποτελεσματικότητα στην απελευθέρωση πεπτιδίων με ACE-I αλλά και αντιοξειδωτικές ιδιότητες, λόγω της βακτηριακής πρωτεολυτικής δραστηριότητας που επιτρέπει την απελευθέρωση βιοδραστικών πεπτιδίων (Stivala, et al, 2018).

Λαμβάνοντας υπόψη ότι έχει προαναφερθεί ήδη για τα πεπτίδια από οινολάσπες, αξίζει να αναφερθεί πως για τον εντοπισμό βιοενεργών πεπτιδίων σε οινολάσπες, τα υδρολύματα αρχικά υπερδιηθήθηκαν, ώστε να ληφθεί το μικρότερο κλάσμα λαμβάνοντας πάντα υπόψιν πως τα πεπτίδια με την υψηλότερη δραστηριότητα ACEI είναι συνήθως μικρού μήκους (2 με 11 υπολείμματα). Έπειτα, τα ήδη μικρά κλάσματα κλασματοποιούνται περισσότερο με τη βοήθεια RP-HPLC, ώστε να χωριστούν τα πεπτίδια ανάλογα με το μέγεθός τους και την υδροφιλικότητά τους. Επόμενο βήμα για τον προσδιορισμό και ταυτοποίηση των ιδιοτήτων των υποκλασμάτων ACEI είναι η φασματομετρία μάζας.

Ιδιαίτερης σημασίας παράγοντας για την αναστολή ACE εκτός από το μήκος είναι και η σύνθεση των αμινοξέων, ιδιαίτερα στα δι- και τριπεπτίδια. Πιο επεξηγηματικά, στην αλληλουχία οι τρεις τελευταίες θέσεις αμινοξέων στο C-τερματικό άκρο αποτελούν σημαντικό παράγοντα στην αναστολή της ACE. Πεπτίδια που περιέχουν Pro και υδρόφοβα αμινοξέα όπως (Tyr, Trp, Phe) έχει αποδειχθεί ότι ασκούν υψηλότερη δραστηριότητα ACE, με την Pro να συνηθίζει να βρίσκεται στην τελευταία ή προ τελευταία θέση του N-τερματικού άκρου. Επίσης, η παρουσία Gly, Val, Leu και Ile στην πρώτη θέση του N-τερματικού άκρου ή με παρουσία θετικά φορτισμένων αμινοξέων (Arg ή Lys) στο N-τερματικό αμινοξύ φαίνεται να συνδέεται με υψηλά επίπεδα αναστολής ACE. Με λίγα λόγια η βιοδραστικότητα των πεπτιδίων μπορεί να χαθεί ή να αυξηθεί ανάλογα με τη βιοδραστικότητα που έχει το παραγόμενο θραύσμα πεπτιδίου. Σε πρόσφατη πειραματική έρευνα των Bravo et al (2022), ταυτοποιήθηκαν έξι πεπτίδια από υδρόλυμα οινολάσπης και οι αλληλουχίες ταυτοποιήθηκαν ως ενεργά κλάσματα που ανιχνεύτηκαν κατά την υδρόλυση πρωτεΐνης είναι: FKTTDQQTRTTVA,

NPKLVTVI, TVTNPARIA, PAGELHP, LDSPSE GRAPG και LDSPSEGRAPGAD. Συνοψίζοντας μέσω της υδρόλυσης οινολασπών σε συγκεκριμένες συνθήκες απελευθερώθηκαν πεπτίδια με αντιυπερτασική δράση και μείωση της αρτηριακής πίεσης. Έτσι αποδείχτηκε πως οι οινολάσπες μπορούν να αποτελούν πηγή ανασταλτικών και αντιυπερτασικών πεπτιδίων ACE (Bravo F. I., et al, 2022).

Από έρευνα των Takayanag i& Yokotsuka αποδείχτηκε ότι οι ερυθροί οίνοι έχουν υψηλότερη ανασταλτική δράση ACE συγκριτικά με λευκά και η δράση αυτή μειώνεται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (Moreno-Arribas & Polo, Wine Chemistry and Biochemistry).

### *Αντιοξειδωτική δράση*

Μέχρι στιγμής, το μοναδικό πεπτίδιο του οίνου που έχει αποδεδειγμένα αντιοξειδωτική δράση είναι η γλουταθειόνη, η οποία αναφέρθηκε χωριστά σε προηγούμενη ενότητα.

