

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ
ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ (NMR)**



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ
ΠΑΛΑΙΩΣΗΣ ΤΟΥ ΟΙΝΟΥ ΜΕ ΤΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ
ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ NMR**

ΜΑΡΙΑ ΑΜΑΡΓΙΑΝΙΤΑΚΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ ΣΠΥΡΟΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2015

UNIVERSITY OF GREECE
DEPARTMENT OF CHEMISTRY

NMR LABORATORY



DOCTORAL THESIS

**ANALYSIS AND OPTIMIZATION OF THE WINE
MAKING PROCEDURE BY NUCLEAR MAGNETIC
RESONANCE SPECTROSCOPY**

MARIA AMARGIANITAKI

THESIS SUPERVISOR: APOSTOLOS SPYROS

HERAKLION 2015

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

- 1) Απόστολος Σπύρος (Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης)
- 2) Μιχαλόπουλος Νικόλαος (Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης)
- 3) Νταής Φώτης (Ομότιμος Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης)

Επταμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

- 1) Απόστολος Σπύρος (Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης)
- 2) Κατερινόπουλος Χαράλαμπος (Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης)
- 3) Μιχαλόπουλος Νικόλαος (Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης)
- 4) Νταής Φώτης (Ομότιμος Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης)
- 5) Περγαντής Σπυρίδων (Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης)
- 6) Στεφάνου Ευριπίδης (Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης)
- 7) Φυσαράκης Ιωάννης (Ομότιμος Καθηγητής, Τμήμα Τεχνολογίας Γεωπονίας, ΤΕΙ Κρήτης)

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Απόστολο Σπύρο για την ανάθεση αυτής της εργασίας και για τις πολύτιμες γνώσεις και βοήθεια που μου προσέφερε.

Ευχαριστώ τον ομότιμο καθηγητή κ. Φώτη Νταή για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και για την άψογη συνεργασία που είχαμε.

Στην συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της επταμελούς επιτροπής που δέχτηκαν να κρίνουν την εργασία μου.

Ακόμη, ευχαριστώ το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης που μου έδωσε τη δυνατότητα να εκπονήσω την παρούσα διατριβή, καθώς και για την υλικοτεχνική υποδομή που μου παρείχε.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου NMR, Σοφία Σφακιανάκη, Έφη Μανωλοπούλου, Ευαγγελία Ράλλη, Γεώργιο Μαρκάκη, Μαρκέλλα Κοντούδη και Γεώργιο Αλεξάκη για το ευχάριστο κλίμα και την καλή συνεργασία που είχαμε όλο το χρονικό διάστημα της εκπόνησης της διατριβής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου Αντώνη και Χαρίκλεια και στον αδερφό μου Μάνο, για την ηθική υποστήριξη που μου έδειξαν όλον αυτόν τον καιρό και που είναι πάντα δίπλα μου.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Αμαργιανιτάκη Μαρία

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Επώνυμο	Αμαργιανιτάκη
Όνομα	Μαρία
Ημερομηνία Γέννησης	26/11/1986
Τόπος Γέννησης	Ηράκλειο Κρήτης

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑΣ

Διεύθυνση κατοικίας	Πελοποννήσου 28
Πόλη	Ηράκλειο Κρήτης
T.K.	71304
Τηλέφωνο οικίας	2810-260020
Κινητό τηλέφωνο	6977282430
e-mail	mariaamarg@hotmail.com

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

- 2004: Αποφοίτηση από το 2ο Λύκειο Ηρακλείου (Βαθμός απολυτηρίου 17 και 6/10, Λίαν Καλώς)
- 2009: Πτυχίο Χημείας, Τμήμα Χημείας της σχολής Θετικών και Τεχνολογικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Κρήτης (Βαθμός Πτυχίου 7.0, Λίαν Καλώς)
- 2012: Μεταπτυχιακό δίπλωμα ειδίκευσης στον τομέα της Αναλυτικής Χημείας με τίτλο «Προσδιορισμός υδατοδιαλυτών οργανικών ενώσεων σε δευτερογενή αερολύματα με Φασματοσκοπία NMR», Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης
- 2015: Υποψήφια Διδάκτωρ στον τομέα της Αναλυτικής Χημείας με θέμα «Ανάλυση και βελτιστοποίηση της παλαιώσης του οίνου με τη Φασματοσκοπία NMR, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

ΓΝΩΣΕΙΣ Η/Υ - ΔΕΞΙΟΤΗΤΕΣ

- Χρήση προγραμμάτων του Microsoft office (WORD, POWERPOINT, EXCEL) , WIN-NMR, ORIGIN, TOPSPIN, CHEM DRAW, SIMCA, AMIX, CHENOMX
- Χειρισμός οργάνων: Φασματογράφος NMR (Bruker AMX500, DPX300)

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

- **ΑΓΓΛΙΚΑ** Άριστο επίπεδο, Πτυχίο: Certificate of Proficiency in English, University of Michigan
- **ΓΑΛΛΙΚΑ** Ικανοποιητικό επίπεδο, Πτυχίο: Diplome d' etudes en langues francaise (DELF).

ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- **2009:** Εκπόνηση διπλωματικής εργασίας στην οργανική χημεία με τίτλο «Φωτοοξειδώσεις και συνθετικές προσεγγίσεις υποκατεστημένων πυρρολικών συστημάτων», Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης
- **01/11/2012-30/09/2015:** Σύμβαση ανάθεσης έργου: «ΘΑΛΗΣ-ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ-Αξιολόγηση και βελτιστοποίηση των παραγόντων παλαιώσης ερυθρών και λευκών οίνων από Κρητικές ποικιλίες. Παραγωγή οίνων προστιθέμενης ποιοτικής αξίας (ΠΑΛΑΙΟΣΟΙΝΟΣ)» με τον Ειδικό Λογαριασμό του Πανεπιστημίου Κρήτης
- **01/02/2014-31/03/2014:** Σύμβαση ανάθεσης έργου με περιστασιακή απασχόληση: «Λήψη φασμάτων πετρελαϊκών κλασμάτων» με τον Ειδικό Λογαριασμό του Πανεπιστημίου Κρήτης

ΔΙΔΑΚΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- **2010:** Βοηθός στα προπτυχιακά εργαστήρια Αναλυτικής Χημείας I του Πανεπιστημίου Κρήτης
- **2012:** Βοηθός στα προπτυχιακά εργαστήρια Αναλυτικής Χημείας II του Πανεπιστημίου Κρήτης
- **2013:** Φροντιστηριακός βοηθός στο μεταπτυχιακό μάθημα Φασματοσκοπία NMR στο τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. NMR metabolic profiling of the wine maturation procedure in four red and white Cretan indigenous cultivars as a function of barrel type. M. Amargianitaki, Ph. Dais and A. Spyros, J. Agric. Food Chem., in preparation.
2. Comparison of the nonvolatile NMR sensometabolome of Cretan red and white wines with panel test sensory attributes and quality indices. M Amargianitaki, M. Basalekou, Ph. Dais and A. Spyros, J. Agric. Food Chem., in preparation.

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- M. Amargianitaki, A. Spyros, P. Dais « Analysis and optimization of the wine making procedure by NMR spectroscopy»:XII International Conference on the Applications of Magnetic Resonance in Food Science: Defining Food by Magnetic Resonance, 20-23 May 2014, Cesena, Italy
- A. Spyros, P. Dais, M. Amargianitaki, E. Ralli and M. Misiak «Small molecule analysis in food: an overview and some recent applications»: SMASH 2013, Small Molecule NMR Conference, 22-25 September 2013, Santiago de Compostela, Spain
- A. Spyros, M. Amargianitaki, E. Ralli, G. Markakis, M. Stomi and M. Pantelidou «NMR metabolomics in food analysis, authentication and quality control»: 4th Transylvanian NMR Workshop, 27-29 September 2013, Cluj-Napoca, Romania.
- M. Αμαργιανιτάκη, Θ. Τζιάρας, Ε. Στεφάνου, Α. Σπύρος «Ανάλυση αερολυμάτων με την Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού»: 17^ο Συνέδριο Μεταπτυχιακών Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, , 2011, Ηρακλειο Κρήτης
- 1st Russian –Hellenic Symposium with international participation and young scientist's school (Κρήτη 2010)
- Mariza A. Alberti, Maria Amargianitaki and Michael Orfanopoulos «Photocatalytic oxidations of substituted pyrroles and their derivatives: Isolation and Characterization»: 13^ο Πανελλήνιο Συμπόσιο Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας Ένωση Ελλήνων Χημικών,2008, Αθήνα

ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΣΕΜΙΝΑΡΙΩΝ

- «Αέρια Χρωματογραφία-Φασματομετρία μάζας», γραφεία Ε.Ε.Χ. Π.Τ. Κρήτης, 6 Απριλίου 2013
- «Συστήματα Διαχείρισης Ποιότητας», γραφεία Ε.Ε.Χ. Π.Τ. Κρήτης, 12-19 Μαΐου 2011

ΜΕΛΟΣ

- Ένωση Ελλήνων Χημικών

CURRICULUM VITAE

Maria A. Amargianitaki

PERSONAL DATA

- **Name-Surname** Maria Amargianitaki
- **Father's name** Antonios
- **Mother's name** Harikleia
- **Date of Birth** 26/11/1986
- **Place of Birth** Heraklion Crete
- **Nationality** Greek
- **Home address** Peloponnissou 28
- **Telephone** 6977282430
- **e-mail** mariaamarg@hotmail.com
mariaamarg@chemistry.uoc.gr

EDUCATION

- **2004:** Graduation from 2nd High School of Heraklion
- **2009:** B. Sc. in Chemistry, Department of Chemistry, University of Crete, Heraklion Crete, Greece
- **2012:** M. Sc. in Analytical Chemistry, Department of Chemistry, University of Crete, Heraklion Crete, Greece
«Characterization of water-soluble organic compounds in secondary aerosols by NMR spectroscopy»
- **2015:** Ph.D. candidate in NMR spectroscopy, Department of Chemistry, University of Crete, Heraklion Crete, Greece
«Analysis and optimization of the wine making procedure by NMR spectroscopy»

TECHNICAL KNOWLEDGE

- Microsoft office Suite Programs (WORD, POWERPOINT, EXCEL), WIN-NMR, ORIGIN, TOPSPIN, CHEM DRAW, SIMCA, AMIX, CHENOMX
- Handling Devices: NMR Spectrometer (Bruker DPX300, AVANCE500)

FOREIGN LANGUAGES

- **English** Certificate of Proficiency in English, University of Michigan
- **French** Diplome d' etudes en langue francaise (Delf)

EXPERIENCE

- **2007-2009:** Diploma thesis in Organic Chemistry, Department of Chemistry, University of Crete, Heraklion Crete, Greece
«Photocatalytic oxidations of substituted pyrroles and their derivatives: Isolation and Characterization»
- **01/11/2012-present:** Researcher, «Evaluation and optimization of the quality factors during wine maturation produced from Cretan red and white grape varieties», research program funded by European Union and Greece, Department of Chemistry, University of Crete, Heraklion Crete, Greece
- **01/02/2014-31/03/2014:** Participation as a researcher in NMR characterization of petroleum fractions, NMR laboratory, Department of Chemistry, University of Crete, Heraklion Crete, Greece

TEACHING EXPERIENCE

- **2010:** Lab assistant in Analytical Chemistry I laboratory, Department of Chemistry, University of Crete, Heraklion Crete, Greece
- **2012:** Lab assistant in Analytical Chemistry II laboratory, Department of Chemistry, University of Crete, Heraklion Crete, Greece
- **2013:** Teaching assistant in postgraduate class «NMR Spectroscopy», Department of Chemistry, University of Crete, Heraklion Crete, Greece

PUBLICATIONS

3. NMR metabolic profiling of the wine maturation procedure in four red and white Cretan indigenous cultivars as a function of barrel type. M. Amargianitaki, Ph. Dais and A. Spyros, J. Agric. Food Chem., in preparation
4. Comparison of the nonvolatile NMR sensometabolome of Cretan red and white wines with panel test sensory attributes and quality indices. M Amargianitaki, M. Basalekou, Ph. Dais and A. Spyros, J. Agric. Food Chem., in preparation

PARTICIPATION IN CONFERENCES

- M. Amargianitaki, A. Spyros, P. Dais « Analysis and optimization of the wine making procedure by NMR spectroscopy»:XII International Conference on the Applications of Magnetic Resonance in Food Science: Defining Food by Magnetic Resonance, 20-23 May 2014, Cesena, Italy
- A. Spyros, P. Dais, M. Amargianitaki, E. Ralli and M. Misiak «Small molecule analysis in food: an overview and some recent applications»: SMASH 2013, Small Molecule NMR Conference, 22-25 September 2013, Santiago de Compostela, Spain
- A. Spyros, M. Amargianitaki, E. Ralli, G. Markakis, M. Stomi and M. Pantelidou «NMR metabolomics in food analysis, authentication and quality control»: 4th Transylvanian NMR Workshop, 27-29 September 2013, Cluj-Napoca, Romania.
- M. Amargianitaki, T. Tziaras, E. Stefanou, A. Spyros «Analysis of aerosols by NMR Spectroscopy»: 17^o conference of Chemistry grad students, University of Crete, 2011, Heraklion, Greece
- 1st Russian –Hellenic Symposium with international participation and young scientist's school (Crete 2010)
- Mariza A. Alberti, Maria Amargianitaki and Michael Orfanopoulos «Photocatalytic oxidations of substituted pyrroles and their derivatives: Isolation and Characterization»: 13^o Panhellenic Conference of Pharmaceutical Chemistry, Department of Organic and Pharmaceutical Chemistry, 2008, Athens

SEMINARS

- «Gas Chromatography-Mass Spectrometry», office of the Association of Greek Chemists, 6 April 2013, Heraklion, Greece
- «Quality Management Systems», office of the Association of Greek Chemists, May 12-19, 2011, Heraklion, Greece

MEMBERSHIP

- Association of Greek Chemists

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
ABSTRACT	3
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	5
1.1 ΟΙΝΟΣ.....	5
1.1.1 ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΣΤΑΦΥΛΙΟΥ	6
1.1.2 ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΟΙΝΟΥ	7
1.1.2.1 ΟΡΓΑΝΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ	7
1.2 ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	10
1.2.1 ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΥΡΙΩΝ ΣΥΝΙΣΤΩΣΩΝ (PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS, PCA).....	12
1.2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΡΙΚΩΝ ΕΛΑΧΙΣΤΩΝ ΤΕΤΡΑΓΩΝΩΝ (PLS) ΚΑΙ ΟΡΘΟΓΩΝΙΚΩΝ ΜΕΡΙΚΩΝ ΕΛΑΧΙΣΤΩΝ ΤΕΤΡΑΓΩΝΩΝ (OPLS).....	13
1.2.3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΡΙΤΟΤΗΤΑΣ (DISCRIMINANT ANALYSIS, DA)	14
1.2.5 ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΡΙΤΟΤΗΤΑΣ ΜΕΡΙΚΩΝ ΕΛΑΧΙΣΤΩΝ ΤΕΤΡΑΓΩΝΩΝ (PARTIAL LEAST SQUARES DISCRIMINANT ANALYSIS, PLS-DA)	15
1.3 ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΕ ΠΟΤΑ ΚΑΙ ΤΡΟΦΙΜΑ ΜΕ ΤΗΝ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ NMR.....	15
1.4 ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΟΙΝΟΥ ΜΕ ΤΗΝ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ NMR.....	19
1.5 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΟΙΝΟΥ ΜΕ ΆΛΛΕΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ	23
1.6 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ³¹ P NMR	26
1.7 ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ ΟΙΝΟΥ (ΓΕΥΣΙΓΝΩΣΙΑ)	29
1.7.1 ΑΡΩΜΑΤΑ ΤΟΥ ΟΙΝΟΥ.....	29
1.7.2 ΓΕΥΣΗ ΤΟΥ ΟΙΝΟΥ	30
ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	31
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	313
2.1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΠΡΟΤΥΠΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ	33
2.2 ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΟΙΝΟΥ	33
2.3 ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗ.....	37
2.3.1 ΛΕΥΚΗ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗ	37
2.3.2 ΕΡΥΘΡΗ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗ	39
2.4 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ NMR.....	40
2.5 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΦΑΙΝΟΛΙΚΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΤΩΝ ΟΙΝΩΝ ΜΕ ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ	40
2.6 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΙΝΟΥ ΜΕ ΤΗΝ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ³¹ P NMR	41
2.6.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ	41
2.6.2 ΣΥΝΘΕΣΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ ΦΩΣΦΟΡΟΥ	41
2.6.3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΙΝΟΥ ΜΕ ΤΗΝ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ³¹ P NMR.....	42
2.7 ΦΑΣΜΑΤΑ NMR.....	43
2.7.1 ΜΟΝΟΔΙΑΣΤΑΤΑ ΦΑΣΜΑΤΑ ¹ H NMR	43
2.7.2 ΜΟΝΟΔΙΑΣΤΑΤΑ ΦΑΣΜΑΤΑ ³¹ P NMR.....	44
2.7.3 ΔΙΣΔΙΑΣΤΑΤΑ ΦΑΣΜΑΤΑ NMR.....	44
2.8 ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΤΟΥ ΟΙΝΟΥ.....	45
2.9 ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΙΝΟΥ.....	45
2.10 ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΟΙΝΩΝ.....	47