### *Μυκητοκτόνες - Αντιμικροβιακές ιδιότητες συνθετικών πεπτιδίων*

Όπως έχει αναφερθεί αρκετές φορές στα προηγούμενα κεφάλαια, τα πεπτίδια αποτελούν ενώσεις που δεν έχουν μελετηθεί σε μέγιστο βαθμό, αλλά η συνεισφορά τους στα ποιοτικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου είναι σημαντική. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον φαίνεται να παρουσιάζει και το θετικό αντίκτυπο που φαίνεται να έχουν οι ιδιότητές τους στην ανθρώπινη υγεία. Λόγω όλων των παραπάνω και λαμβάνοντας υπόψιν το γεγονός ότι οι συγκεντρώσεις τους είναι σε μικρές ποσότητες, ώστε να καλυφθούν όλες οι ανάγκες, όπως η επαρκής ποσότητα για την επιστημονική μελέτη, η απομόνωσή τους για αντιμετώπιση προβλημάτων υγείας αλλά και προπάντων για τη βελτίωση του ίδιου του οίνου, οδήγησε στην χρήση συνθετικών πεπτιδίων. Έτσι βασιζόμενοι σε φυσικές αλληλουχίες πεπτιδίων του οίνου δημιουργήθηκαν τα συνθετικά πεπτίδια (Pérez-Gregorio R, et al, 2020).

Ένας παντοτινός εχθρός είναι η μόλυνσή του από μη επιθυμητούς μικροοργανισμούς, που το οδηγούν στην ποιοτική του υποβάθμιση και αλλοίωση. Έτσι λαμβάνοντας υπόψιν την έρευνα των Maria Enrique et al, (2007), σχετικά με την αντιμικροβιακή δράση των συνθετικών πεπτιδίων, έναντι σε ζυμομύκητες που αλλοιώνουν το κρασί, μπορούν να παρουσιάσουν πιο χειροπιαστά αποτελέσματα για τη σημασία της συνεισφοράς τους στους οίνους και την οينوποιητική διαδικασία.

Σύμφωνα πάντα με τη βιβλιογραφία, έχει πραγματοποιηθεί ανάλυση πεπτιδίων που περιλαμβάνουν 9 αντιμυκητιακά εξαπεπτίδια που σχετίζονται με την αλληλουχία

PAFs , ενώ προηγουμένως έχουν αναπτυχθεί με μια συνδυαστική προσέγγιση και δυο αντιπροσωπευτικά πεπτίδια που προέρχονται από τη λακτοφερρικίνη (LfcinB). Να σημειωθεί πως διαφορετικά πεπτίδια έχουν και διαφορετικά δραστικά προφίλ (Peña R, et al, 2020).

Η προσθήκη πεπτιδίων δεν είναι επιτρεπτή ως νόμιμη οινολογική τεχνική, οπότε όλα τα συμπεράσματα που παρατίθενται είναι από *in vitro* δοκιμές. Μέσω αυτών έχουν ταυτοποιηθεί τα εξής πεπτίδια: PAF26, PAF36 και LfcinB<sub>17-31</sub>, που έχουν ανασταλτικές ιδιότητες ανάπτυξης σε αρκετές ζύμες με χαμηλές μικρομοριακές συγκεντρώσεις. Οι πιο ευαίσθητες ζύμες ήταν οι *Z.bailii* και *Z.Bisporus*. Εκτός από τη μυκοστατική τους δράση τα πεπτίδια είχαν μυκητοκτόνες ιδιότητες έναντι στο *Z.bailii*, *Z.Bisporus* και *S.cerevisiae*. Αξίζει να αναφερθεί πως μόνο το LfcinB<sub>17-31</sub> είχε ανασταλτικές και μυκητοκτόνες ιδιότητες έναντι στο *Z.Bisporus* στον οίνο, αποδεικνύοντας πως η αντιμικροβιακή δράση κάθε πεπτιδίου εξαρτάται από το μέσο αλλά και από το μικροοργανισμό στόχο.

Η ελλειπής μυκητοκτόνος δράση των πεπτιδίων έναντι στο *Z.bailii* οφείλεται στην παρουσία ιόντων αλάτων, εκτός των δισθενών κατιόντων, ενώ η μυκητοκτόνος δράση του LfcinB προς το *Z.Bisporus* δεν επηρεάστηκε από τα άλατα. Για να γίνει η σύνθεση των πεπτιδίων χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της στερεάς φάσης. Για να γίνει προσδιορισμός των αντιμικροβιακών δράσεων των πεπτιδίων χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία πλάκας μικροπιλοδότησης. Η ανάπτυξη καθορίστηκε από την οπτική πυκνότητα (OD) στα 492nm, σε φασματοφωτόμετρο μικροπλάκας Multiskan Spectrum.