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	48
3.1 ΜΕΛΕΤΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΙΝΟΥ ΜΕ ΤΗΝ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ¹H NMR ΣΕ ΔΙΑΛΥΤΗ ΔΕΥΤΕΡΙΩΜΕΝΟ ΝΕΡΟ (D₂O)	48
3.1.1 ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΤΟΥ ΟΙΝΟΥ.....	48
3.1.2 ΑΝΑΘΕΣΗ ΤΩΝ ΚΟΡΥΦΩΝ ΤΗΣ ΔΙΪΔΡΟΜΠΙΝΕΤΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΡΟΜΠΙΝΕΤΙΝΗΣ ΣΤΑ ΦΑΣΜΑΤΑ NMR ΤΟΥ ΟΙΝΟΥ.....	55
3.1.3 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΙΝΟΥ	57
3.1.5 ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΙΝΟΥ ΤΟΥ Α ΤΡΥΓΟΥ (2012) 67	
3.1.6 ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΙΝΟΥ ΤΟΥ Β ΤΡΥΓΟΥ (2013) 76	
3.1.7 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΙΝΟΥ ΠΟΥ ΑΝΑΛΥΘΗΚΑΝ ΓΙΑ ΤΟΥΣ 2 ΤΡΥΓΗΤΟΥΣ (2012, 2013).....	85
3.2 ΜΕΛΕΤΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΙΝΟΥ ΜΕ ΤΗΝ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ¹H NMR ΣΕ ΔΙΑΛΥΤΗ ΔΕΥΤΕΡΙΩΜΕΝΗ ΜΕΘΑΝΟΛΗ.....	90
3.2.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΤΟΥ ΟΙΝΟΥ ΣΤΑ ΦΑΣΜΑΤΑ ¹H NMR	90
3.2.2 ΑΝΑΘΕΣΗ ΤΩΝ ΚΟΡΥΦΩΝ ΤΗΣ ΔΙΪΔΡΟΜΠΙΝΕΤΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΡΟΜΠΙΝΕΤΙΝΗΣ ΣΤΑ ΦΑΣΜΑΤΑ ¹H NMR	98
3.2.3 ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΙΝΟΥ ΣΕ ΦΑΣΜΑΤΑ ¹H NMR	101
3.2.3.1 ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΙΝΟΥ ΤΗΣ ΠΡΩΤΗΣ ΧΡΟΝΙΑΣ ΤΡΥΓΗΤΟΥ (2012).....	102
3.2.3.2 ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΙΝΟΥ ΤΗΣ ΔΕΥΤΕΡΗΣ ΧΡΟΝΙΑΣ ΤΡΥΓΗΤΟΥ (2013).....	105
3.3 ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΦΑΙΝΟΛΙΚΟΥ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΙΝΟΥ ΜΕ ΤΗΝ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ³¹P NMR	113
3.3.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΤΟΥ ΟΙΝΟΥ ΣΤΑ ΦΑΣΜΑΤΑ ³¹P NMR	113
3.3.2 ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΙΝΟΥ ΣΤΑ ΦΑΣΜΑΤΑ ³¹P NMR	115
3.4 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΓΕΥΣΤΙΚΩΝ ΔΟΚΙΜΩΝ ΜΕ ΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ NMR	120
3.4.1 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΓΕΥΣΤΙΚΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΟΙΝΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ NMR ΓΙΑ ΤΟΝ Α ΤΡΥΓΟ	120
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	126
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1:ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΔΕΛΟΜΕΝΑ	130
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2:ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΛΟΜΕΝΑ NMR ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ	142
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	182

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 2.1: Δείγματα οίνου και τύπος περιέκτη.....	34
Πίνακας 3.1: Ενώσεις και χημικές μετατοπίσεις των ενώσεων που αναλύθηκαν με NMR.....	50
Πίνακας 3.2: Χημική δομή των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στα δείγματα οίνου με την Φασματοσκοπία NMR.....	52
Πίνακας 3.3: Χημικές μετατοπίσεις των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν με τη Φασματοσκοπία NMR στο φαινολικό κλάσμα των οίνων.....	95
Πίνακας 3.4 Χημικές ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν στο φαινολικό κλάσμα του οίνου.....	95
Πίνακας 3.5: Χημικές μετατοπίσεις της διϋδρορομπινετίνης στα φάσματα ^1H NMR και ^{13}C NMR.....	100
Πίνακας 3.6: Χημικές μετατοπίσεις της ρομπινετίνης στα φάσματα ^1H NMR και ^{13}C NMR.....	101
Πίνακας 3.7: Χημικές μετατοπίσεις των ενώσεων του οίνου που ταυτοποιήθηκαν στα φάσματα ^{31}P NMR.....	115

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διατριβή αναφέρεται στην μελέτη της διαδικασίας παλαίωσης του οίνου με τη χρήση της Φασματοσκοπίας NMR και της χημειομετρίας. Τα δείγματα οίνου που αναλύθηκαν προέρχονταν από γηγενείς ποικιλίες οινοστάφυλων της Κρήτης (Δαφνί, Βηλάννα-λευκά και Κοτσιφάλι, Μαντηλάρι-ερυθρά) και είχαν αποθηκευθεί για ωρίμανση σε περιέκτες διαφόρων τύπων (δεξαμενή inox, δεξαμενή με ρινίσματα δρυός), και σε βαρέλια (αμερικανική δρυς, γαλλική δρυς, καστανιά και ακακία). Οι αναλύσεις των οίνων με τη Φασματοσκοπία NMR πραγματοποιήθηκαν για δύο διαδοχικούς τρύγους (2012, 2013) και η διαδικασία της ωρίμανσης μελετήθηκε για χρονικό διάστημα παραμονής έως και 12 μήνες σε βαρέλι με τρίμηνη δειγματοληψία. Παράλληλα, αναλύθηκαν και δείγματα οίνων μετά την ωρίμανσή τους σε περιέκτες για διάστημα έως 12 μήνες και την παραμονή τους σε φιάλες για επιπλέον 12 μήνες.

Η Φασματοσκοπία ^1H NMR χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό ενός μεγάλου αριθμού μη-πτητικών οργανικών ενώσεων (μεταβολιτών) του οίνου, στις οποίες περιλαμβάνονται οργανικά οξέα (γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ, πυροσταφυλικό οξύ, κιτρικό οξύ, μηλικό οξύ, ηλεκτρικό οξύ, κιτρομηλικό οξύ, φουμαρικό οξύ), σάκχαρα (α - και β -γλυκόζη, σουκρόζη, φρουκτόζη, τριαλόζη, γαλακτουρονικό οξύ), αμινοξέα (αλανίνη, προλίνη), αλκοόλες (μεθανόλη, γλυκερόλη ινοσιτόλη, ισοπεντανόλη, 1,3-προπανοδιόλη), φαινολικές ενώσεις (trans-καφαρικό οξύ, τυροσόλη, γαλλικό οξύ, 2-φαινυλοαιθανόλη, διϋδρορομπινετίνη, ρομπινετίνη), και άλλες ενώσεις (χολίνη, ουριδίνη, ουρακίλη, κυτοσίνη, τριγονελλίνη, ιστιδίνη, ακεταλδεΐδη).

Η χημειομετρική ανάλυση των ^1H NMR μεταβολομικών προφίλ των οίνων με τη βοήθεια πολυπαραμετρικών στατιστικών μοντέλων ανάλυσης έδειξε ότι μπορούν χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη μεταβολομικών μοντέλων NMR τα οποία α) διακρίνουν τις γηγενείς κρητικές ποικιλίες ανεξαρτήτως χρόνου ωρίμανσης και με πολύ ισχυρή προβλεπτική ικανότητα β) παραμετροποιούν την διαδικασία ωρίμανσης των οίνων για κάθε ποικιλία και προβλέπουν ικανοποιητικά την διάρκειά της σε περιέκτες, και γ) διακρίνουν τον τύπο του περιέκτη στον οποίο πραγματοποιήθηκε η ωρίμανση του οίνου, ιδιαίτερα στην περίπτωση των βαρελιών ακακίας και καστανιάς. Προτάθηκε η χρήση της φαινόλης διϋδρορομπινετίνης ως ιχνηλάτη ωρίμανσης σε

βαρέλι ακακίας, και υπολογίστηκε η ταχύτητα εκχύλισής της από το βαρέλι στον οίνο για δύο διαδοχικούς τρύγους.

Επιπλέον, αναπτύχθηκε μία νέα μέθοδος για τον ποσοτικό προσδιορισμό των πολυφαινολών του οίνου με την χρήση της Φασματοσκοπίας ^{31}P NMR και ^1H NMR, η οποία βασίστηκε στην εκχύλιση στερεάς φάσης για να επιτύχει την απομόνωση του φαινολικού κλάσματος του οίνου. Οι φαινολικές ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν με αυτή τη μεθοδολογία στους οίνους ήταν οι φλαβονόλες (κερκετίνη, καμφερόλη, ρομπινετίνη), οι ανθοκυάνες (μαλβιδίνη, πεονιδίνη), οι φαινολικές αλκοόλες (τυροσόλη, 2-φαινυλοαιθανόλη), τα στιλβένια (cis-, trans-ρεσβερατρόλη), οι φλαβανόλες (κατεχίνη, επικατεχίνη), τα φαινολικά οξέα (trans-καφταρικό οξύ, καφεϊκό οξύ, πρωτοκατεχικό οξύ, γαλλικό οξύ, βανιλλικό οξύ, συριγγικό οξύ, trans-κουταρικό οξύ), ο φαινολικός εστέρας (γαλλικός αιθυλεστέρας) και η φλαβανονόλη (διϋδρορομπινετίνη). Η χημειομετρική ανάλυση των ^1H και ^{31}P NMR φασματικών φαινολικών αποτυπωμάτων των οίνων με τη βοήθεια πολυπαραμετρικών στατιστικών μοντέλων ανάλυσης (PCA, OPLS-DA) έδειξε ότι αυτά υπερέχουν στην διάκριση μεταξύ των περιεκτών ωρίμανσης των οίνων.

Τέλος, έγινε συσχέτιση των συγκεντρώσεων των μεταβολιτών που ταυτοποιήθηκαν με την Φασματοσκοπία NMR στους οίνους με τα αποτελέσματα της οργανοληπτικής εξέτασής τους από πάνελ επαγγελματιών γευσιγνωστών. Βρέθηκε εξαιρετική συσχέτιση του μεταβολικού προφίλ NMR τόσο με τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των οίνων (οξύτητα, γλυκύτητα, πικράδα, στυφάδα) κατά τον Α' τρύγο, ιδιαίτερα με την γευσιγνωστική οξύτητα, και καλή συσχέτιση με τους βαθμούς (scores) που απέδωσε το πάνελ των επαγγελματιών γευσιγνωστών στους οίνους. Με την εφαρμογή της μεταβολομικής ανάλυσης των δεδομένων NMR εξετάστηκε η δυνατότητα συσχέτισης και πρόβλεψης των βέλτιστων οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των οίνων με βάση τις πειραματικές αναλυτικές και φασματοσκοπικές μετρήσεις και τα γευσιγνωστικά δεδομένα.

Λέξεις κλειδιά: Οίνος, Φασματοσκοπία NMR, Μεταβολομική ανάλυση, Κοτσιφάλι, Μαντηλάρι, Βηλάνα, Δαφνί

ABSTRACT

This dissertation reports the use of NMR spectroscopy and NMR-based metabolomics/chemometrics to study the wine maturation procedure. The wines studied were vinified from four indigenous Cretan grape cultivars (Dafni, Vilana – white and Kotsifali, Mantilari – red) and were left to mature in different types of inox tanks (with or without addition of oak oinosticks) and wooden barrels (French oak, American oak, acacia and chestnut). Maturing wines were sampled and analyzed by quantitative ^1H NMR spectroscopy every three months for a total of 12 months, and for two consecutive production years (2012, 2013). Wine samples that had matured in tanks or barrels for 3, 6 9 and 12 months were also bottled and stored for 12 months, before they were analyzed.

NMR spectroscopy was used for the detection and quantification of a large number of non-volatile organic compounds in wine (metabolites), including organic acids (lactic, acetic, pyruvic, citric, malic, succinic, citramalic, fumaric), sugars (α -, and β - glucose, sucrose, fructose, trehalose, galacturonic acid), aminoacids (alanine, proline), alcohols (methanol, glycerol, inositol, isopentanol, 1,3-propanediol), phenolic compounds (trans-caftaric acid, tyrosol, gallic acid, 2-phenylethanol, dihydrorobinetin, robinetin) and other compounds (choline, uridine, uracil, cytidine, trigonelline, histidine and acetaldehyde).

Chemometrics analysis of the ^1H NMR-obtained wine metabolic profiles using multivariate statistical analysis models (PCA, OPLS, OPLS-DA) demonstrated that NMR based metabolomics can be used to develop models that a) differentiate between wines from indigenous Cretan cultivars with excellent predicting ability, regardless of maturation time in barrels, b) parametrize the wine maturation procedure for each cultivar in different barrels and predict adequately the duration of maturation used, and c) determine the type of barrel used for wine maturation, especially for acacia and chestnut barrels. The extraction rate of dihydrorobinetin from the wood of acacia barrels to the wine body was determined for two consecutive years, and this compound is proposed as a metabolomic marker of wine maturation in acacia barrels.

A novel methodology for the quantitative determination of wine polyphenolics using ^1H and ^{31}P NMR spectroscopy was also developed, based on the isolation of the phenolic fraction of wine using solid phase extraction. Several categories of phenolic

compounds were determined in wine using this approach, including flavonols (quercetin, campferol, robinetin), anthocyanins (malvidin, peonidin), phenolic alcohols (tyrosol, 2-phenyl ethanol), stilbenes (cis- and trans resveratrol), flavanols (catechin, epicatechin), phenolic acids/esters (trans-caftaric acid, caffeic acid, protocatechuic acid, gallic acid, vanillic acid, syringic acid, trans-coutaric acid, ethyl gallate) and the flavanone dihydrorobinetin. Chemometrics analysis of the ^1H and ^{31}P NMR spectral phenolic fingerprints using bucketing and multivariate statistical analysis models (PCA, OPLS-DA) showed that phenolic fingerprinting offers superior model performance with respect to barrel type discrimination in the wines studied, compared to metabolite NMR profiling of the whole non-volatile metabolome.

Finally, the correlation between the NMR-obtained non-volatile metabolomic data set and sensory panel analysis data provided by professional wine tasters was examined. Excellent correlation was found between the NMR metabolic profiling and the sensory attributes of wines (acidity, sweetness, bitterness, astringency) during the first wine production year (2012), especially for panel acidity, and good correlation was also found with the wine total scores attributed by the sensory panel, as a function of wine maturation and barrel type. Finally, NMR-based metabolomics also offered the possibility of correlating and estimating the optimum organoleptic characteristics of the wines based on experimental analytical, spectroscopic and sensory panel data.

Keywords: wine, NMR Spectroscopy, metabolomics, Kotsifali, Mandilari, Vilana, Dafni

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΟΙΝΟΣ

Ο οίνος είναι αλκοολούχο ποτό, προϊόν της ζύμωσης νωπών σταφυλιών ή του γλεύκους τους.¹ Η κυριότερη διεργασία που γίνεται κατά την αλκοολική ζύμωση είναι η μετατροπή των σακχάρων του χυμού των σταφυλιών σε αιθανόλη. Ακριβέστερα, η αλκοολική ζύμωση είναι η μετατροπή εξοζών ($C_6H_{12}O_6$) σε αιθανόλη (CH_3CH_2OH) και διοξείδιο του άνθρακα (CO_2) που γίνεται από τους ζυμομύκητες (βιοχημική αντίδραση). Εκτός από την μετατροπή των εξοζών σε αιθανόλη, εκατοντάδες άλλες βιοχημικές αντιδράσεις γίνονται παράλληλα από τα ενζυμικά συστήματα των ζυμομυκήτων, συμβάλλοντας στην ποιότητα του τελικού προϊόντος. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν εκείνες οι βιομετατροπές που παράγουν χημικά συστατικά, τα οποία εμπλουτίζουν το τελικό προϊόν και του προσδίδουν καλύτερη γεύση και πλουσιότερα αρώματα. Επίσης παρουσιάζουν ενδιαφέρον και οι βιομετατροπές που παράγουν χημικά συστατικά, τα οποία υποβαθμίζουν το τελικό προϊόν ως προς τη γεύση και τα αρώματα.

Το αμπέλι από το οποίο παράγεται ο οίνος είναι από τα παλαιότερα φυτά που παρουσιάστηκαν στη γη και κανείς δε γνωρίζει με βεβαιότητα την καταγωγή του. Η πιθανότερη προέλευση του είναι από την Ασία και την Αίγυπτο. Από αυτές τις χώρες διαδόθηκε η καλλιέργεια της αμπέλου στην Ελλάδα και γενικότερα στις χώρες της Μεσογείου.

Για τους αρχαίους Έλληνες ο οίνος ήταν σημαντικό και αναπόσπαστο κομμάτι της ζωής τους. Ήταν αυτοί που ανέπτυξαν την τέχνη της οινοποιίας, την καλλιέργεια της αμπέλου και μονοπωλούσαν την αγορά για αιώνες. Το όνομα κρασί προέκυψε από τη λέξη κράνυμι που σημαίνει «αναμειγνύω», αντικατοπτρίζοντας τον πλέον διαδεδομένο τρόπο κατανάλωσης του οίνου εκείνη την ιστορική περίοδο, αναμειγμένο με νερό. Η αναλογία ανάμειξης ήταν δύο μέρη νερού προς ένα μέρος οίνου, επιβραδύνοντας με αυτόν τον τρόπο την κατανάλωση του. Ο οίνος χρησίμευε και σαν φαρμακευτική ουσία (απολύμανση και πλύση τραυμάτων, παραγωγή φαρμάκων).

Στις μέρες μας η κυριότερη εμπορική άμπελος που καλλιεργείται για οινοποίηση είναι η *Vitis Vinifera*, ή Ευρωπαϊκή άμπελος. Τα είδη αυτής που καλλιεργούνται σήμερα ξεπερνούν τις 4000 ποικιλίες, ενώ στην Ευρώπη παράγεται το

78.5% της παγκόσμιας παραγωγής οίνου, γεγονός στο οποίο συνεισφέρει σημαντικά η καταλληλότητα των κλιματολογικών συνθηκών και του εύκρατου κλίματος των χωρών στα παράλια της Μεσογείου.²

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η κατανάλωση του ερυθρού οίνου ελαττώνει τον κίνδυνο θανάτου από στεφανιαία νόσο.³ Επιπλέον είναι πιθανό να μειώσει τον κίνδυνο καρκινογένεσης και άλλων ασθενειών όπως η νόσος του Αλτςχάιμερ ή η άνοια⁴. Αυτό συνήθως αποδίδεται στις αντιοξειδωτικές και αγγειοδιασταλτικές ιδιότητες του πολυφαινολικού κλάσματος του του οίνου.