Το σύνολο των εξαπεπτιδίων που μελετάται ονομάζεται PAF και δρουν έναντι σε φυτοπαθογόνους μύκητες, των οποίων οι αλληλουχίες των D-αμινοξέων λαμβάνονται μέσω διαλογής της συνθετικής βιβλιοθήκης συνθετικών πεπτιδίων. Ορισμένα πεπτίδια PAF έχουν *in vitro* δράση έναντι σε φυτοπαθογόνους νηματοειδείς μύκητες και είναι παρόμοια με αυτά που βρέθηκαν για το LfcinB<sub>20-25</sub> , και LfcinB<sub>17-31</sub> , μια επέκταση 15 αμινοξέων που καλύπτει ο αντιβακτηριακός πυρήνας 6 υπολειμμάτων. Το πεπτίδιο P20 θεωρήθηκε ως ελεγκτικό αφού είναι PAF πεπτίδιο και σχετίζεται με την αλληλουχία που δεν παρουσιάζει αντιμικροβιακές ιδιότητες κατά των νηματοειδών μυκήτων.

Τα συνθετικά πεπτίδια φαίνεται πως επηρεάζουν την ανάπτυξη της ζύμης, με χαρακτηριστικό παράδειγμα το PAF36, που ήταν το πιο ανασταλτικό πεπτίδιο και ο ζυμομύκητας *Z.bailii* ήταν ο πιο ευαίσθητος στην αναστολή των πεπτιδίων. Όσο αφορά

τα LfcinB το πιο μικρό πεπτίδιο LfcinB<sub>20-25</sub> είναι λιγότερο δραστικό από το μεγαλύτερο πεπτίδιο LfcinB<sub>17-31</sub> ενάντια σε μυκητιακά φυτοπαθογόνα, όπως το *P.Digitatum*.

Το LfcinB<sub>7-31</sub> προερχόμενο από φυσική πρωτεΐνη και το PAF26L ως κατιονικό πεπτίδιο μελετήθηκαν για τις αντιμικροβιακές ιδιότητες του οίνου. Τα δύο αυτά πεπτίδια δεν φαίνεται να επηρέασαν τις ζύμες *S.c* και *Z.bailii*. Συμπερασματικά, η διαφορετική αντιμικροβιακή δράση κάθε πεπτιδίου σχετίζεται με το μέσο που βρίσκεται και αλληλοεπιδρά με το μικροοργανισμό στόχο.

Το κρασί όντας ένα πολύπλοκο μέσο περιέχει πολλές ενώσεις εκ των οποίων είναι η αιθανόλη και τα άλατα και μπορούν να επηρεάσουν τη μυκητοκτόνο δράση των πεπτιδίων. Σύμφωνα με το μηχανισμό δράσης των κατιονικών αντιμικροβιακών πεπτιδίων, καθοδηγούνται από την ηλεκτροστατική τους έλξη και την αλληλεπίδρασή τους με την αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια των ευαίσθητων μικροβίων. Παρουσία αλάτων η δράση του PAF26 στους νηματοειδείς μύκητες μειώνεται, ενώ η μυκητοκτόνος δράση των πεπτιδίων LfcinB πιθανολογείται πως προέρχεται από διαταραχή των φυσιολογικών λειτουργιών της διαπερατότητας του βακτηρίου. Επιπλέον οι LfcinB<sub>17-31</sub> PAF26 έχει αποδειχτεί ότι επάγουν την κυτταρική διείσδυση στο νηματώδη μύκητα *P.digitatum*. Γενικά τα πεπτίδια LfcinB είναι ενεργά σε μεγάλο εύρος pH, η δραστηριότητά τους μειώνεται παρουσία MgCl<sub>2</sub> ή CaCl<sub>2</sub>. Μείωση στη δραστικότητα της ενεργούς μεμβράνης των πεπτιδίων μπορεί να οφείλεται και στη συγκέντρωση της αιθανόλης.

Για τον έλεγχο αλλοίωσης τροφίμων συνιστάται το πεπτίδιο LfcinB<sub>17-31</sub> που έχει μυκητοκτόνο δράση απέναντι στη ζύμη *Z.bisporus*. Γενικά τα πεπτίδια που προέρχονται από το LfcinB δεν έχουν αιμολυτική δράση και δεν ασκούν τοξική δράση κατά των ζωικών κυττάρων (Enrique M, et al, 2007). Επίσης, το συνθετικό πεπτίδιο PAF26 και άλλα παρόμοια πεπτίδια μπορούν να διεισδύσουν στο κυτταρόπλασμα του *S.c*, χωρίς να επηρεάζουν την ακεραιότητα την πλασματικής μεμβράνης. Το PAF26 βασίζεται σε έναν μηχανισμό δράσης πολλαπλών σταδίων, που αρχικά αλληλοεπιδρά με το τοίχωμα ή την κυτταρική μεμβράνη, ενδοκυτταρώνεται και συσσωρεύεται στα κενοτόπια. Τελικά, μετά από αυτό μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα και εκτελεί την αντιμυκητιακή του δράση (Peña R, et al, 2020).



## ΕΠΙΛΟΓΟΣ

Συνοψίζοντας, ο οίνος είναι ένα σύνθετο μίγμα, αποτελούμενο από πλήθος ενώσεων, μεταξύ των οποίων και τα πεπτίδια, τα οποία δεν έχουν τόσο εκτενώς μελετηθεί ερευνητικά όσο υπόλοιπες ενώσεις, όπως οι πρωτεΐνες. Παρ' όλα αυτά, τα πεπτίδια αποτελούν ένα σημαντικό αντικείμενο μελέτης στον τομέα τόσο των ποτών όσο και των τροφίμων και η συνεισφορά τους στα διάφορα στάδια οινοποίησης φαίνεται να είναι ιδιαίτερα σημαντική. Οι ποικίλες έρευνες που πραγματοποιούνται με ολοένα και αναλυτικότερες μεθόδους αποσκοπούν στην κατανόηση του ρόλου τους σε όσο το δυνατόν υψηλότερο βαθμό. Τα πεπτίδια αποτελούν πηγή αζώτου για την ανάπτυξη των ζυμομυκήτων, επηρεάζοντας την αλκοολική ζύμωση, συνεισφέρουν στις φυσικοχημικές ιδιότητες των οίνων, όπως στον αφρισμό των αφρώδων οίνων, επηρεάζουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των οίνων, καθώς συγκεκριμένα πεπτίδια έχουν βρεθεί να αποδίδουν ξινή, γλυκιά, πικρή ή umami γεύση σε οίνους, ασκούν αντιοξειδωτική δράση με κύριο εκπρόσωπο το πιο μελετημένο πεπτίδιο γλουταθειόνη, ενώ φαίνεται να ασκούν και ποικίλες βιολογικές δράσεις.

Αν και μικρά σε μέγεθος, ο ρόλος των πεπτιδίων μπορεί να είναι μεγάλος. Πολλά μελλοντικά βήματα μπορούν να γίνουν ως προς την περαιτέρω μελέτη των πεπτιδίων που υπάρχουν στο σταφύλι, στον οίνο, στις οινολάσπες και στην αποσαφήνιση της δράσης τους. Αν και μπορούν να προέλθουν φυσικά από τα σταφύλια, τους ζυμομύκητες και τα βιολογικά προϊόντα αυτών, η προσθήκη επιπλέον ποσότητας πεπτιδίων ως οινολογική παρέμβαση για βελτίωση του προϊόντος απαγορεύεται με εξαίρεση τη γλουταθειόνη. Η γλουταθειόνη είναι το μόνο πεπτίδιο που επιτρέπεται μέχρι στιγμής να προστεθεί στην οινοποιητική διαδικασία, αλλά θα μπορούσε να γίνει μελέτη και άλλων συνθετικών πεπτιδίων παρόμοιας δράσης με την γλουταθειόνη ως προς την αντιοξειδωτική τους ικανότητα, ώστε πιθανόν μελλοντικά να είναι δυνατή η χρήση τους στην οινοποίηση. Επίσης, θα μπορούσε να μελετηθεί η χρήση πεπτιδίων για την αύξηση της ποσότητας του αφομοιώσιμου αζώτου κατά την οινοποίηση, αποφεύγοντας τις κολλημένες ζυμώσεις και την έλλειψη τροφής για τους ζυμομύκητες. Μια ακόμα συνεισφορά που μπορεί να έχει αυτό, είναι πως μέσω της εφαρμογής συγκεκριμένων επιθυμητών πεπτιδίων υπάρχει περισσότερος έλεγχος στην οινοποιητική διαδικασία. Επίσης, θα προσφέρεται περισσότερη προστασία έναντι των προσβολών από μικροοργανισμούς και οξειδώσεις αποφεύγοντας την προσθήκη υπερβολικών ποσοτήτων θειώδους. Πιθανόν, να βελτιώνονται και τα αρνητικά χαρακτηριστικά των οίνων μέσω των πεπτιδίων που θα προστίθενται.