1.1.1 ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΣΤΑΦΥΛΙΟΥ

Το σταφύλι αποτελείται από δύο κύρια μέρη: το ξυλώδες μέρος, που ονομάζεται βόστρυχας και την ράγα, που αποτελεί το οινοποιήσιμο τμήμα του σταφυλιού.

ΒΟΣΤΡΥΧΑΣ

Το συστατικό που βρίσκεται σε μεγαλύτερη αναλογία στο βόστρυχα είναι το νερό. Με την πάροδο του χρόνου το νερό μειώνεται με αποτέλεσμα την αύξηση της ξηρής ουσίας αυτού. Το μεγαλύτερο μέρος αυτής αποτελείται από ξυλώδεις ουσίες, ενώ το υπόλοιπο περιλαμβάνει: ταννίνες, ρητίνες, αζωτούχες ενώσεις, ανόργανα συστατικά, οργανικά οξέα και σάκχαρα.

ΡΑΓΑ

Η ράγα αποτελείται από το φλοιό (10-20%), την σάρκα (74-87%) και τα γίγαρτα (3-6%). Τα ποσοστά αυτά κυμαίνονται ανάλογα με την ποικιλία του σταφυλιού, τις εδαφοκλιματικές συνθήκες και τον βαθμό ωρίμανσης.

Ο φλοιός περιέχει κυρίως νερό (70-80%), ελάχιστη ποσότητα σακχάρων και λίγα οξέα, κυρίως κιτρικό. Περιέχει επίσης ταννίνες (1-6%), στις οποίες οφείλεται η στυφή γεύση των ερυθρών οίνων. Η σάρκα αποτελεί το πιο σημαντικό μέρος της ράγας που περιέχει αποκλειστικά το χυμό του σταφυλιού, ο οποίος θα αποτελέσει το προς οινοποίηση γλεύκος. Η σάρκα αποτελείται από: νερό, σάκχαρα, οργανικά οξέα, αζωτούχες ενώσεις, πηκτινικές ύλες, ανόργανα συστατικά, αρωματικές ουσίες, χρωστικές και ταννίνες. Τα γίγαρτα είναι τα όργανα αναπαραγωγής της αμπέλου. Περιέχουν νερό, σάκχαρα και πολυσακχαρίτες, δεψικές ύλες, αζωτούχες ενώσεις,

ανόργανες ύλες, ελαιώδεις ουσίες και λιπαρά οξέα. Οι δεικτικές ύλες και οι άλλες φαινολικές ενώσεις των γιγάρτων διαλυτοποιούνται κατά την διάρκεια της ερυθρής οινοποίησης και επηρεάζουν αρνητικά την ποιότητα του οίνου, γι' αυτό επιβάλλεται η γρήγορη απομάκρυνση τους. Επιπλέον πρέπει να αποφεύγεται το σπάσιμο των γιγάρτων κατά την έκθλιψη των σταφυλιών για να μην μεταφερθεί στον οίνο το γιγατέλαιο που δίνει δυσάρεστη οσμή και γεύση.⁵

1.1.2 ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΟΙΝΟΥ

Τα κυριότερα συστατικά του οίνου διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες που περιέχουν το νερό, τα οργανικά (οργανικά οξέα, αλκοόλες, σάκχαρα, φαινολικές ενώσεις, αζωτούχες ενώσεις, βιταμίνες, ένζυμα) και τα ανόργανα συστατικά (Cl^- , K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} κ.α.). Το νερό αποτελεί το 80-85% του οίνου και σ' αυτό είναι διαλυμένα τα υπόλοιπα συστατικά του.

1.1.2.1 ΟΡΓΑΝΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

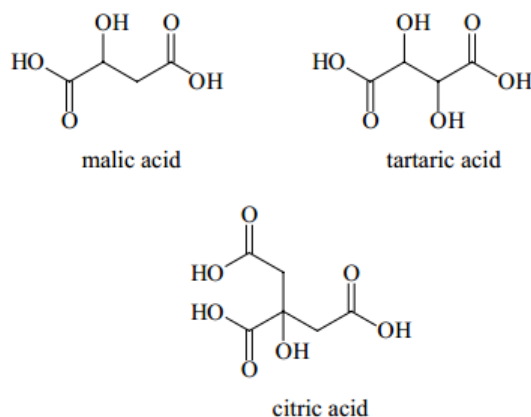
ΟΡΓΑΝΙΚΑ ΟΞΕΑ

Τα οργανικά οξέα που περιέχονται στον οίνο μπορεί να προέρχονται από το σταφύλι αλλά και από την αλκοολική ζύμωση και τυχόν βακτηριακές προσβολές κατά τη διαδικασία της οινοποίησης και ωρίμανσης του οίνου.

Τα κυριότερα οξέα του οίνου είναι το τρυγικό οξύ, το μηλικό οξύ και το κιτρικό οξύ, τα οποία διατηρούν το pH του οίνου γύρω στο 3.2-3.3. Επιπλέον προστατεύουν τον οίνο από τυχόν βακτηριακές προσβολές και του προσδίδουν ζωηρότερο χρώμα. Το τρυγικό οξύ είναι το πιο ισχυρό οξύ του γλεύκους με τη μεγαλύτερη διάσταση ($\text{pK}_a=3,01$). Η συγκέντρωση του στους οίνους είναι 2-5 g/L. Το μηλικό οξύ είναι ευπαθές και οξειδώνεται εύκολα. Η περιεκτικότητά του στους οίνους επηρεάζεται από την ποικιλία της αμπέλου και τις καιρικές συνθήκες που επικρατούν κατά την ωρίμανση. Η συγκέντρωσή του στους οίνους μειώνεται από τις υψηλές θερμοκρασίες του καλοκαιριού.

Επιπλέον προς το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης μπορούν να εμφανιστούν γαλακτικά βακτήρια που μετατρέπουν το μηλικό οξύ σε γαλακτικό οξύ και διοξείδιο του άνθρακα. Αυτή η μετατροπή καλείται μηλογαλακτική ζύμωση και προκαλεί

σημαντική μείωση της οξύτητας του οίνου. Το κιτρικό οξύ είναι πιο σταθερό οξύ από τα άλλα δύο οξέα που αναφέρθηκαν γιατί επηρεάζεται λίγο κατά την ωρίμανση. Κατά την αλκοολική ζύμωση δε μεταβάλλεται το ποσό του κιτρικού οξέος, εκτός αν έχει εκδηλωθεί η μηλογαλακτική ζύμωση όπου το κιτρικό οξύ μετατρέπεται σε οξικό με αποτέλεσμα να μηδενισθεί η περιεκτικότητά του.



Εικόνα 1.1. Τα κυριότερα οξέα του οίνου.

Άλλα οξέα που υπάρχουν στους οίνους είναι τα εξής: γαλακτουρονικό, γλυκουρονικό, γλυκονικό, οξαλικό, ηλεκτρικό, λακτικό, κιτρομηλικό (α-μεθυλομηλικό οξύ), οξικό και μυρμηκικό οξύ.²

ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

Οι φαινολικές ενώσεις προέρχονται κυρίως από τα στερεά μέρη του σταφυλιού και διακρίνονται σε τέσσερις μεγάλες κατηγορίες: τα φαινολικά οξέα, τις φλαβόνες, τις ανθοκυάνες και τις ταννίνες. Οι φαινολικές ενώσεις παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον γιατί είναι υπεύθυνες για το χρώμα των οίνων, προσφέρουν αντιοξειδωτική και αντιβακτηριακή προστασία στους οίνους και συμμετέχουν στην διαμόρφωση της γεύσης τους (στυφάδα/πικράδα). Οι ερυθροί οίνοι περιέχουν φαινόλες σε σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις από τους λευκούς.

Τα φαινολικά οξέα διακρίνονται στα βενζοϊκά (p-υδροξυβενζοϊκό οξύ, πρωτοκατεχικό οξύ, βανιλικό οξύ, γαλλικό οξύ, συριγγικό οξύ, σαλικυλικό οξύ,

γεντισικό οξύ) και τα κινναμωμικά (p-κουμαρικό οξύ, καφεϊκό οξύ, φερουλικό οξύ, σιναπικό οξύ) οξέα. Οι ερυθροί οίνοι περιέχουν 100-150 mg/ml φαινολικά οξέα, ενώ οι λευκοί οίνοι 10-15 mg/ml. Οι φλαβόνες (καμφερόλη, κερκετίνη, μυρισετίνη) αποτελούν τις κίτρινες χρωστικές των φυτών και βρίσκονται κυρίως στους ερυθρούς οίνους. Οι ανθοκυάνες είναι οι ερυθρές χρωστικές του σταφυλιού, οι οποίες εκτός από ελάχιστες περιπτώσεις, βρίσκονται στον φλοιό των ραγών. Η κυριότερη ανθοκυανιδίνη των ερυθρών οίνων είναι η μαλβιδίνη, γι'αυτό ονομάζεται και οινιδίνη. Στις ανθοκυάνες των σταφυλιών το σάκχαρο που συμμετέχει στο σχηματισμό του μορίου τους είναι η γλυκόζη. Ανάλογα με τη θέση και τον αριθμό των μορίων γλυκόζης που προσκολλώνται στο μόριο της ανθοκυανιδίνης σχηματίζονται μονογλυκοζίτες και διγλυκοζίτες. Οι ταννίνες απαντούν κυρίως στους φλοιούς, στους βόστρυχες και στα γίγαρτα και δίνουν στυφή γεύση στον οίνο. Είναι προϊόντα πολυμερισμού των απλούστερων φαινολών και το μοριακό τους βάρος κυμαίνεται μεταξύ 500 και 3000 g/mol. Ανάλογα με τη δομή των μορίων τους, διακρίνονται στις υδρολύμενες και στις συμυκνωμένες. Οι συμυκνωμένες ταννίνες είναι οι φυσικές ταννίνες των σταφυλιών και των οίνων και προέρχονται από τον πολυμερισμό της 3-φλαβονόλης και της 3,4-φλαβονοδιόλης. Οι ερυθροί οίνοι περιέχουν συνήθως 1,5-4 g/L ταννίνες, ενώ οι λευκοί 40-200 mg/L. Οι ταννίνες χαρακτηρίζονται από την αντιοξειδωτική τους δράση, με την οποία προστατεύονται οι ερυθροί οίνοι από τις επιδράσεις του οξυγόνου.

ΑΛΚΟΟΛΕΣ

Οι κυριότερες αλκοόλες που απαντούν στους οίνους είναι η μεθυλική αλκοόλη, η αιθυλική αλκοόλη και οι ανώτερες αλκοόλες. Η μεθυλική αλκοόλη δεν είναι προϊόν αλκοολικής ζύμωσης αλλά προέρχεται από την υδρόλυση των πηκτινών του σταφυλιού. Η ποσότητα της στους οίνους είναι 36-350 mg/l και σε μεγάλες ποσότητες είναι τοξική. Η αιθυλική αλκοόλη είναι το σημαντικότερο συστατικό του οίνου και αποτελεί το κύριο προϊόν της αλκοολικής ζύμωσης. Η ποσότητα της στον οίνο επηρεάζει τη γεύση του, αποτελεί τη βάση του αρώματος του και διευκολύνει την συντήρησή του. Οι ανώτερες αλκοόλες του οίνου είναι δευτερεύοντα προϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης και επηρεάζουν σημαντικά τη διαμόρφωση του αρωματικού μπουκέτου και των γευσιγνωστικών χαρακτηριστικών του οίνου. Οι ανώτερες

αλκοόλες είναι η προπανόλη, η ισοπροπανόλη, η βουτανόλη, η ισοβουτανόλη, η εξανόλη, η 2-φαινυλο-αιθανόλη, η αμυλική και η ισοαμυλική αλκοόλη.

Οι πολυόλες του οίνου αποτελούνται από την γλυκερόλη, την 2,3-βουτανοδιόλη, την μαννιτόλη και την ινοσιτόλη. Η γλυκερόλη αποτελεί δευτερεύον προϊόν της αλκοολικής ζύμωσης και η περιεκτικότητά της στους οίνους εξαρτάται από το ποσό του σακχάρου του γλεύκους, τη φύση των ζυμών και τις συνθήκες ζύμωσης.

ΣΑΚΧΑΡΑ

Τα σάκχαρα αποτελούν σημαντικά συστατικά του γλεύκους διότι κατά την αλκοολική ζύμωση θα μετατραπούν σε αλκοόλη και σε άλλα υποπροϊόντα. Τα κυριότερα σάκχαρα είναι η γλυκόζη και η φρουκτόζη. Η ποσότητα των σακχάρων στο γλεύκος εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως την ποικιλία, τις κλιματολογικές συνθήκες, το βαθμό ωρίμανσης, τις συνθήκες καλλιέργειας, τον τρόπο παραλαβής του γλεύκους και την πιθανότητα προσβολής από τον μύκητα *Botrytis Cinerea*, ο οποίος προκαλεί μικρές ρωγμές στον φλοιό των σταφυλιών με αποτέλεσμα την αύξηση του ποσοστού των σακχάρων και την απώλεια νερού μέσω εξάτμισής του. Οι οίνοι ανάλογα με την περιεκτικότητά τους σε ανάγοντα σάκχαρα χαρακτηρίζονται ως ξηροί, ημίγλυκοι και γλυκοί.⁶

1.2 ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η μεταβολομική ανάλυση (metabolomics) είναι μία χημειομετρική μέθοδος η οποία χρησιμοποιεί πολυπαραμετρικά στατιστικά μοντέλα για να εξάγει τον μέγιστο δυνατό όγκο χρήσιμης πληροφορίας από ένα μεγάλο αριθμό πειραματικών δεδομένων και δειγμάτων και να συσχετίσει μεταξύ τους αναλυτικά δεδομένα που προέρχονται από την ανάλυση ενός μεγάλου αριθμού δειγμάτων με διαφορετικές μεθόδους. Η μεταβολομική ανάλυση έχει βρει ευρεία εφαρμογή στην επιστήμη των τροφίμων, κυρίως με την ανάλυση φασματοσκοπικών δεδομένων που προέρχονται από την φασματοσκοπία μαζών και τη φασματοσκοπία NMR. Η παρουσία εκατοντάδων ενώσεων σε ένα δείγμα τροφίμου με ξεχωριστές ιδιότητες η καθεμία, και η πιθανή μεταξύ τους αλληλεπίδραση δημιουργούν ένα σύνολο αναλυτικών δεδομένων, τα οποία είναι αδύνατον να κατανοηθούν με απλή στατιστική ανάλυση μιας ή δύο

μεταβλητών.⁷ Ο στόχος της μεταβολομικής ανάλυσης με την χρήση της Φασματοσκοπίας NMR σε τρόφιμα είναι (α) η κατηγοριοποίηση ή η διάκριση μεταξύ ομάδων, όπως η γεωγραφική και βοτανική ταξινόμηση των δειγμάτων (ελαιόλαδο, μέλι, κρασί) (β) η μελέτη της σχέσης μεταξύ της σύστασης και των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των δειγμάτων που αναλύονται και (γ) η δημιουργία μοντέλων βαθμονόμησης για τον προσδιορισμό άγνωστων δειγμάτων.

Η μεταβολομική ανάλυση δεδομένων NMR μπορεί να εφαρμοστεί στην ανάλυση τροφίμων ακολουθώντας δύο διαφορετικές μεθοδολογίες. Η πρώτη μέθοδος ονομάζεται στοχευμένο μεταβολικό προφίλ (targeted metabolic profiling) και περιλαμβάνει την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό με την φασματοσκοπία NMR όσο το δυνατό περισσότερων διαφορετικών χημικών συστατικών (μεταβολιτών), οι οποίοι χρησιμοποιούνται στη συνέχεια σαν δεδομένα εισόδου πολυπαραμετρικών στατιστικών μοντέλων για την ταξινόμηση των δειγμάτων και/ή την ανακάλυψη βιοδεικτών (biomarkers) που σχετίζονται με συγκεκριμένες διαδικασίες ενδιαφέροντος στα τρόφιμα (π.χ. ωρίμανση, κλιματολογικές συνθήκες, αποθήκευση, επεξεργασία, κλπ), ή με τον ποιοτικό έλεγχο των τροφίμων. Στη δεύτερη μέθοδο, η οποία αποκαλείται μέθοδος μεταβολικού αποτυπώματος (metabolic fingerprinting), τα φάσματα NMR των δειγμάτων (μετά από κατάλληλη επεξεργασία) χρησιμοποιούνται απευθείας ως δεδομένα εισόδου των στατιστικών μοντέλων, χωρίς ποσοτικοποίηση των επιμέρους χημικών συστατικών τους. Η δεύτερη μέθοδος χρησιμοποιείται για την ανάλυση πολύπλοκων δειγμάτων με πολλά άγνωστα συστατικά, όπου η ποσοτικοποίηση των φασμάτων NMR είναι δύσκολη.