Μελλοντικά, με την ανάπτυξη των ενόργανων τεχνικών ανάλυσης μπορούν να δοκιμαστούν νέες τεχνικές απομόνωσης και ανάλυσης πεπτιδίων σε δείγματα σταφύλων, οίνου αλλά και οινολασπών. Όπως αναφέρθηκε και στην παρούσα εργασία, η μελέτη των πεπτιδίων ήταν έως πρόσφατα σχετικά περιορισμένη, λόγω της δυσκολίας απομόνωσής τους, εξαιτίας του μικρού τους μεγέθους και ταυτόχρονα της ανάγκης διαχωρισμού τους από άλλες ουσίες του οίνου. Είναι ανάγκη να δοκιμαστούν περισσότερες μεθοδολογίες είτε πιο εξελιγμένες είτε σε συνδυασμό, προκειμένου να προκύψουν τεχνολογίες απόλυτα αξιόπιστες, που θα αποσκοπούν στην αποκλειστική απομόνωση πεπτιδίων, τα οποία θα έχουν διαχωριστεί από άλλες ουσίες. Οι πιθανολογούμενες αυτές τεχνικές θα μπορούσαν να εστιάζουν στη μείωση των ορίων ανίχνευσης μέσω της χρήσης στήλης HPLC που απομονώνει μικρότερες ουσίες. Με αυτό τον τρόπο θα εστιάζει αποκλειστικά στην απομόνωση του επιθυμητού μήκους, όσο μικρό και αν είναι αυτό αποκλείοντας άλλες παρόμοιου μεγέθους ενώσεις να περάσουν. Με άλλα λόγια η μελλοντική εξέλιξη των εφαρμοσμένων τεχνολογιών είναι ο δρόμος για τη διευκόλυνση του τρόπου απομόνωσης και κατ' επέκταση της αποτελεσματικότερης και καλύτερης μελέτης και επιτήδειων.

Με την πάροδο του χρόνου, η επιστήμη και εφαρμοζόμενες αναλυτικές τεχνικές για τη μελέτη των οίνων εξελίσσονται σε υψηλό βαθμό με αποτέλεσμα να αλλάζουν τα δεδομένα και οι καταστάσεις. Με την εύρεση των αλληλουχιών των πεπτιδίων που θα απομονωθούν από διάφορους οίνους θα μπορέσει πιθανόν να αποσαφηνιστεί περαιτέρω και ο τρόπος που αυτά επιδρούν στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου, τις φυσικοχημικές του ιδιότητες αλλά και ποιες ευεργετικές βιολογικές δράσεις μπορούν να έχουν στην υγεία του ανθρώπου.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

### **ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- Βιβλία

Christian, Dasgupta & Schug, ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ, Επιστημονική επιμέλεια: Ε. Αμανατίδης, Γ. Ζαχαριάδης, ΕΚΔΟΣΕΙΣ odysseus publishing σελ. 620-621, 660-669, 704-706 & 718, 2020.

- Πτυχιακές, Μεταπτυχιακές και Διδακτορικές Διατριβές

Ευαγγέλου Αλεξάνδρα, (2008) PhD. Ανάπτυξη συνθετικών πεπτιδίων και αντισωμάτων για τη μελέτη του νευροπροστατευτικού 24 - πεπτιδίου ουμανίνη (Humanin). Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Χημείας.

Καραχοτζή Χριστίνα, (2017). Βιοενεργά πεπτίδια των τροφίμων και η επίδραση τους στην ανθρώπινη υγεία. Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Κρήτης Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας Τμήμα Διατροφής Και Διαιτολογίας.

Καρβέλα Ευαγγελία, Ph.D., 2020 MBA, Παραγωγή Οίνου

Πατρινός Α. Σωτήριος, (2016). Επίδραση προσθήκης γλουταθειόνης στα ποιοτικά χαρακτηριστικά λευκού οίνου. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, μεταπτυχιακό τμήμα "Αμπελουργία-Οινολογία".

Τσουμαχίδου Σοφία, MSc (2012) Ανάπτυξη μοντέλων συγκράτησης αναλυτών σε στήλες υγρής χρωματογραφίας με τη βοήθεια της ανάλυσης κύριων συστατικών (PCA), ΑΠΘ, Τμήμα Χημείας

### **ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- Βιβλία

Flamini R., Hyphenated Techniques in Grape and Wine Chemistry, 2008, John Wiley & Sons, Ltd. ISBN: 978-0-470-06187-9

Moreno-Arribas M. Victoria & Polo M. Carmen, Wine Chemistry and Biochemistry - Springer, 2009

Waterhouse A.L, Sacks G.L. and Jeffery D.W., Understanding Wine Chemistry, Wiley, 2016

- Άρθρα σε επιστημονικά περιοδικά

Acquah Caleb, Yi Wei Chan, Sharadwata Pan, Dominic Agyei, Chibuikwe C. Udenigwe. "Structure-informed Separation Of Bioactive Peptides". J Food Biochem, vol. 43, no. 1, 2019, p. e12765. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12765>.

Alanon, M. & Pérez-Coello, M.S. & Marina, M.L. (2015). Wine science in the metabolomics era. TrAC Trends in Analytical Chemistry. 74. 10.1016/j.trac.2015.05.006.

Albuquerque Wendell, Parviz Ghezellou, Binglin Li, Bernhard Spengler, Frank Will, Holger Zorn, Martin Gand. Identification of intact peptides by top-down peptidomics reveals cleavage spots in thermolabile wine proteins, *Food Chemistry*, Volume 363, 2021, 130437, ISSN 0308-8146. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130437>.

Alcaide, Juan Maria & Martínez-Rodríguez, Adolfo & Martín-Álvarez, Pedro & Pueyo, Encarnacion. (2008). Influence of the elaboration process on the peptide fraction with angiotensin I-converting enzyme inhibitor activity in sparkling wines and red wines aged on lees. *Food Chemistry*. 111. 965–969. 10.1016/j.foodchem.2008.05.015.

Arapitsas P, Ugliano M, Marangon M, Piombino P, Rolle L, Gerbi V, Versari A, Mattivi F. Use of Untargeted Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Metabolome To Discriminate Italian Monovarietal Red Wines, Produced in Their Different Terroirs. *J Agric Food Chem*. 2020 Nov 25;68(47):13353-13366. doi: 10.1021/acs.jafc.0c00879.

Arju G, Berg HY, Lints T, Nisamedtinov I. Methodology for Analysis of Peptide Consumption by Yeast during Fermentation of Enzymatic Protein Hydrolysate Supplemented Synthetic Medium Using UPLC-IMS-HRMS. *Fermentation*. 2022; 8(4):145. <https://doi.org/10.3390/fermentation8040145>.

Bahut F, Liu Y, Romanet R, Coelho C, Sieczkowski N, Alexandre H, Schmitt-Kopplin P, Nikolantonaki M, Gougeon RD. Metabolic diversity conveyed by the process leading to glutathione accumulation in inactivated dry yeast: A synthetic media study. *Food Res Int*. 2019 Sep;123:762-770. doi: 10.1016/j.foodres.

Bao X, Wu J. Impact of food-derived bioactive peptides on gut function and health. *Food Res Int*. 2021 Sep;147:110485. doi: 10.1016/j.foodres.2021.110485.

Bartolomé Begoña, Victoria Moreno-Arribas, Encarnación Pueyo, and M. Carmen Polo. On-Line HPLC Photodiode Array Detection and OPA Derivatization for Partial Identification of Small Peptides from White Wine *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1997 45 (9), 3374-3381. DOI: 10.1021/jf9700844.

Becerra-Rodríguez C, Marsit S, Galeote V. Diversity of Oligopeptide Transport in Yeast and Its Impact on Adaptation to Winemaking Conditions. *Front Genet*. 2020 Jun 10;11:602. doi: 10.3389/fgene.2020.00602.

Bravo Francisca Isabel, Anna Mas-Capdevila, Raúl López-Fernández-Sobrino, Cristina Torres-Fuentes, Miquel Mulero, Juan María Alcaide-Hidalgo, Begoña Mugarza. Identification of novel antihypertensive peptides from wine lees hydrolysate, *Food Chemistry*, Volume 366, 2022, 130690, ISSN 0308-8146. [doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130690](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130690).

Catharino, R. R., Cunha, I. B. S., Fogaca, A. O., Facco, E. M. P., Godoy, H. T., Daudt, C. E., Eberlin, M. N. and Sawaya, A. (2006). Characterization of must and wine of six varieties of grapes by direct infusion electrospray ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom*. 41:185–190

Chambery, Angela & del Monaco, Giovanni & Di Maro, Antimo & Parente, Augusto. (2009). Peptide fingerprint of high quality Campania white wines by MALDI-TOF mass spectrometry. *Food Chemistry*. 113. 1283-1289. 10.1016/j.foodchem.2008.08.031.