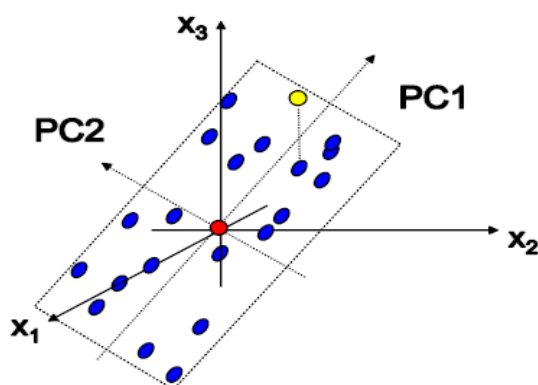
Οι σύνθετες πολυπαραμετρικές στατιστικές μέθοδοι ανάλυσης που θα χρησιμοποιηθούν κυρίως στην παρούσα διατριβή είναι η η **Ανάλυση των Κυρίων Συνιστωσών** (Principal Component Analysis, PCA), η μέθοδος των **Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων** (Partial Least Squares, PLS), και η **Ανάλυση Διακριτότητας Μερικών Ελαχίστων τετραγώνων** (Partial Least Squares-Discriminant Analysis, PLS-DA). Για τις δύο τελευταίες μεθόδους, χρησιμοποιήθηκαν και οι παραλλαγές τους OPLS και OPLS-DA, όπου το O (ορθογωνικό, orthogonal) αφορά την χρήση στα μοντέλα αυτά ορθογωνικών παραγόντων, στους οποίους συγκεντρώνεται η μεταβλητότητα των πειραματικών δεδομένων που οφείλεται σε μεταβλητές διαφορετικές από την υπό εξέταση μεταβλητή, διευκολύνοντας έτσι την μελέτη της τελευταίας.

1.2.1 ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΥΡΙΩΝ ΣΥΝΙΣΤΩΣΩΝ (PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS, PCA)

Η ανάλυση κύριων συνιστωσών (principal component analysis, PCA), που προτάθηκε το 1901 από τον Pearson, είναι μία χημειομετρική μέθοδος κατάλληλη για τη διερεύνηση συσχετίσεων μεταξύ των δεδομένων δειγμάτων διαφορετικών κατηγοριών ή ομάδων. Η ανάλυση PCA βασίζεται στην ανακατανομή της διασποράς (variance) που παρατηρείται στις μεταβλητές (variables) του σετ δεδομένων και στην ελάττωση της διάστασης του σετ δεδομένων με τον επαναπροσδιορισμό των αξόνων ενός διαγράμματος των μεταβλητών και τη δραστική μείωσή τους σε δύο ή τρεις άξονες. Οι άξονες αυτοί ονομάζονται κύριοι άξονες (principal components) και είναι ορθογώνιοι μεταξύ τους. Οι κύριοι άξονες προέρχονται από γραμμικούς συνδυασμούς των αρχικών μεταβλητών και επιτρέπουν την οπτική εξέταση της λανθάνουσας δομής των μετρήσεων. Ο πρώτος κύριος άξονας περιγράφει το μεγαλύτερο ποσοστό διασποράς των μετρήσεων, ενώ οι επόμενοι περιγράφουν μικρότερα ποσοστά διασποράς.

Για την διευκόλυνση της στατιστικής ανάλυσης των μετρήσεων χρησιμοποιείται η παράμετρος που αναφέρεται στην συνεισφορά ή την βαρύτητα (loading) των μεταβλητών στους κύριους άξονες. Η συγκεκριμένη παράμετρος αποτελεί μέτρο για το ποιά ή ποιες μεταβλητές συνεισφέρουν περισσότερο στη δημιουργία ορισμένων κύριων αξόνων,⁸ και βοηθούν στην κατανόηση και καλύτερη απεικόνιση της διασποράς των δειγμάτων με βάση τυχόν ομαδοποιήσεις, αλλά και στην ανακάλυψη μεταβλητών που παρουσιάζουν κοινή διασπορά.

Ακόμη μία παράμετρος που διευκολύνει την ερμηνεία της στατιστικής ανάλυσης με τη μέθοδο PCA είναι οι τιμές (scores) των δειγμάτων ως προς το νέο σύστημα αξόνων που ορίζουν οι κύριοι άξονες PCA. Σε ένα τέτοιο διάγραμμα τα δείγματα τοποθετούνται με βάση τις τιμές τους στο μοντέλο PCA (π.χ. PC1-PC2), απεικονίζοντας πιθανές τάσεις, ομαδοποίησης και ταξινόμησης που προκύπτουν από το σετ πειραματικών δεδομένων για τα μελετηθέντα δείγματα. Η μέθοδος PCA αποτελεί ένα πολύ ισχυρό χημειομετρικό εργαλείο για την κατ' αρχήν ανάλυση μεγάλων σετ πειραματικών δεδομένων, και την απεικόνιση ομαδοποιήσεων και τάσεων, οι οποίες μπορούν να μελετηθούν στη συνέχεια πιο εκτεταμένα με τη χρήση χημειομετρικών μοντέλων ταξινόμησης, όπως αυτά που προκύπτουν από τις μεθόδους PLS και PLS-DA που περιγράφονται στη συνέχεια.



Εικόνα 1.2. Διάγραμμα τιμών στους δύο κύριους άξονες PC1 και PC2.

1.2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΡΙΚΩΝ ΕΛΑΧΙΣΤΩΝ ΤΕΤΡΑΓΩΝΩΝ (PLS) ΚΑΙ ΟΡΘΟΓΩΝΙΚΩΝ ΜΕΡΙΚΩΝ ΕΛΑΧΙΣΤΩΝ ΤΕΤΡΑΓΩΝΩΝ (OPLS)

Η μέθοδος μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS) είναι μία ευρέως χρησιμοποιούμενη στατιστική τεχνική που συνδυάζει στοιχεία της μεθόδου Ανάλυσης Κύριων Συνιστωσών (PCA) και τεχνικών πολλαπλής παλινδρόμησης (multiple regression). Η μέθοδος PLS χρησιμοποιεί μία μήτρα δεδομένων X (ανεξάρτητες μεταβλητές) που περιέχει τις μεταβλητές που εξάγονται από τα φάσματα NMR των δειγμάτων (π.χ. συγκεντρώσεις μεταβολιτών, εντάσεις κορυφών) και αποσκοπεί στην ανάλυση ή πρόβλεψη μιας σειράς εξαρτώμενων συνεχών μεταβλητών που συνιστούν τη μήτρα Y , και που μπορεί να περιλαμβάνει κάποια χημικά χαρακτηριστικά (οξύτητα, γλυκύτητα κλπ) ή δείκτες ποιότητας (π.χ. γευσιγνωστικά χαρακτηριστικά, βαθμολογία) του δείγματος. Στη μέθοδο αυτή επιδιώκεται να βρεθούν ανεξάρτητοι γραμμικοί συνδυασμοί (λανθάνουσες μεταβλητές) της μήτρας X που περιγράφουν και/ή προβλέπουν όσο δυνατόν καλύτερα τη διακύμανση των τιμών των εξαρτώμενων μεταβλητών της μήτρας Y . Ένα επιτυχημένο μοντέλο OPLS εξηγεί σε υψηλό ποσοστό την διακύμανση τόσο των μεταβλητών X (μεταβολίτες NMR) όσο και των Y , και είναι σε θέση να προβλέψει επιτυχώς τις τιμές των συνεχών μεταβλητών Y , οι οποίες συνήθως αποτελούν πειραματικές μετρήσεις με άλλες τεχνικές. Η μέθοδος PLS έχει εφαρμοστεί με επιτυχία στις αναλύσεις τροφίμων που έχουν μελετηθεί με την Φασματοσκοπία NMR. Έχει χρησιμοποιηθεί μεταξύ άλλων για την εκτίμηση της ποιότητας χυμών φρούτων,⁹ της μπίρας,¹⁰ αλλά και για την ανακάλυψη πιθανών

συσχετίσεων μεταξύ της χημικής σύστασης και των γευσιγνωστικών χαρακτηριστικών του οίνου.¹¹

Η μέθοδος των ορθογωνικών μερικών ελαχίστων τετραγώνων (OPLS) αποτελεί μια βελτιωμένη επέκταση της μεθόδου PLS που παρουσιάστηκε για πρώτη φορά το 2002,¹² και στην οποία η το μέρος της διακύμανσης της μήτρας X που οφείλεται σε μεταβλητές που δεν περιλαμβάνονται στη μήτρα Y συγκεντρώνεται σε ορθογωνικούς παράγοντες, ανεξάρτητους των λανθάνουσων μεταβλητών. Με τον τρόπο αυτό βελτιώνεται η οπτική απεικόνιση των σχέσεων ανάμεσα στις λανθάνουσες μεταβλητές και τις συνεχείς μεταβλητές Y χωρίς να επηρεάζεται η προβλεπτική ικανότητα των μοντέλων OPLS.¹³

1.2.3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΡΙΤΟΤΗΤΑΣ (DISCRIMINANT ANALYSIS, DA)

Η στατιστική μέθοδος της Ανάλυσης Διακριτότητας (DA) είναι μία ισχυρή πολυπαραμετρική στατιστική τεχνική, η οποία χρησιμοποιείται για την διαφοροποίηση ή ταξινόμηση δειγμάτων σε ομάδες (classes) με βάση μια σειρά από ανεξάρτητες μεταβλητές (π.χ. συγκέντρωση μεταβολιτών). Η ανάλυση διακριτότητας (DA) συνδυάζει τις διαθέσιμες μεταβλητές με τέτοιο τρόπο ώστε να μεγιστοποιούνται οι διαφορές μεταξύ των διάφορων κατηγοριών, ενώ αξίζει να σημειωθεί ότι η ανάλυση DA ανήκει στην κατηγορία των επιβλεπόμενων (supervised) χημειομετρικών τεχνικών, αφού η κατηγοριοποίηση σε ομάδες είναι δεδομένη και χρησιμοποιείται. Το κύριο πλεονέκτημα των μεθόδων DA είναι ότι με την κατάλληλη επικύρωση της μεθοδολογίας προκύπτουν χημειομετρικά μοντέλα με υψηλή προβλεπτική ικανότητα, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ταξινόμηση νέων/άγνωστων δειγμάτων

Η αρχή λειτουργίας της DA βασίζεται στην δημιουργία συναρτήσεων διάκρισης (discriminant functions), R_i , οι οποίες ονομάζονται και κανονικές ρίζες (canonical roots). Το σύνολο των συναρτήσεων R_i για τις διάφορες ομάδες i ($i=1,2,3..$) αποτελεί το μοντέλο ανάλυσης DA. Οι συναρτήσεις R_i είναι εξαρτημένες μεταβλητές και σχηματίζονται με γραμμικό συνδυασμό των ανεξάρτητων μεταβλητών, x_m ($m=1,2,3,..$), οι οποίες χρησιμοποιούνται για τη διάκριση των κατηγοριών ή ομάδων. Οι συναρτήσεις διάκρισης χρησιμοποιούνται στη συνέχεια για την ταξινόμηση «άγνωστων» δειγμάτων, τα οποία δεν έχουν χρησιμοποιηθεί για την σύσταση του μοντέλου DA.

1.2.5 ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΡΙΤΟΤΗΤΑΣ ΜΕΡΙΚΩΝ ΕΛΑΧΙΣΤΩΝ ΤΕΤΡΑΓΩΝΩΝ (PARTIAL LEAST SQUARES DISCRIMINANT ANALYSIS, PLS-DA)

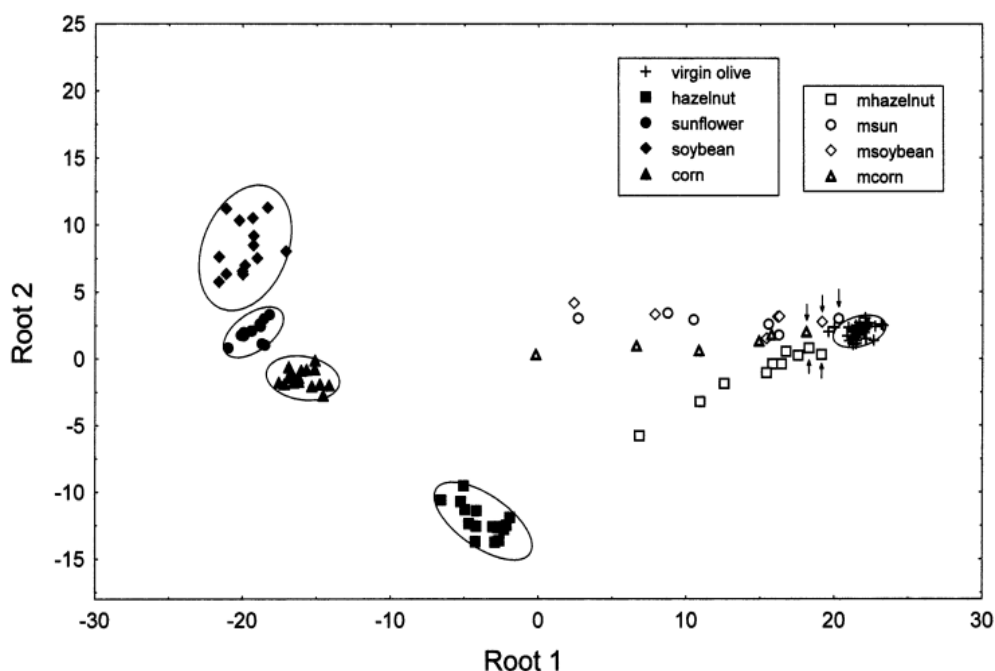
Η ανάλυση διακριτότητας μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA) συνδυάζει δύο πολύ αποτελεσματικές χημειομετρικές μεθόδους (PLS και DA) ώστε να μεγιστοποιηθεί ο διαχωρισμός όσον αφορά την ταξινόμηση μιας σειράς δειγμάτων σε διαφορετικές ομάδες. Η βασική αρχή της μεθόδου PLS-DA είναι η ίδια με αυτή της μεθόδου PLS, με τη διαφορά ότι η μήτρα Y δεν περιέχει συνεχείς μεταβλητές (μεταβλητές που λαμβάνουν συνεχείς τιμές, π.χ. οξύτητα) αλλά μια τεχνητή μεταβλητή (artificial variable) που λαμβάνει διακριτές τιμές (π.χ. ποικιλία οίνου), και η οποία αποτελεί την μεταβλητή διάκρισης/ταξινόμησης για το συγκεκριμένο μοντέλο PLS-DA. Κατ' αναλογία με τη μέθοδο OPLS, στη μέθοδο OPLS-DA το μέρος της διακύμανσης της μήτρας X των ανεξάρτητων μεταβλητών που δεν οφείλεται στην μεταβλητή ταξινόμησης (μήτρα Y) συγκεντρώνεται σε ορθογωνικούς παράγοντες, ανεξάρτητους των λανθάνουσων μεταβλητών OPLS. Οι συναρτήσεις διάκρισης που προκύπτουν από τα μοντέλα PLS-DA και OPLS-DA μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να ταξινομηθούν νέα και άγνωστα δείγματα στα μοντέλα αυτά.

1.3 ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΕ ΠΟΤΑ ΚΑΙ ΤΡΟΦΙΜΑ ΜΕ ΤΗΝ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ NMR

Η Φασματοσκοπία NMR έχει χρησιμοποιηθεί στην ανάλυση της χημικής σύστασης διαφόρων τροφίμων και ποτών. Σε συνδυασμό με την μεταβολομική ανάλυση των φασματοσκοπικών δεδομένων NMR μπορούν να εξαχθούν χρήσιμες πληροφορίες για ένα μεγάλο αριθμό περίπλοκων δειγμάτων τροφίμων.¹⁴

Η μεταβολομική ανάλυση NMR έχει εφαρμοσθεί με επιτυχία στην ανάλυση του εξαιρετικού παρθένου ελαιολάδου και έχει οδηγήσει στην ταξινόμηση των εδώδιμων ελαίων και την ανίχνευση της νοθείας του ελαιολάδου με σπορέλαια αλλά και με άλλα ελαιόλαδα υποβαθμισμένης ποιότητας. Πιο συγκεκριμένα, η Φασματοσκοπία ¹³C NMR έχει χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με την στατιστική μέθοδο Ανάλυση Διακριτότητας στη μελέτη του μη σαπωνοποιημένου μέρους του ελαιολάδου για τον διαχωρισμό παρθένων ελαιολάδων, πυρηνελαίων, ραφιναρισμένων και αγνών ελαιολάδων.¹⁵ Ακόμη μία μελέτη που έχει χρησιμοποιηθεί για την ταξινόμηση διαφόρων ελαίων πραγματοποιήθηκε σε συνδυασμό με την Φασματοσκοπία ³¹P και ¹H

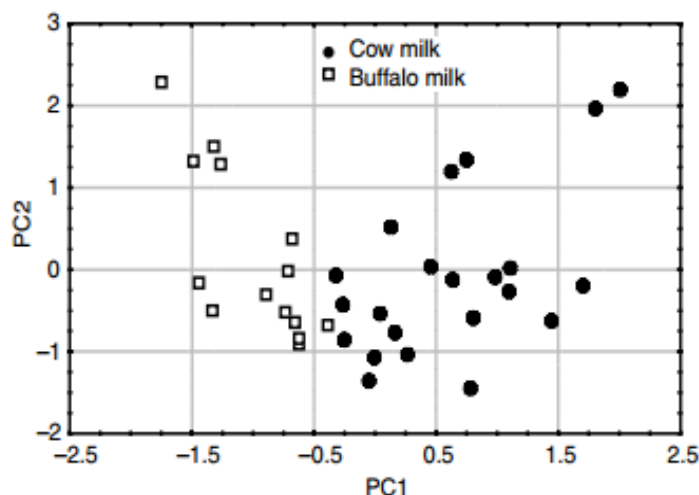
NMR. Τα δείγματα που αναλύθηκαν ήταν φουντουκέλαιο, ηλιέλαιο, αραβοσιτέλαιο, σογιέλαιο, σησαμέλαιο, αμυγδαλέλαιο, φυστικέλαιο, έλαιο καρύδας, παρθένο ελαιόλαδο, καρδαμέλαιο, φοινικέλαιο και έλαιο από σπόρους ελαιοκράμβης από διάφορες περιοχές της Ελλάδας. Από τα φάσματα προσδιορίστηκαν τα 1,2-διγλυκερίδια, 1,3-διγλυκερίδια, ο λόγος των 1,2-διγλυκεριδίων προς τα συνολικά διγλυκρίδια, η οξύτητα, ο αριθμός ιωδίου και η σύσταση των λιπαρών οξέων. Οι παραπάνω μεταβλητές χρησιμοποιήθηκαν στο μοντέλο πρόβλεψης με τη χρήση της Ανάλυσης Διακριτότητας (DA), με αποτέλεσμα τη διάκριση των διάφορων κατηγοριών ελαίων καθώς και την επίτευξη 100% της σωστής ταξινόμησης 64 δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την επικύρωση της μεθόδου. Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα της εικόνας 1.3, είναι δυνατό να πραγματοποιηθεί πολύ καλός διαχωρισμός μεταξύ των πέντε πλέον οικονομικά σημαντικών ειδών εδώδιμων ελαίων. Η προσέγγιση αυτή είναι χρήσιμη για την ανίχνευση και αντιμετώπιση της νοθείας του ελαιολάδου με άλλα φυτικά έλαια παρόμοιας σύστασης.¹⁶



Εικόνα 1.3. Διάγραμμα των συναρτήσεων διάκρισης Root 1 και Root 2 του μοντέλου DA για τον διαχωρισμό πέντε τύπων ελαιολάδου. Τα δείγματα που προέρχονται από μείγματα παρουσιάζονται με κενά σύμβολα.¹³

Μεταβολομικές μελέτες NMR έχουν πραγματοποιηθεί και σε λαχανικά και φρούτα προκειμένου να βρεθεί η χημική τους σύσταση, καθώς και να γίνει διαφοροποίηση μεταξύ των γενετικά τροποποιημένων και των συμβατικών ποικιλιών.¹⁷ Επιπλέον η πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση με την Φασματοσκοπία NMR έχει χρησιμοποιηθεί για την μελέτη των ποικιλιών,¹⁸ της ποιότητας¹⁹ και της γεωγραφικής προέλευσης²⁰ διαφόρων λαχανικών με επιτυχία.

Η Φασματοσκοπία NMR σε συνδυασμό με πολυπαραμετρικές στατιστικές μεθόδους έχει χρησιμοποιηθεί και στην ανάλυση δειγμάτων γάλακτος. Με την χρήση των μονοδιάστατων φασμάτων ¹H NMR και των δισδιάστατων φασμάτων (COSY, HMQC, HMBC) πραγματοποιήθηκε ανάθεση των κορυφών των τριγλυκεριδίων σε δείγματα αγελαδινού και βουβαλίσσιου γάλακτος. Με τις στατιστικές αναλύσεις PCA και HCA κατέστη δυνατή η διαφοροποίηση των δύο ειδών γάλακτος.²¹



Εικόνα 1.4. Διάγραμμα PCA που δείχνει τον διαχωρισμό του αγελαδινού και του βουβαλίσσιου γάλακτος με την χρήση της Φασματοσκοπίας NMR.²¹

Σημαντικές μελέτες έχουν γίνει και σε γαλακτοκομικά προϊόντα (τυρί, γιαούρτι, παγωτό). Η Φασματοσκοπία NMR υγρής και στερεάς έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό του μεταβολικού προφίλ σε διάφορα είδη τυριών, καθώς και για τον προσδιορισμό της γεωγραφικής προέλευσης²², του χρόνου ωρίμανσης²³ και τις συνθήκες αποθήκευσης του.²⁴

Επιπλέον η Φασματοσκοπία ^1H NMR και η ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) έχει χρησιμοποιηθεί στην ανάλυση δειγμάτων μύρας, και αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη μεθοδολογία η οποία μπορεί να ανιχνεύσει τις διαφορές στη χημική σύσταση δειγμάτων μύρας διαφορετικής προέλευσης και διαφορετικού χρόνου παραγωγής. Σε μία μελέτη²⁵ τα δείγματα που αναλύθηκαν ήταν προϊόν της ίδιας εταιρείας με παρόμοιο ποσοστό αιθανόλης 4% v/v, αλλά προέρχονταν από διαφορετικές χώρες και είχαν διαφορετικές ημερομηνίες παραγωγής. Με την ανάλυση των δειγμάτων βρέθηκε να υπάρχει διαφοροποίηση μεταξύ τους στο λακτικό οξύ, το πυροσταφυλικό οξύ, τους υδατάνθρακες και τις αρωματικές ενώσεις (αδενοσίνη/ινοσίνη, ουριδίνη, τυροσίνη/τυροσόλη, 2-φαινυλο-αιθανόλη). Επιπλέον έχει μελετηθεί η ωρίμανση της μύρας στους 45 °C για 18 μέρες με το συνδυασμό της Φασματοσκοπίας NMR και των πολυπαραμετρικών στατιστικών τεχνικών PCA και PLS-DA, προκειμένου να βρεθούν οι μεταβολίτες που επηρεάζονται κατά την ωρίμανση. Βρέθηκε ότι η κύρια ένωση που μεταβάλλεται κατά την ωρίμανση της μύρας είναι 5-υδροξυμεθυλο-φουρφουράλη, η οποία αυξάνεται σταδιακά. Μεταβολές υπήρξαν και σε άλλες ενώσεις όπως: αμινοξέα, ανώτερες αλκοόλες, οργανικά οξέα και δεξτρίνη.²⁶

Σε ακόμη μία μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε αλκοολούχα ποτά (τσίπουρο, ρακί) χρησιμοποιήθηκαν τα μοντέλα PCA και OPLS-DA και έγινε ταξινόμηση των δειγμάτων ανάλογα με την ποικιλία, τον χρόνο παραγωγής και την γεωγραφική προέλευση.²⁷

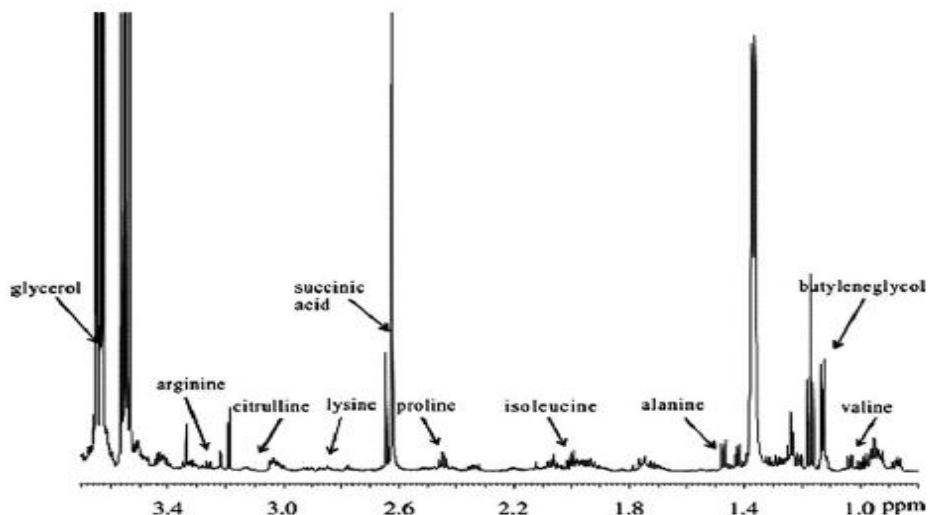
Η Φασματοσκοπία ^{13}C NMR σε συνδυασμό με την μεταβολομική ανάλυση έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση δειγμάτων καφέ (Arabica, Robusta) από έξι διαφορετικές περιοχές (Βραζιλία, Κολομβία, Γουατεμάλα, Τανζανία). Ταυτοποιήθηκαν 14 μεταβολίτες (σουκρόζη, καφεΐνη, γλωρογενικό οξύ, χολίνη, αμινοξέα, οργανικά οξέα και η τριγονελλίνη), οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν για την στατιστική ανάλυση των δειγμάτων. Αναφέρθηκαν διαφοροποιήσεις τόσο μεταξύ των δύο διαφορετικών ποικιλιών, όσο και μεταξύ ποικιλιών που καλλιεργήθηκαν σε διαφορετικές περιοχές. Βρέθηκε ότι οι ενώσεις σουκρόζη, τριγονελλίνη, μηλικό οξύ και κιτρικό οξύ συσχετίζονται θετικά με τον καφέ ποικιλίας Arabica, ενώ οι ενώσεις γλωρογενικό οξύ, καφεΐνη και χολίνη συσχετίζονται θετικά με τον καφέ Robusta.²⁸

Μία μέλετη που πραγματοποιήθηκε σε πράσινο τσάι είχε σκοπό να προσδιοριστούν οι διαφοροποιήσεις στους μεταβολίτες ανάλογα με την περιοχή από την οποία αυτό προέρχεται. Με την χρήση της στατιστικής τεχνικής OPLS-DA επιτεύχθηκε ικανοποιητική διαφοροποίηση μεταξύ δειγμάτων με διαφορετική γεωγραφική προέλευση. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι σε περιοχές με υψηλές θερμοκρασίες υπάρχει σε υψηλότερα ποσοστά στα δείγματα τσαγιού η ένωση θειανίνη, ενώ σε μικρά ποσοστά οι ενώσεις ισολευκίνη, λευκίνη, βαλίνη, αλανίνη, επικατεχίνη, επιγαλλοκατεχίνη, ο γαλλικός εστέρας της επιγαλλοκατεχίνης και η καφεΐνη.²⁹

Η Φασματοσκοπία NMR έχει χρησιμοποιηθεί και στην ανάλυση χυμών φρούτων, οι οποίοι λόγω της υψηλής διατροφικής αξίας και της θετικής συνεισφοράς τους στην διατήρηση της υγείας αποτελούν αντικείμενο υψηλού ενδιαφέροντος. Έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες για τον έλεγχο της ποιότητας και αυθεντικότητας διαφόρων χυμών φρούτων καθώς και εκτίμηση της γεωγραφικής τους προέλευσης.³⁰

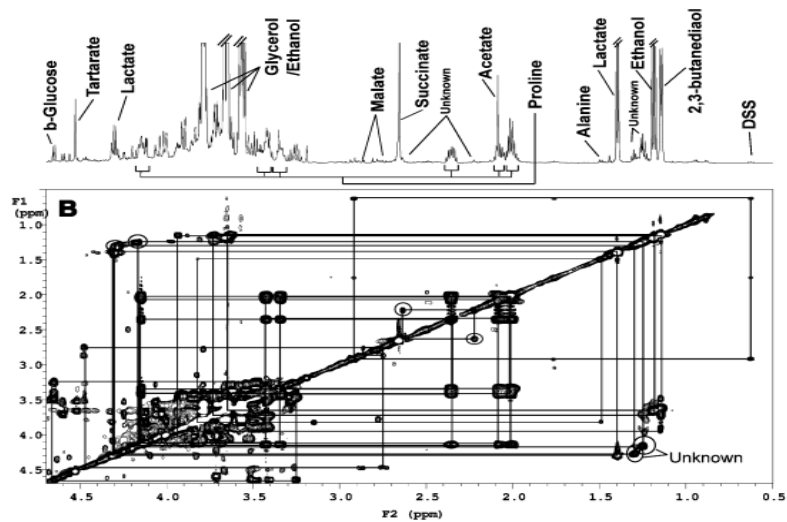
1.4 ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΟΙΝΟΥ ΜΕ ΤΗΝ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ NMR

Οι πρώτες προσπάθειες ανάλυσης του οίνου με την Φασματοσκοπία NMR έγιναν με σκοπό να προσδιορισθεί η ποσότητα της αιθανόλης στον οίνο.³¹ Σε πιο πρόσφατες μελέτες του οίνου χρησιμοποιήθηκε η λυοφιλοποίηση ή η εξάτμιση με αδρανές αέριο (άζωτο ή αργό) προκειμένου να γίνει συμπύκνωση του δείγματος και να μειωθούν οι συγκεντρώσεις του νερού και της αιθανόλης. Στην εικόνα 1.5 παρουσιάζεται η αλειφατική περιοχή του φάσματος ^1H NMR δείγματος οίνου σε φασματόμετρο 600 MHz, όπου εμφανίζονται οι κορυφές των αμινοξέων και της γλυκερόλης.³² Η συμπύκνωση του δείγματος έγινε προκειμένου να αντληθούν περισσότερες πληροφορίες για τις ενώσεις που βρίσκονταν σε μικρότερες συγκεντρώσεις στον οίνο, όπως οι πολυφαινόλες. Η αύξηση της συγκέντρωσης των μικροσυστατικών του δείγματος αύξησε την ευαισθησία (S/N) των μικρών κορυφών του φάσματος και κατέστησε δυνατή την ποσοτικοποίηση τους με την χρήση ενός εσωτερικού προτύπου (TSP, DSS).³³

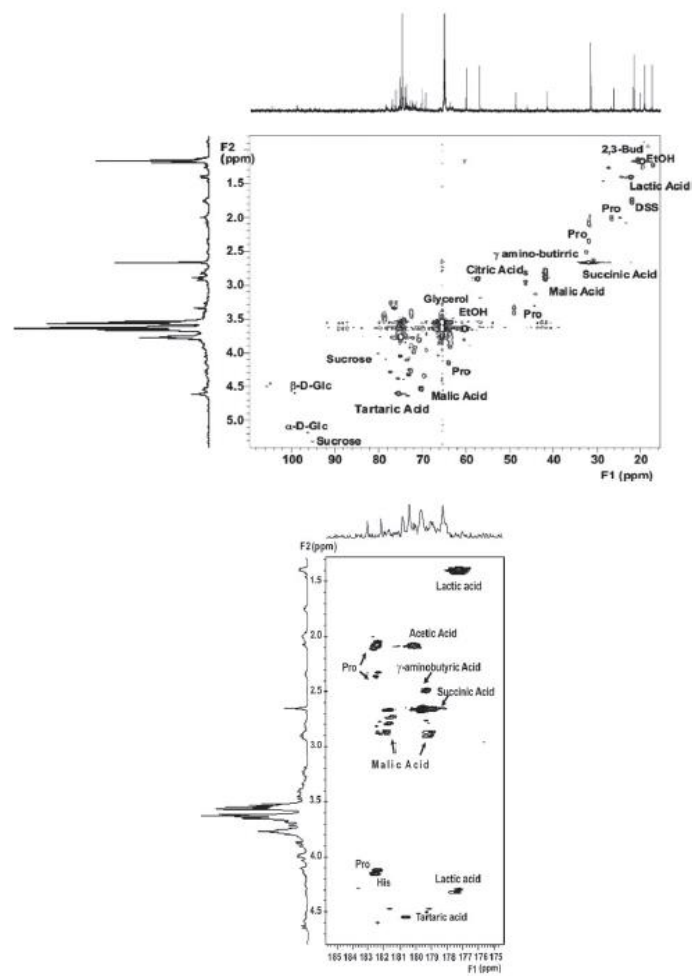


Εικόνα 1.5. Φάσμα ^1H NMR δείγματος οίνου σε φασματόμετρο 600 MHz, όπου εμφανίζονται οι κορυφές των αμινοξέων και της γλυκερόλης.³²

Η πλήρης ανάθεση των κορυφών του φάσματος 1D ^1H NMR του οίνου λόγω της πολυπλοκότητάς του απαιτεί τη χρήση της δισδιάστατης Φασματοσκοπίας NMR (2D NMR) ομοπυρηνικής και ετεροπυρηνικής συσχέτισης. Στην εικόνα 1.6 παρουσιάζεται το δισδιάστατο φάσμα ^1H - ^1H TOCSY (Total Correlation Spectroscopy) NMR ενός δείγματος οίνου της ποικιλίας Cabernet Sauvignon και η ανάθεση των κύριων κορυφών του φάσματος. Με την βοήθεια των φασμάτων ετεροπυρηνικής συσχέτισης ^1H - ^{13}C HSQC και HMBC 2D NMR είναι δυνατή η πλήρης ανάθεση των κορυφών ενός δείγματος οίνου. Στην εικόνα 1.7 παρουσιάζονται τα φάσματα ^1H - ^{13}C HSQC και HMBC 2D NMR ενός δείγματος οίνου μετά την λιοφιλοποίηση του και οι ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν.⁸

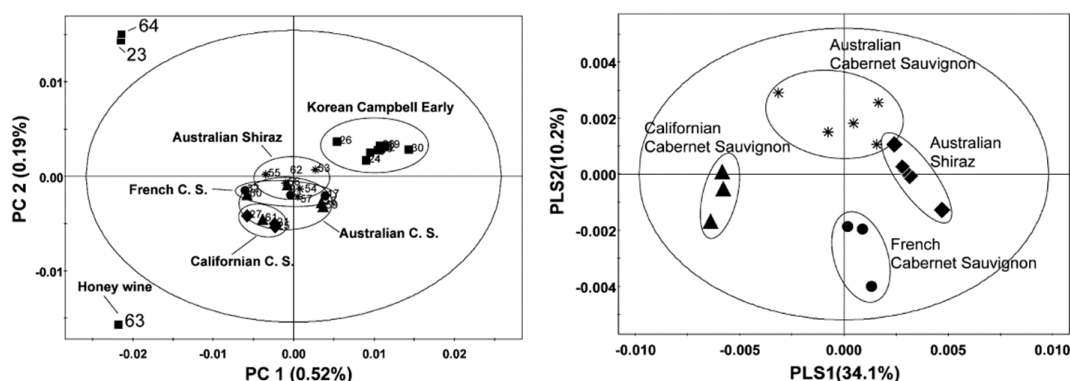


Εικόνα 1.6. Αλειφατική περιοχή του φάσματος ^1H - ^1H TOCSY NMR δείγματος οίνου της ποικιλίας Cabernet Sauvignon, και η ανάθεση των κύριων κορυφών του φάσματος.⁸