- Comitini F, Agarbati A, Canonico L, Ciani M. Yeast Interactions and Molecular Mechanisms in Wine Fermentation: A Comprehensive Review. *Int J Mol Sci.* 2021 Jul 20;22(14):7754. doi: 10.3390/ijms22147754. PMID: 34299371; PMCID: PMC8307806.
- De Person, Marine & Sevestre, Aude & Chaimbault, Patrick & Perrot, Laurent & Duchiron, Francis & Elfakir, Claire. (2004). Characterization of low-molecular weight peptides in champagne wine by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta.* 10.1016/j.aca.2004.03.094.
- Desportes C, Charpentier M, Duteurtre B, Maujean A, Duchiron F. Liquid chromatographic fractionation of small peptides from wine. *J Chromatogr A.* 2000 Oct 6;893(2):281-91. doi: 10.1016/S0021-9673(00)00698-1. PMID: 11073298
- Desportes, C. & Charpentier, M. & Duteurtre, B. & Maujean, A. & Duchiron, Francis. (2001). Isolation, Identification, and Organoleptic Characterization of Low-Molecular-Weight Peptides from White Wine. *American Journal of Enology and Viticulture.* 52. 376-380. 10.5344/ajev.2001.52.4.37.
- Duc, C, Maçna, F.; Sanchez, I.; Galeote, V.; Delpech, S.; Silvano, A.; Mouret, J.-R. Large-Scale Screening of Thiol and Fermentative Aroma Production during Wine Alcoholic Fermentation: Exploring the Effects of Assimilable Nitrogen and Peptides. *Fermentation* 2020, 6, 98. <https://doi.org/10.3390/fermentation6040098>.
- Enrique M, Marcos JF, Yuste M, Martínez M, Vallés S, Manzanares P. Antimicrobial action of synthetic peptides towards wine spoilage yeasts. *Int J Food Microbiol.* 2007 Sep 30;118(3):318-25. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.049.
- Ferreira Ricardo B., Maria A. Pic, arra-Pereira, Sara Monteiro, Virgí lio B. Loureiro, Artur R. Teixeira. The wine proteins July 2001 *Trends in Food Science & Technology* 12(7):230-239. DOI:10.1016/S0924-2244.
- Gallo M, Ferranti P. The evolution of analytical chemistry methods in foodomics. *J Chromatogr A.* 2016 Jan 8;1428:3-15. doi: 10.1016/j.chroma.2015.09.007.
- Gawel R, Smith PA, Cicerale S, Keast R. The mouthfeel of white wine. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2018;58(17):2939-2956. doi: 10.1080/10408398.2017.1346584.
- Guzmán Fanny, Sonia Barberis, Andrés Illanes. Peptide synthesis: chemical or enzymatic *Electronic Journal of Biotechnology* versión On-line ISSN 0717-3458 *Electron. J. Biotechnol.* v.10 n.2 Valparaíso abr. 2007. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-34582007000200012>.
- Hervé Alexandre, & GUILLOUX-BENATIER, MICHÈLE. (2008). Yeast autolysis in sparkling wine - A review. *Australian Journal of Grape and Wine Research.* 12. 119 – 127. 10.1111/j.1755-0238.2006.tb00051.x.
- Martínez-Rodríguez AJ, Polo MC. Characterization of the nitrogen compounds released during yeast autolysis in a model wine system. *J Agric Food Chem.* 2000 Apr;48(4):1081-5. doi: 10.1021/jf991047a. PMID: 10775353.
- Martínez-Rodríguez, Adolfo & Pueyo, Encarnacion. (2009). SparklingWines and Yeast Autolysis. 10.1007/978-0-387-74118-5\_4. January 2009, In book: *Wine Chemistry and Biochemistry* (pp.61-80)

Martini Serena, Lisa Solieri, Davide Tagliazucchi. Peptidomics: new trends in food science, *Current Opinion in Food Science*, Volume 39, 2021, Pages 51-59, ISSN 2214-7993, <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.12.016>.

Moreno-Arribas Victoria Encarnación Pueyo, and M. Carmen Polo, Peptides in Musts and Wines. Changes during the Manufacture of Cavas (Sparkling Wines) *J. Agric. Food Chem.*, 1996, 44 (12), pp 3783–3788

Moreno-Arribas M. V., B. Bartolomé, E. Pueyo, and M. C. Isolation and Characterization of Individual Peptides from Wine . *Agric. Food Chem.* 1998, 46, 9, 3422–3425  
Publication Date: August 29, 1998. <https://doi.org/10.1021/jf980178t>.

Moreno-Arribas, María Victoria & Pueyo, Encarnación & Polo, MC. (2002). Analytical methods for the characterization of proteins and peptides in wines. *Analytica Chimica Acta*. 458. 63-75. 10.1016/S0003-2670(01)01531-8

Ni, He & Li, Lin & Guo, Sha-Sha & Li, Hai-Hang & Jiang, Rui & Hu, Song-Qing. (2012). Isolation and Identification of an Angiotensin-I Converting Enzyme Inhibitory Peptide from Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Current Analytical Chemistry*. 8. 180-185. 10.2174/157341112798472224

Nikolantonaki M, Julien P, Coelho C, Roullier-Gall C, Ballester J, Schmitt-Kopplin P, Gougeon RD. Impact of Glutathione on Wines Oxidative Stability: A Combined Sensory and Metabolomic Study. *Front Chem.* 2018 Jun 8;6:182. doi: 10.3389/fchem.2018.00182. PMID: 29938203; PMCID: PMC6002495.