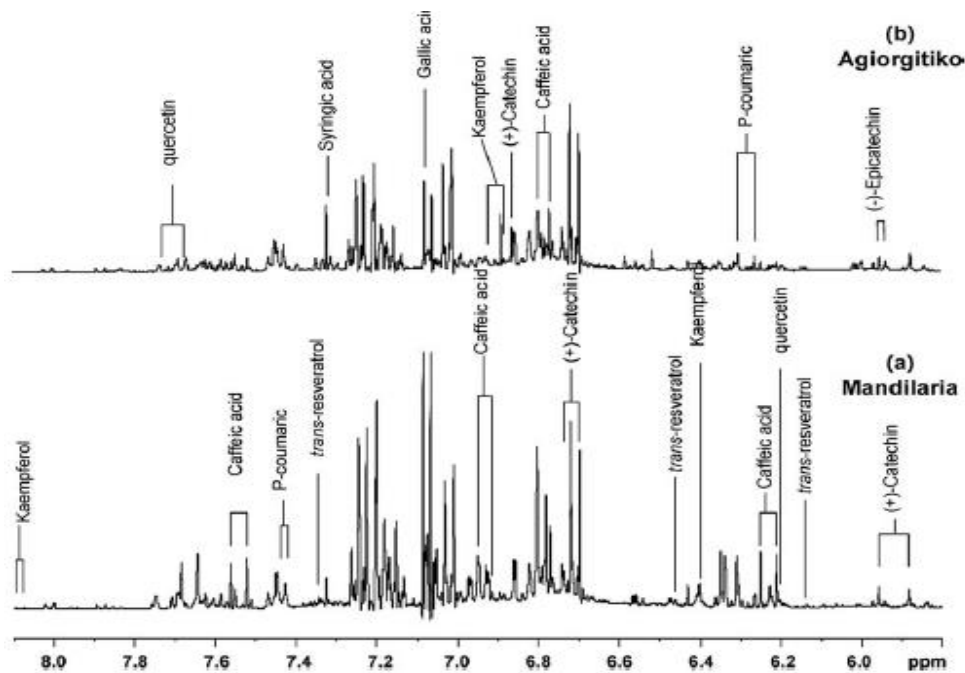
Εικόνα 1.7. Αλειφατική περιοχή του φάσματος ^1H - ^{13}C HSQC (πάνω) και HMBC (κάτω) 2D NMR ενός δείγματος οίνου και η ανάθεση των κορυφών των φασμάτων.⁸

Η μεταβολομική ανάλυση σε συνδυασμό με τη Φασματοσκοπία NMR έχει χρησιμοποιηθεί για τη διαφοροποίηση και ταξινόμηση δειγμάτων οίνου. Για την εξέταση δειγμάτων οίνου διαφορετικών ποικιλιών και γεωγραφικής προέλευσης χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) και η ανάλυση διακριτότητας μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA) (Εικόνα 1.8). Οι ποικιλίες που αναλύθηκαν ήταν οι εξής: Campbell Early, Cabernet Sauvignon και Syrah. Οι μεταβολίτες που συνεισφέρουν στην διαφοροποίηση των ποικιλιών ήταν η 2,3-βουτανοδιόλη, τα οργανικά οξέα τρυγικό, λακτικό, οξικό, ηλεκτρικό και μηλικό, η προλίνη, η γλυκερόλη, η γλυκόζη και οι φαινολικές ενώσεις. Επιπλέον παρατηρήθηκαν διαφοροποιήσεις σε δείγματα οίνου της ποικιλίας Cabernet Sauvignon που είχαν διαφορετική γεωγραφική προέλευση (Αυστραλία, Γαλλία, Καλιφόρνια).³⁴



Εικόνα 1.8. Διαγράμματα PCA και PLS-DA δειγμάτων οίνου, όπου παρουσιάζεται η διαφοροποίηση μεταξύ διαφορετικών ποικιλιών. Καλύτερη διαφοροποίηση υπάρχει στο διάγραμμα PLS-DA.³⁴

Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε το 2009, έγινε ανάλυση του φαινολικού εκχυλίσματος των οίνων από ελληνικές ποικιλίες με σκοπό την ταξινόμηση τους με βάση την ποικιλία, την γεωγραφική προέλευση και τον χρόνο του τρυγητού. Χρησιμοποιήθηκε η μεταβολομική Ανάλυση (PCA, PLS-DA) σε συνδυασμό με την Φασματοσκοπία NMR. Στην εικόνα 1.9 παρουσιάζεται η αρωματική περιοχή του φάσματος ^1H NMR δύο δειγμάτων οίνου ελληνικών ποικιλιών (Αγιωργήτικο, Μανδηλαριά) και οι φαινολικές ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν.³⁵



Εικόνα 1.9. Αρωματική περιοχή του φάσματος ^1H NMR δύο δειγμάτων οίνου ελληνικών ποικιλιών (Αγιωργίτικο, Μανδηλαριά) και οι φαινολικές ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν.³⁵

Όπως έχει δείχθει ήδη, με τη χρήση της φασματοσκοπίας NMR είναι δυνατό να ταυτοποιηθεί και να προσδιοριστεί ποσοτικά ένα μεγάλο μέρος των ενώσεων που περιέχονται στον οίνο (αμινοξέα, οργανικά οξέα, σάκχαρα, αλκοόλες, πολυφαινόλες), κι έτσι η φασματοσκοπία NMR αποτελεί μια πολύ σημαντική αναλυτική τεχνική για την ανάλυση του οίνου. Οι διάφορες εφαρμογές της φασματοσκοπίας NMR σε συνδυασμό με τη μεταβολομική ανάλυση για τη μελέτη ενός πλήθους παραγόντων που αφορούν τον ποιοτικό έλεγχο του οίνου, όπως η εξέταση της ποικιλίας, της γεωγραφικής προέλευσης, των διαδικασιών ζύμωσης και των εδαφοκλιματικών συνθηκών έχουν συνοψισθεί πρόσφατα από τον Song.³⁶

1.5 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΟΙΝΟΥ ΜΕ ΑΛΛΕΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Για την ανάλυση της σύστασης του οίνου έχουν χρησιμοποιηθεί και άλλες αναλυτικές τεχνικές, εκτός από την Φασματοσκοπία NMR. Σε μελέτη³⁷ που πραγματοποιήθηκε το 2002, έγινε προσδιορισμός των αμινοξέων που περιέχονται στον οίνο, με τη χρήση της Υγρής Χρωματογραφίας (HPLC). Συνολικά ανιχνεύθηκαν 21 αμινοξέα στα δείγματα οίνου που αναλύθηκαν. Τα αμινοξέα που βρέθηκαν σε

μεγαλύτερη αφθονία ήταν το γλουταμινικό οξύ, η αλανίνη, η αργινίνη, η αιθανολαμίνη, το γ-αμινοβουτυρικό οξύ και η λυσίνη.

Σε μία ακόμα μελέτη που πραγματοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των αμινοξέων σε δείγματα οίνου με τη χρήση της Υγρής Χρωματογραφίας (HPLC) αναφέρθηκαν ως μεγαλύτερες οι συγκεντρώσεις των αμινοξέων προλίνης και αργινίνης και μικρότερες οι συγκεντρώσεις της ισολευκίνης και της λευκίνης.³⁸ Η ποσότητα των αμινοξέων στον οίνο εξαρτάται από την ποικιλία αλλά και από την γεωγραφική προέλευση, οπότε μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν δείκτες για την προέλευση τους.

Σε μια άλλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε δείγματα λευκών οίνων χρησιμοποιήθηκε η Υγρή Χρωματογραφία (HPLC) και η Φασματοσκοπία Υπερύθρου (FT-IR). Προσδιορίστηκαν πέντε διαφορετικά σάκχαρα (φρουκτόζη, σουκρόζη, γλυκόζη, μαλτόζη, μαλτοτριόζη), εκ των οποίων σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ήταν η γλυκόζη και η φρουκτόζη. Η ύπαρξη του δεσμού C=C (1600cm^{-1}) στο φάσμα IR υποδηλώνει την ύπαρξη πολυφαινολών και οι δεσμοί O-H, C=O οφείλονται κυρίως στην παρουσία του οξικού οξέος.³⁹

Στην Ιταλία πραγματοποιήθηκε μία μελέτη που είχε σκοπό τον προσδιορισμό των πολυφαινολών ιταλικών ερυθρών οίνων διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης. Με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας (HPLC) ανιχνεύθηκαν οι φλαβονόλες: κερσετίνη, μυρισετίνη, απιγενίνη, καμφερόλη, οι ανθοκυάνες: μαλβιδίνη, πεονιδίνη, πετουνιδίνη, κυανιδίνη, δελφινιδίνη, τα φαινολικά οξέα: γαλλικό, καφεϊκό, καφταρικό, p-κουμαρικό και η trans-ρεσβερατρόλη. Αναφέρθηκε ότι οι διαφορές που παρουσιάστηκαν στις συγκεντρώσεις των πολυφαινολών δεν σχετίζονται με την γεωγραφική προέλευση των δειγμάτων, αλλά με την ηλικία του οίνου και τον αμπελώνα.⁴⁰

Ακόμη μία μελέτη με σκοπό τον προσδιορισμό των φαινολικών ενώσεων του οίνου πραγματοποιήθηκε σε δείγματα οίνου ελληνικών ποικιλιών με τη χρήση της Υγρής Χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης (RP-HPLC) και με ανιχνευτή υπεριώδους/ορατού (UV/Vis). Οι φαινολικές ενώσεις που ανιχνεύθηκαν σε μεγαλύτερη αφθονία ήταν η κατεχίνη, το γαλλικό οξύ και το καφεϊκό οξύ. Επιπλέον χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) προκειμένου να επιχειρηθεί διαφοροποίηση των οίνων με βάση την περιοχή παραγωγής τους. Αναφέρθηκε ότι οι ερυθροί οίνοι περιείχαν περισσότερες πολυφαινόλες συγκριτικά με τους λευκούς.⁴¹

Για τον προσδιορισμό των οργανικών οξέων, μονομερών πολυφαινολών και φουρανικών ενώσεων σε λευκούς, ερυθρούς και ροζέ οίνους έχει χρησιμοποιηθεί η Υγρή Χρωματογραφία με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (HPLC-DAD). Τα οργανικά οξέα, οι φλαβαν-3-όλες και τα βενζοϊκά οξέα ανιχνεύτηκαν στα 210 nm, το ελλαγικό οξύ στα 254 nm, τα φουράνια και το κινναμικό οξύ στα 280 nm, τα υδροξυκινναμικά και η trans-ρεσβερατρόλη στα 315 nm και τα φλαβονοειδή στα 360 nm.⁴²

Πολλές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί και σε οίνους που είναι αποθηκευμένοι σε διαφορετικούς περιέκτες προκειμένου να βρεθεί η φαινολική σύσταση τους. Μία τέτοια μελέτη πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (HPLC-DAD) και Υγρής Χρωματογραφίας-Φασματομετρίας Μάζας (LC-DAD/ESI/MS). Τα βαρέλια στα οποία είχε αποθηκευθεί ο οίνος που μελετήθηκε ήταν ακακίας, δρυός, κερασιάς και καστανιάς. Αναφέρθηκε ότι οι φαινολικές ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν στην συγκεκριμένη μελέτη μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να ταυτοποιήσουν το βαρέλι στο οποίο είχε αποθηκευθεί ο οίνος και το διάστημα αποθήκευσης, αλλά και την αυθεντικότητα του οίνου. Βρέθηκε ότι η συγκέντρωση του γαλλικού οξέος και του ελλαγικού οξέος ήταν αυξημένη στους οίνους που είχαν αποθηκευθεί σε βαρέλι καστανιάς, ενώ οι κυριότερες ενώσεις που βρέθηκαν στους οίνους που είχαν αποθηκευθεί σε βαρέλια ακακίας ήταν η διϋδρορομπινετίνη, η ρομπινετίνη, η 2,4-διϋδροξυβενζαλδεϋδη και το 2,4-διϋδροξυβενζοϊκό οξύ.⁴³

Ακόμη μία μελέτη του οίνου έχει πραγματοποιηθεί σε δείγματα οίνου που είχαν αποθηκευθεί σε δρύινα βαρέλια και σε δεξαμενές με τη χρήση της Αέριας Χρωματογραφίας-Φασματομετρίας Μάζας (GC-MS). Η μελέτη αυτή έδειξε ότι η συγκέντρωση των συνολικών αλκοολών του οίνου στα δρύινα βαρέλια ήταν κατά 42% υψηλότερη από τα δείγματα οίνου που είχαν αποθηκευθεί σε δεξαμενή, παρατήρηση που υποδηλώνει ότι ο τύπος του περιέκτη παίζει σημαντικό ρόλο στο γευστικό μπουκέτο του οίνου.⁴⁴

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι οίνοι που έχουν αποθηκευθεί σε βαρέλια ακακίας, και έχουν γίνει πολλές μελέτες για τον προσδιορισμό των πολυφαινολών τους. Σε μία μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε δείγματα οίνου που είχαν αποθηκευθεί σε βαρέλια ακακίας και δρυός χρησιμοποιήθηκε η τεχνική LC-DAD-ESI/MS. Τα

δείγματα οίνου που αναλύθηκαν ήταν της ποικιλίας Syrah και είχαν παραμείνει για έξι και δώδεκα μήνες στα βαρέλια. Στα βαρέλια δρυός ανιχνεύθηκαν συνολικά 43 φαινολικές ενώσεις και επιπλέον 15 φαινολικές ενώσεις βρέθηκαν μόνο στα δείγματα οίνου που είχαν αποθηκευθεί σε βαρέλια ακακίας. Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στα βαρέλια ακακίας βρέθηκε η ένωση διϋδρορομπινετίνη, ενώ επιπλέον ανιχνεύθηκαν οι ενώσεις: ρομπινετίνη, 2,4-διϋδροξυβενζαλδεϋδη, 2,4-διϋδροξυβενζοϊκό οξύ κ.α. Οι ενώσεις αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μοριακοί δείκτες αυθεντικότητας της ωρίμανσης του οίνου σε βαρέλια ακακίας.⁴⁵

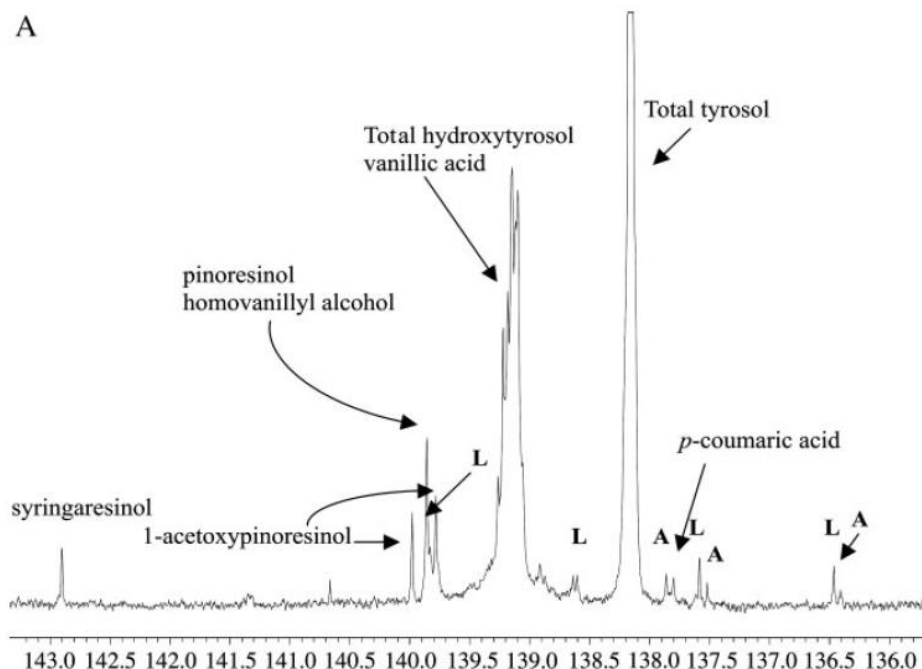
1.6 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ³¹P NMR

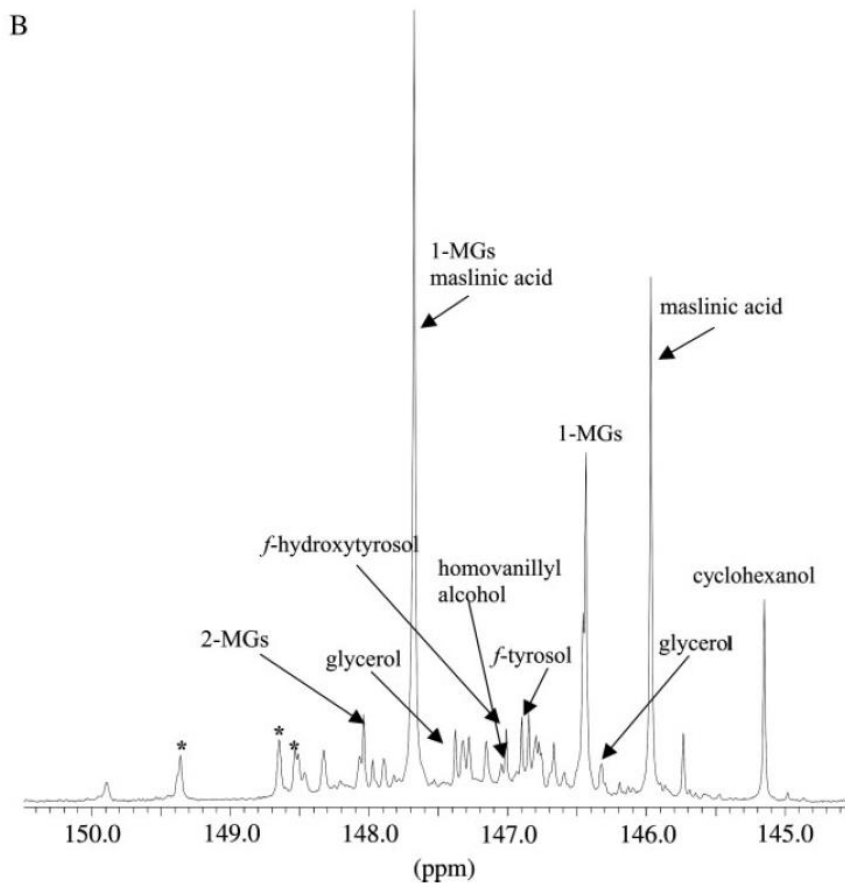
Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, στην παρούσα διατριβή έχει χρησιμοποιηθεί η Φασματοσκοπία NMR για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των συστατικών του οίνου. Εκτός από τα μονοδιάστατα φάσματα ¹H NMR και ¹³C NMR έχουν ληφθεί και δισδιάστα φάσματα COSY, TOCSY, HSQC, HMBC για την επιτυχή ανάλυση και ανάθεση των περίπλοκων φασμάτων NMR του οίνου. Στην παρούσα διατριβή επιπλέον αναπτύχθηκε και μια μεθοδολογία για την ανάλυση δειγμάτων οίνου με την φασματοσκοπία ³¹P NMR, η οποία παρουσιάζει ορισμένα πλεονεκτήματα σε σχέση με αυτήν του ¹H NMR. Ο πυρήνας του πρωτονίου έχει μεγάλη φυσική αφθονία (99.98%) και μεγαλύτερο γυρομαγνητικό λόγο ($26.75 \times 10^7 \text{ rad T}^{-1} \text{ s}^{-1}$), αλλά το μικρό εύρος των χημικών μετατοπίσεων παρέχει χαμηλή διακριτική ικανότητα με συχνή αλληλοεπικάλυψη των κορυφών. Επιπλέον η πολυπλοκότητα που εμφανίζουν τα φάσματα ¹H NMR, λόγω της σύζευξης σπιν-σπιν μεταξύ των πυρήνων, καθιστούν πολλές φορές δύσκολη την ταυτοποίηση των ενώσεων ενός μίγματος. Η φυσική αφθονία του φωσφόρου είναι 100% και ο γυρομαγνητικός του λόγος $10.84 \times 10^7 \text{ rad T}^{-1} \text{ s}^{-1}$, ενώ και το εύρος των χημικών μετατοπίσεων είναι περίπου 1000 ppm με αποτέλεσμα την μεγαλύτερη διασπορά των κορυφών και την απλότητα του φάσματος. Συνεπώς, ο πυρήνας φωσφόρου παρέχει φάσματα υψηλής ευαισθησίας και εξαιρετικής διακριτικής ικανότητας για την μελέτη πολύπλοκων συστημάτων, όπως είναι τα τρόφιμα.

Η Φασματοσκοπία ³¹P NMR έχει χρησιμοποιηθεί στην ανάλυση τροφίμων και συγκεκριμένα στην ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των συστατικών του πολικού μέρους του ελαιολάδου,⁴⁶ που περιέχει τις φαινολικές ενώσεις και τα αντιοξειδωτικά,

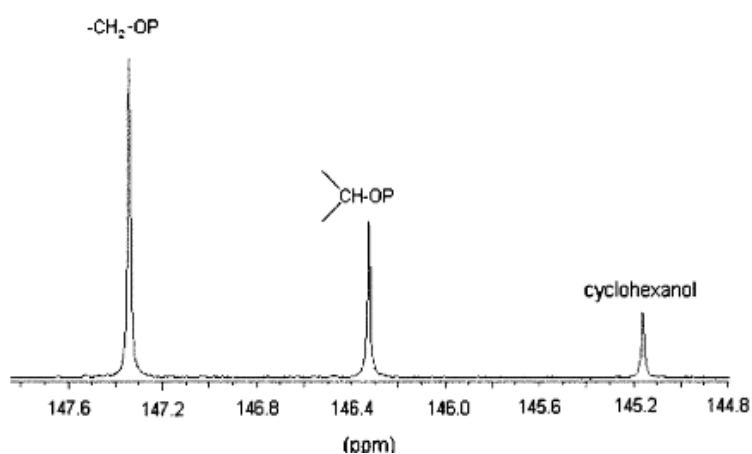
και του μη πολικού τμήματος του.^{47,48} Στην εικόνα 1.10 παρουσιάζεται το φάσμα ³¹P NMR του φωσφιτυλιωμένου πολικού μέρους του ελαιολάδου, το οποίο απομονώθηκε μετά από εκχύλιση με διαλύτη μεθανόλη/νερό. Επιπλέον η συγκεκριμένη μέθοδος ³¹P NMR έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της γλυκερόλης στο κρασί,⁴⁹ στο ελαιόλαδο,⁵⁰ αλλά και για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών ενώσεων και τριτερπενικών οξέων της ρίγανης, ενός προϊόντος με σημαντικές φαρμακολογικές ιδιότητες.⁵¹

Στην εικόνα 1.11 παρουσιάζεται το φάσμα ³¹P NMR ενός δείγματος ερυθρού οίνου, όπου παρουσιάζονται τα φωσφιτυλιωμένα υδροξύλια της γλυκερόλης. Οι κορυφές στα 147.35 ppm και 146.31 ppm αντιστοιχούν στις φωσφιτυλιωμένες πρωτοταγείς και δευτεροταγείς υδροξυλομάδες της γλυκερόλης, ενώ η κορυφή στα 145.13 ppm αντιστοιχεί στο εσωτερικό πρότυπο κυκλοεξανόλη. Στην παρούσα διατριβή αναπτύχθηκε ένα νέο πρωτόκολλο για την ανάλυση του οίνου με τη ³¹P NMR, το οποίο περιλαμβάνει την απομόνωση του φαινολικού κλάσματος του οίνου με εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE).





Εικόνα 1.10. Φάσμα ^{31}P NMR του φωσφιτυλιωμένου πολικού μέρους δείγματος ελαιολάδου. (A) αρωματική περιοχή, (B) αλειφατική περιοχή του φάσματος και παρουσιάζονται οι ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν.⁴⁶



Εικόνα 1.11. Φάσμα ^{31}P NMR ενός δείγματος ερυθρού οίνου, όπου παρουσιάζονται τα φωσφιτυλιωμένα υδροξύλια της γλυκερόλης. Η κορυφή στα 145.13 ppm αντιστοιχεί στο εσωτερικό πρότυπο κυκλοεξανόλη.⁴⁹

1.7 ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ ΟΙΝΟΥ (ΓΕΥΣΙΓΝΩΣΙΑ)

Η οργανοληπτική εξέταση του οίνου είναι η εκτίμηση της ποιότητας αυτού με τη βοήθεια της όσφρησης και της γεύσης. Για να είναι αποτελεσματική η οργανοληπτική εξέταση, ο δοκιμαστής οφείλει να διακρίνει τα διάφορα χαρακτηριστικά του οίνου και να τα εκφράζει με ακριβείς όρους. Αυτό προϋποθέτει βαθιά γνώση του αντικειμένου και μακρόχρονη εμπειρία.

Η ποιοτική και ποσοτική ανάλυση του οίνου από μόνη της, μερικές φορές, δεν είναι ικανή να διακρίνει ένα προϊόν υψηλής ποιότητας από ένα άλλο που είναι κοινής κατανάλωσης. Αυτή η αδυναμία συμπληρώνεται με την οργανοληπτική εξέταση. Οι αισθήσεις που χρησιμοποιούνται περισσότερο στην οργανοληπτική εξέταση του οίνου είναι η όραση, η όσφρηση και η γεύση.

Η όραση δίνει πληροφορίες για την διαύγεια, το χρώμα του οίνου, την ρευστότητα και τον τρόπο έκλυσης του διοξειδίου του άνθρακα (CO₂) στον οίνο. Επιπλέον διακρίνεται η ένταση και η απόχρωση του χρώματος του οίνου, παράγοντες που δίνουν πληροφορίες για την ηλικία ενός ερυθρού οίνου και το βαθμό οξείδωσης ενός λευκού.

Η όσφρηση δίνει πληροφορίες για το ποικιλιακό άρωμα (πρωτογενές), το άρωμα της ζύμωσης (δευτερογενές) και το μπουκέτο (bouquet) του οίνου (τριτογενές) που αναπτύσσεται κατά τη διάρκεια της παλαίωσης. Με την όσφρηση μπορεί να διακριθεί η ποιότητα και ο τρόπος οινοποίησης, καθώς και οι επεξεργασίες που έχουν γίνει για τη διατήρηση του οίνου. Η γεύση είναι ο σημαντικότερος παράγοντας στην οργανοληπτική εξέταση του οίνου. Στον οίνο περιέχονται τα συστατικά που είναι υπεύθυνα για τις γεύσεις του γλυκού, ξινού, αλμυρού και πικρού.⁵²

1.7.1 ΑΡΩΜΑΤΑ ΤΟΥ ΟΙΝΟΥ

Ο οίνος αποκτά τις μυρωδιές των δοχείων που είναι αποθηκευμένος. Είναι απαραίτητη η χρήση καινούριων βαρελιών, γιατί αυτά μετά από πολλές χρήσεις χάνουν σημαντικό μέρος από τα αρωματικά τους χαρακτηριστικά. Η ποικιλία των αρωμάτων του οίνου οφείλεται σε ενώσεις που προσδίδουν το άρωμα τους στους οίνους. Μερικές από αυτές είναι οι παρακάτω: μεθανόλη (μήλο), αιθανόλη (αλκοόλη και ορισμένες

ποικιλίες μήλου), εξανόλη (χλόη), αμυλική και ισοαμυλική αλκοόλη (διαλυτικό), 2-φαινυλο-αιθανόλη (τριαντάφυλλο, γιασεμί) και τυροσόλη (μέλι).

1.7.2 ΓΕΥΣΗ ΤΟΥ ΟΙΝΟΥ

Τα συστατικά που δίνουν γλυκιά γεύση στον οίνο είναι τα σάκχαρα (γλυκόζη, φρουκτόζη, αραβινόζη, ξυλόζη) και οι αλκοόλες της ζύμωσης (αιθυλική αλκοόλη, βουτανοδιόλη, γλυκερόλη, κ.α.).

Η ξινή γεύση του οίνου οφείλεται στα οξέα που περιέχονται σε αυτόν. Το τρυγικό οξύ έχει ξινή γεύση, όπως και το μηλικό οξύ, και δίνει την αίσθηση του άγουρου. Το λακτικό οξύ, που προέρχεται κυρίως από τις βακτηριακές προσβολές του οίνου και από την μηλογαλακτική ζύμωση του μηλικού οξέος, έχει μαλακότερη γεύση και βοηθάει την ανάπτυξη του μπουκέτου του οίνου. Το κιτρικό οξύ δίνει μία φρέσκια γεύση στον οίνο, ενώ το ηλεκτρικό οξύ έχει ξινή, αλμυρή και πικρή γεύση. Το οξικό οξύ σε μεγάλη ποσότητα υποβαθμίζει την ποιότητα του οίνου, διότι του προσδίδει την χαρακτηριστική μυρωδιά του ξυδιού.

Η αλμυρή γεύση γενικά δεν συμμετέχει στην αξιολόγηση του οίνου σε σημαντικό βαθμό. Οι ουσίες που έχουν αλμυρή γεύση είναι τα άλατα των οργανικών και ανόργανων οξέων με διάφορα κατιόντα, και κυρίως μέταλλα.

Τα συστατικά του οίνου που του προσδίδουν πικρή γεύση είναι φαινολικές και πολυφαινολικές ενώσεις, οι οποίες συμπεριλαμβάνουν τα φαινολικά οξέα και τις ταννίνες. Οι ανθοκυάνες προσφέρουν μόνο το χρώμα στους ερυθρούς οίνους και δεν συνεισφέρουν στην πικράδα. Οι ενώσεις που δίνουν στυφάδα στον οίνο είναι οι ταννίνες, οι οποίες βρίσκονται κυρίως στους ερυθρούς οίνους, ενώ οι λευκοί περιέχουν ελάχιστες ποσότητες. Επιπλέον οι οίνοι που είναι αποθηκευμένοι σε βαρέλια μπορούν να προσλαμβάνουν ταννίνες και από το ξύλο τους.²

ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη της διαδικασίας παλαίωσης του οίνου με τη χρήση της Φασματοσκοπίας NMR και της χημειομετρίας. Η φασματοσκοπία NMR χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό ενός μεγάλου αριθμού μη πτητικών μεταβολιτών του οίνου (οργανικά οξέα, αμινοξέα, αλειφατικές αλκοόλες, πολυφαινόλες, κ.ά.) του οίνου και τη χημειομετρική ανάλυση των μεταβολομικών φασματικών δεδομένων με τη βοήθεια πολυπαραμετρικών στατιστικών μοντέλων. Τα δείγματα οίνου που οινοποιήθηκαν και αναλύθηκαν στην παρούσα διατριβή προέρχονταν από γηγενείς ποικιλίες οινοστάφυλων της Κρήτης (Δαφνί, Βηλάννα-λευκά Κοτσιφάλι-Μαντηλάρι ερυθρά) και είχαν αποθηκευθεί σε περιέκτες διαφόρων τύπων (δεξαμενή ίπox, δεξαμενή με ρινίσματα δρυός), και σε βαρέλια (αμερικανική δρυς, γαλλική δρυς, καστανιά και ακακία). Οι αναλύσεις των οίνων με τη Φασματοσκοπία NMR πραγματοποιήθηκαν για δύο διαδοχικούς τρύγους (2012, 2013) και η διαδικασία της ωρίμανσης μελετήθηκε για χρονικό διάστημα παραμονής έως και 12 μήνες σε βαρέλι. Παράλληλα, αναλύθηκαν και δείγματα οίνων μετά την ωρίμανσή τους σε περιέκτες για διάστημα έως 12 μήνες και την παραμονή τους σε φιάλες για επιπλέον 12 μήνες. Η ανάλυση των δειγμάτων οίνου αποσκοπεί στην παρακολούθηση της ωρίμανσης καθώς και στον προσδιορισμό του βέλτιστου χρόνου ωρίμανσης των οίνων ανά τύπο βαρελιού και ποικιλία οινοστάφυλου.

Επιπλέον στόχος της συγκεκριμένης μελέτης ήταν η ανάπτυξη μίας νέας μεθόδου για τον προσδιορισμό των πολυφαινολών του οίνου με την χρήση της Φασματοσκοπίας ^{31}P NMR και ^1H NMR. Πραγματοποιήθηκε η εκχύλιση στερεάς φάσης στα δείγματα οίνου προκειμένου να γίνει ο διαχωρισμός του οίνου σε κλάσματα και να απομονωθεί το φαινολικό εκχύλισμα. Οι άλλες οργανικές ενώσεις που περιέχονται στον οίνο (μικρά οργανικά οξέα, σάκχαρα, αμινοξέα, γλυκερόλη) απομακρύνθηκαν. Η Φασματοσκοπία NMR σε συνδυασμό με τις χημειομετρικές τεχνικές χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των πολυφαινολών του οίνου, με σκοπό την σύγκριση των δύο μεθόδων ώστε να γίνει καλύτερη εξέταση των οίνων ανάλογα με τον τύπο του περιέκτη που έχουν αποθηκευθεί, την ποικιλία οινοστάφυλου και τον χρόνο ωρίμανση τους.

Τέλος, έγινε σύγκριση των αναλυτικών αποτελεσμάτων που λήφθηκαν μέσω της Φασματοσκοπίας NMR με τα γευσιγνωστικά δεδομένα και τις κλασσικές χημικές αναλύσεις του οίνου προκειμένου να γίνει συσχέτιση των δεδομένων. Η εφαρμογή της μεταβολομικής ανάλυσης και των πολυπαραμετρικών στατιστικών μοντέλων ανάλυσης, δίνουν τη δυνατότητα συσχέτισης και πρόβλεψης των βέλτιστων οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των οίνων με βάση τις πειραματικές μετρήσεις και τις μετρήσεις γευσιγνωσίας, που συντελούν στην αριστοποίηση της ποιότητας του παραγόμενου προϊόντος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΠΡΟΤΥΠΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

Ο δευτεριωμένοι διαλύτες NMR που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή ήταν ως εξής: για την ανάλυση των δειγμάτων οίνου δευτεριωμένο νερό (D₂O) περιεκτικότητας 99.9% σε δευτέριο, το οποίο περιέχει εσωτερικό πρότυπο 3-τριμεθυλο-σιλλυλο-προπιονικό-2,2,3,3-d₄ οξύ (TSP) περιεκτικότητας 0.05 wt % της εταιρείας ALDRICH. Για την ανάλυση του φαινολικού κλάσματος του οίνου χρησιμοποιήθηκε δευτεριωμένη μεθανόλη περιεκτικότητας 99.8% σε δευτέριο, η οποία περιείχε εσωτερικό πρότυπο τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS) περιεκτικότητας 0.03 ή 0.05 wt % και δευτεριωμένο χλωροφόρμιο περιεκτικότητας 99.8% σε δευτέριο. Οι παραπάνω δευτεριωμένοι διαλύτες προερχόταν από τις εταιρείες Merck, Deutero και Chembiotin. Για την προστασία του πρότυπου διαλύματος από την υγρασία χρησιμοποιήθηκαν Molecular Sieves διαμέτρου σφόν 0,5 nm και μεγέθους 2 mm, της εταιρείας Merck. Οι ενώσεις κυκλοεξανόλη (99%), η πυριδίνη και το τρις-(ακετυλοακετονικό) χρώμιο (97%) [Cr(acac)₃] αγοράστηκαν από την Aldrich. Οι κολώνες (SPE, OASIS HLB 6cc, 200 mg) που χρησιμοποιήθηκαν για την εκχύλιση στερεάς φάσης ήταν της εταιρείας Waters και το manifold που χρησιμοποιήθηκε αγοράστηκε από την Aldrich.

Οι πρότυπη ένωση γαλακτουρονικό οξύ προερχόταν από την εταιρεία Fluka, ενώ η ένωση κυτιδίνη από την Biochemica. Η ένωση 1,3-προπανοδιόλη αγοράστηκε από την εταιρεία TCI, ενώ οι ενώσεις φρουκτόζη, ουριδίνη, φουμαρικό οξύ, αδενίνη, 2-φαινυλο-αιθανόλη, p-κουμαρικό οξύ, βανιλλικό οξύ, κερκετίνη, ουρακίλη, p-υδροξυβενζοϊκό οξύ, καφεϊκό οξύ, γαλλικό οξύ και η τυροσόλη προερχόταν από την Aldrich, ενώ οι πρότυπες ενώσεις μαλβιδίνη, πεονιδίνη, κατεχίνη, δελφινιδίνη, επικατεχίνη, ρεσβερατρόλη και ρομπινετίνη από την Extrasynthese.