Nunes-Miranda JD, Igrejas G, Araujo E, Reboiro-Jato M, Capelo JL. Mass spectrometry-based fingerprinting of proteins & peptides in wine quality control: a critical overview. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2013;53(7):751-9. doi: 10.1080/10408398.2011.557514. PMID: 23638934.

Peña, R, Vílches, J.G.-Poblete, C. Ganga, M.A. Effect of *Candida intermedia* LAMAP1790 Antimicrobial Peptides against Wine-Spoilage Yeasts *Brettanomyces bruxellensis* and *Pichia guilliermondii*. *Fermentation* **2020**, *6*, 65. doi.org/10.3390/fermentation6030065

Perez Espitia Paula Judith, Nilda de Fatima Ferreira Soares, Jane S´elia dos Reis Coimbra, N´elio Jos´e de Andrade, Renato Souza Cruz, and Eber Antonio Alves Medeiros Bioactive Peptides: Synthesis, Properties, and Applications in the Packaging and Preservation of Food 2012 Institute of Food Technologists Vol.11,2012 Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 187-204.

Pérez-Gregorio R, Soares S, Mateus N, de Freitas V. Bioactive Peptides and Dietary Polyphenols: Two Sides of the Same Coin. *Molecules.* 2020 Jul 29;25(15):3443. . doi: 10.3390/molecules25153443.

Pizzorno J. Glutathione! *Integr Med (Encinitas).* 2014 Feb;13(1):8-12. PMID: 26770075; PMCID: PMC4684116.

Sáenz-Navajas María-Pilar, Purificación Fernández-Zurbano & Vicente Ferreira.(2012) Contribution of Nonvolatile Composition to Wine Flavor, *Food Reviews International*, 28:4, 389-411. DOI: 10.1080/87559129.2012.660717.

Sáez V, Schober D, González Á, Arapitsas P. LC-MS-Based Metabolomics Discriminates Premium from Standard Chilean cv. Cabernet Sauvignon Wines from Different Valleys. *Metabolites*. 2021 Nov 30;11(12):829. doi: 10.3390/metabo11120829.

Schwander F, Arapitsas P, Duchêne É, Nikolantonaki M, Ontañón I, Carlin S, Schwander F, Gougeon RD, Ferreira ACS, Theodoridis G, Töpfer R, Vrhovsek U, Adam-Blondon AF, Pezzotti M, Mattivi F. Grapevine and Wine Metabolomics-Based Guidelines for FAIR Data and Metadata Management. *Metabolites*. 2021 Nov 3;11(11):757. doi: 10.3390/metabo11110757.

Sirén K, Mak SST, Fischer U, Hansen LH, Gilbert MTP. Multi-omics and potential applications in wine production. *Curr Opin Biotechnol*. 2019 Apr;56:172-178. doi: 10.1016/j.copbio.2018.11.014.

Sonni F, Clark AC, Prenzler PD, Riponi C, Scollary GR. Antioxidant action of glutathione and the ascorbic acid/glutathione pair in a model white wine. *J Agric Food Chem*. 2011 Apr 27;59(8):3940-9. DOI:10.3390/fermentation6030076 LicenseCC BY 4.0. doi: 10.1021/jf104575w.

Soomets, U., Zilmer, M., Langel, I. (2005). Manual Solid Phase Synthesis of Glutathione Analogs. In: Howl, J. (eds) *Peptide Synthesis and Applications*. *Methods in Molecular Biology™*, vol 298. Humana Press.

Stivala María Gilda , Gisselle Raquel Apud, Pedro Aredes Fernández. Release of Biologically Active Peptides from Grape Juice by *Oenococcus oeni* Isolated from Argentine Wine Universidad Nacional de Tucumán Location: *American Journal of Enology and Viticulture*, ISSN 0002-9254, Vol. 69, Nº 1, 2018,89-93.

Takayanagi Tsutomu, Koki Yokotsuka *Am J Enol Vitic*. January 1999 50:65-68; published ahead of print January 01, 1999; DOI: 10.5344/ajev.1999.50.1.65

Vejarano Ricardo. Non-Saccharomyces in Winemaking: Source of Mannoproteins, Nitrogen, Enzymes, and Antimicrobial Compounds July 2020 *Fermentation* 6(3):76 (Αυτό το άρθρο ανήκει στο ειδικό τεύχος *Enological Reimpacts of Non-Saccharomyces Species 2.0*).

Yanai T, Suzuki Y, Sato M. Prolyl endopeptidase inhibitory peptides in wine. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2003 Feb;67(2):380-2. doi: 10.1271/bbb.67.380. PMID: 12729003

Zhou M, et al. Peptides in Brewed Wines: Formation, Structure, and Function. *J Agric Food Chem*. 2021 Mar 10;69(9):2647-2657. doi: 10.1021/acs.jafc.1c00452.