2.2 ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΟΙΝΟΥ

Τα δείγματα οίνου που μελετήθηκαν προερχόταν από τέσσερις γηγενείς κρητικές ποικιλίες, τις λευκές ποικιλίες Βηλάνα και Δαφνί, και τις ερυθρές Κοτσιφάλι και Μαντηλάρι. Η οινοποίηση πραγματοποιήθηκε στο τοπικό οινοποιείο Λυραράκης.

Ο τρυγητός για την πρώτη χρονιά πραγματοποιήθηκε:

- Για την ποικιλία Βηλάνα, στις 12 Σεπτεμβρίου 2012
- Για την ποικιλία Κοτσιφάλι, στις 16 Σεπτεμβρίου 2012
- Για την ποικιλία Μαντηλάρι, στις 20 Σεπτεμβρίου 2012
- Για την ποικιλία Δαφνί, στις 24 Σεπτεμβρίου 2012

Ο τρυγητός για την δεύτερη χρονιά πραγματοποιήθηκε:

- Για την ποικιλία Βηλάνα, στις 6 Σεπτεμβρίου 2013
- Για την ποικιλία Κοτσιφάλι, στις 12 Σεπτεμβρίου 2013
- Για την ποικιλία Μαντηλάρι, στις 6 Σεπτεμβρίου 2013
- Για την ποικιλία Δαφνί, στις 25 Σεπτεμβρίου 2013

Κατά την διάρκεια της ωρίμανσης οι οίνοι αποθηκεύθηκαν σε διάφορους περιέκτες: δεξαμενές, δεξαμενές με οινόstick, βαρέλια γαλλικής (Αμπελοοινική) και αμερικάνικης δρυός (ENOCHIMIKI S.A.), βαρέλια ακακίας (Tonnellerie du Sud Ouest, Γαλλία) και καστανιάς (Τέσιας, Μέτσοβο Ιωαννίνων). Στον Πίνακα 2.1 παρουσιάζονται οι περιέκτες και τα δείγματα οίνου που αντιστοιχούν σε κάθε περιέκτη.

Πίνακας 2.1. Δείγματα οίνου και τύπος περιέκτη.

Δείγματα οίνου	Τύπος περιέκτη
Βηλάνα, Δαφνί, Κοτσιφάλι, Μαντηλάρι 1	Μάρτυρας (Inox)
Βηλάνα, Δαφνί, Κοτσιφάλι, Μαντηλάρι 2	οινόstick γαλλικής δρυός τύπου V14 (Inox)
Βηλάνα, Δαφνί, Κοτσιφάλι, Μαντηλάρι 3	Seguin Moreau M+ TH, U stave (B204)
Βηλάνα, Δαφνί, Κοτσιφάλι, Μαντηλάρι 4	Acacia M (B195)
Βηλάνα, Δαφνί, Κοτσιφάλι, Μαντηλάρι 5	Quintessense chain Frances M (B193)
Κοτσιφάλι, Μαντηλάρι 6	Καστανιά (B 203)

Τα δείγματα οίνου θεωρήθηκε ότι συλλέχθηκαν σε σχετικό χρόνο μηδέν (ακριβώς πριν την τοποθέτησή τους σε περιέκτες) και αναλύθηκαν με την φασματοσκοπία NMR ανά τρεις (3) μήνες κατά την παραμονή τους στους περιέκτες (t=0, 3, 6, 9, 12 μήνες).

Τα γενικά χαρακτηριστικά των ποικιλιών από τις οποίες προέρχονται τα δείγματα οίνου δίνονται συνοπτικά ακολούθως:

Βηλάνα

Προέλευση – διάδοση. Η Βηλάνα (ή Βιλάνα, από το ιταλικό villano) είναι η πιο σημαντική λευκή οινοποιήσιμη ποικιλία της Κρήτης. Καλλιεργείται τουλάχιστον από την εποχή της ενετοκρατίας, κυρίως στο Ν. Ηρακλείου (σήμερα, περίπου 5.000 στρέμματα), δευτερευόντως στο Ν. Λασιθίου και σποραδικά στους άλλους νομούς της Κρήτης, καταλαμβάνοντας συνολικά περίπου 5.600 στρέμματα.⁵³

Παραγόμενα προϊόντα. Η Βηλάνα, όταν καλλιεργείται σωστά, σε λοφώδεις ή επικλινείς περιοχές με δροσερό κλίμα και χαμηλές στρεμματικές αποδόσεις μπορεί να δώσει πολύ ποιοτικά σταφύλια. Έτσι, σε πλαγιές με καλή στράγγιση και αρκετό υψόμετρο, το άρωμα είναι έντονο, σύνθετο και φίνο (κυριαρχούν οι νότες εσπεριδοειδών, κυρίως λεμονιού και λευκών ανθέων), ενώ σε πιο χαμηλά υψόμετρα και σε ασβεστούχα εδάφη τα αρώματα είναι πιο γλυκά (κυριαρχούν νότες ροδάκινου). Απαιτεί όμως μεγάλη προσοχή κατά την οινοποίηση προκειμένου να μην οξειδωθεί και να διατηρήσει το χρώμα αλλά και τα αρωματικά χαρακτηριστικά της. Έχει μέτριο έως υψηλό αλκοολικό τίτλο και καλή οξύτητα που δίνει ευχάριστο νεύρο στο κρασί της. Κατά συνέπεια είναι καλή ποικιλία βάσης για συνινοποίηση κυρίως με πιο αρωματικές ποικιλίες. Αντίθετα, η αύξηση των στρεμματικών αποδόσεων, που σε κάποιες περιπτώσεις ξεπερνά τους τρεις τόνους, έχει ως συνέπεια την παραγωγή οίνων με κίτρινα χρώματα χωρίς ιδιαίτερο άρωμα, με κύριο μειονέκτημα τις υψηλές οξύτητες, την έλλειψη σώματος και την έντονη τάση οξείδωσης. Στο Ν. Ηρακλείου δίνει ποικιλιακό λευκό ξηρό οίνο Π.Ο.Π. (Ο.Π.Α.Π.) «Πεζά» και στο Ν. Λασιθίου, σε συνινοποίηση με το Θραψαθήρι οίνο της ίδιας κατηγορίας με ονομασία προέλευσης «Σητεία». Επίσης συμμετέχει στους οίνους Π.Γ.Ε. (Τοπικούς) Κρητικός, Ηρακλειώτικος, Λασιθιώτικος, Κισσάμου, καθώς και σε άλλους Επιτραπέζιους οίνους.

Δαφνί (συν. Δαφνιά)

Προέλευση – διάδοση Καλλιεργείται σποραδικά στο νομό Ηράκλειου (περίπου 90 στρ.), αν και τα τελευταία χρόνια σημειώνεται μια τάση αύξησης των εκτάσεων.

Παραγόμενα προϊόντα. Παράγει λευκά ξηρά κρασιά, μέτριου αλκοολικού βαθμού και οξύτητας, με άρωμα που θυμίζει αυτό της δάφνης. Γενικά, είναι ενδιαφέρουσα γηγενής ποικιλία, της οποίας το οινικό της δυναμικό δεν έχει μελετηθεί επαρκώς.

Κοτσιφάλι

Προέλευση – διάδοση. Το Κοτσιφάλι είναι μια εκλεκτή ερυθρή ποικιλία οινοποιίας που καλλιεργείται στην Κρήτη, και κυρίως στον νομό Ηρακλείου όπου καταλαμβάνει γύρω στα 11.500 στρέμματα, και σποραδικά μόνο στις Κυκλάδες. Συνολικά, καλλιεργείται σε περίπου 12.400 στρέμματα.

Παραγόμενα προϊόντα. Το Κοτσιφάλι παρουσιάζει εξαιρετικό οινολογικό ενδιαφέρον, αφού ως πολυδυναμική ποικιλία μπορεί να παράγει οίνους με διαφορετικά τυπικά και ενδιαφέροντα αρώματα και γεύση (λευκά, ροζέ ή ερυθρά, ξηρά ή γλυκά, φρέσκα ή παλαίωσης). Δεν έχει όμως μεγάλο χρωματικό δυναμικό (ανθοκυάνες 600-640mg/Kg ραγών), γι' αυτό και παραδοσιακά συνιστάται η συνοινοποίησή του με τη Μανδηλαριά, η οποία χαρακτηρίζεται από πλούσιο και βαθύ ερυθρό χρώμα. Οι παραγόμενοι από την συνοινοποίηση ξηροί οίνοι, που χαρακτηρίζονται από την ευχάριστη γεύση και άρωμα του Κοτσιφαλιού και το ρουμπινί χρώμα της Μανδηλαριάς, δικαιούνται τις Π.Ο.Π. (Ο.Π.Α.Π.) «**Αρχάνες**» και «**Πεζά**». Οι τελευταίοι, μετά από παλαίωση αποκτούν ευωδιά ανάλογη εκείνης των οίνων Bordeaux (ιδιαίτερο «μπουκέτο» αρωμάτων, με νότες ώριμων φρούτων, μπαχαρικών και με ευχάριστη γεύση και ρουμπινί χρώμα).

Μανδηλαριά (συν. Μαντηλαριά, Μαντηλάρι, Κοντούρα μαύρη, Δουμπραίνα μαύρη, Παργιανό, Αμοργιανό, Κούντουρο, Κουντούρα)

Προέλευση – διάδοση. Αιγαιοπελαγίτικη ποικιλία, από τις πιο γνωστές και πλούσιες σε χρώμα ερυθρές ελληνικές ποικιλίες. Καλλιεργείται στην Κρήτη, κυρίως στο νομό Ηρακλείου (περίπου 3.000 στρέμματα), Σαντορίνη, Πάρο (περίπου 2.000 στρέμματα σε περιοχές με μέσο υψόμετρο 200m), Ρόδο, Ικαρία, Χίο και άλλα νησιά του Αιγαίου, για να επεκταθεί στη συνέχεια σε άλλες περιοχές της ηπειρωτικής χώρας (Αττική, Βοιωτία, Εύβοια, Θεσσαλία και Μακεδονία). Σήμερα έχει φτάσει να καλύπτει περίπου 10.700 στρέμματα, συνολικά.⁵³

Παραγόμενα προϊόντα. Η Μανδηλαριά δίνει γλεύκος με σχετικά μικρή περιεκτικότητα σε σάκχαρα, μέτρια οξύτητα, πλούσιο όμως σε χρώμα (γι αυτό και

χρησιμοποιείται ως «βαφική» ποικιλία) και τανίνες (όχι τόσο καλής ποιότητας, με πολύ στυφάδα η οποία δεν χάνεται εντελώς ακόμη και μετά από παλαίωση του παραγόμενου οίνου). Πρόκειται για μια από τις τέσσερις πιο πλούσιες σε ανθοκυάνες καλλιεργούμενες γηγενείς ποικιλίες (Αγιωργίτικο, Βερτζαμί, Μαντηλαριά, Μαυροδάφνη),⁵⁴ γι' αυτό και συνήθως χρησιμοποιείται μαζί με άλλες ποικιλίες, για τη διόρθωση του χρώματός τους. Είναι ένα κρασί ξηρό το οποίο οφείλει την ονομασία του στο πλούσιο, βαθύ κόκκινο του χρώματός του και στην έντονη στυφάδα του.

2.3 ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗ

Η διαδικασία της οινοποίησης πραγματοποιήθηκε στην Οινοποιεία Αλαγνίου, στο οινοποιείο Λυραράκης. Η οινοποίηση ήταν διαφορετική για τους λευκούς και ερυθρούς οίνους.

2.3.1 ΛΕΥΚΗ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗ

ΣΥΝΘΛΙΨΗ - ΑΛΕΞΗ

Τα σταφύλια οδηγήθηκαν μέσω κοχλίας στο θλιπτήριο ή στο θλιπτήριο-αποραγιστήριο για την θραύση του φλοιού της ρώγας και μερική απελευθέρωση του χυμού. Μέσω αντλίας ΜΟΗΝΟ ο σταφυλοπολτός μεταφέρθηκε στο πιεστήριο. Κατά τη διάρκεια της μεταφοράς αυτής, γινόταν θείωση στον σταφυλοπολτό με ρυθμιζόμενη δοσομετρική αντλία έτσι ώστε να η συγκέντρωση του ολικού θειώδους να είναι από 50 έως 100mg/L.

ΣΥΜΠΙΕΣΗ – ΠΝΕΥΜΑΤΙΚΑ ΠΙΕΣΤΗΡΙΑ

Η παραλαβή του γλεύκους πραγματοποιήθηκε σε πνευματικά πιεστήρια στα οποία ο σταφυλοπολτός συμπιέστηκε στον επιθυμητό βαθμό ανάλογα με τα χαρακτηριστικά των σταφυλιών και το επιδιωκόμενο αποτέλεσμα. Αρχικά, κατά το στάδιο της στράγγισης της σταφυλομάζας παραλήφθηκε από το κάτω και πλάγιο μέρος του κάδου του πιεστηρίου περίπου το 40-50% του χυμού. Ο χυμός αυτός μαζί με την πρώτη πίεση (20-30% του χυμού) αποτελεί τον λεγόμενο πρόρωγο, ο οποίος μεταφέρθηκε προς στατική απολάσπωση και εν συνεχεία ζυμώθηκε χωριστά. Η δεύτερη και η τρίτη πίεση (15-20%) οδηγήθηκαν προς στατική απολάσπωση και

ζυμώθηκαν και αυτές χωριστά, ενώ οι επόμενες δύο πιέσεις (5%) μεταφέρθηκαν σε δεξαμενή μαζί με τις οινολάσπες, και συνεπώς δεν χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή οίνου. Τα εναπομείναντα στέμφυλα οδηγήθηκαν με τους κοχλιομεταφορείς εκτός του χώρου του οινοποιείου. Το γλεύκος οδηγήθηκε σε μικρής χωρητικότητας ανοξείδωτα δοχεία ανοιχτού τύπου, έτσι ώστε να είναι εφικτή η εκτίμηση των διαφορετικών κλασμάτων γλεύκους που προκύπτουν από την πίεση της σταφυλομάζας (πρόρωγος, υπόλοιπες πιέσεις).

ΣΤΑΤΙΚΗ ΑΠΟΛΑΣΠΩΣΗ

Η επεξεργασία αυτή αποσκοπεί στην απομάκρυνση των στερεών τμημάτων των σταφυλιών, της σκόνης, του χόματος αλλά και στη διάσπαση των πηκτινών και άλλων κολλοειδών του γλεύκους. Αμέσως μετά την έξοδο του γλεύκους από το πιεστήριο πραγματοποιήθηκε η μεταφορά του σε μονωμένες δεξαμενές με δυνατότητα ψύξης και απομάκρυνσης της υποστάθμης. Ακολούθησε προσθήκη πηκτινολυτικών ενζύμων και εφαρμόστηκε ψύξη στους 12-15⁰C για 12-18 ώρες. Η θερμοκρασία ελέγχθηκε τουλάχιστον δύο φορές κατά τη διάρκεια του προβλεπόμενου χρόνου παραμονής μέσω των ωρολογιακών θερμομέτρων των δεξαμενών και ταυτόχρονα με τη χρήση του θερμομέτρου με λήψη δείγματος. Μετά τη διαύγαση του γλεύκους μεταφέρθηκε το υπερκείμενο στις δεξαμενές ζύμωσης και η υποστάθμη σε δεξαμενή όπου ήταν συγκεντρωμένες οι οινολάσπες.

ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ

Το γλεύκος μεταφέρθηκε στις δεξαμενές ζύμωσης και όταν η θερμοκρασία έφτασε στους 15 με 25 ⁰C προστέθηκε το εμβόλιο των ζυμομυκήτων και οι απαραίτητοι παράγοντες ανάπτυξης και θρέψης αυτών. Τη δεύτερη μέρα της ζύμωσης πραγματοποιήθηκε αερισμός για την παροχή οξυγόνου, απαραίτητου για την καλή ανάπτυξη των ζυμών. Η πορεία της ζύμωσης παρακολουθήθηκε με καθημερινή δειγματοληψία, όπου προσδιορίζονταν τα αναλυτικά στοιχεία του οίνου, και η θερμοκρασία ζύμωσης διατηρήθηκε εντός των επιθυμητών τιμών (16-29 ⁰C). Μετά το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης έγινε θείωση της δεξαμενής και στην συνέχεια μετάγγιση.

ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ – ΑΠΟΛΑΣΠΩΣΗ

Μετά το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης, πραγματοποιήθηκε μετάγγιση του οίνου σε άλλη δεξαμενή. Έγινε λήψη δειγμάτων για τον προσδιορισμό των αναλυτικών και οργανοληπτικών χαρακτηριστικών. Εκεί παρέμεινε ο οίνος να ωριμάσει και να διαυγάσει πάνω σε λεπτές οινολάσπες.

ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ - ΠΑΛΑΙΩΣΗ ΟΙΝΩΝ

Οι νέοι οίνοι αποθηκεύθηκαν στους περιέκτες (Πίνακας 2.1) και παρέμειναν εκεί για διάστημα ενός έτους, κατά τη διάρκεια του οποίου γινόταν δειγματοληψία όλων των περιεκτών κάθε τρεις μήνες, και ανάλυση των δειγμάτων με τη φασματοσκοπία NMR. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε για δύο συνεχόμενους τρύγους (2012 και 2013). Κατά τον δεύτερο τρύγο, πραγματοποιήθηκε εμφιάλωση των οίνων μετά από παραμονή σε περιέκτη για 3, 6, 9 και 12 μήνες, και οι φιάλες παρέμειναν σε αποθήκευση για 12 μήνες. Τα δείγματα φιαλών αυτά αναλύθηκαν επίσης, ώστε να εξεταστεί η επίδραση της 12 μηνιας εμφιάλωσης στα χαρακτηριστικά του οίνου.

2.3.2 ΕΡΥΘΡΗ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗ

ΣΥΝΘΛΙΨΗ - ΑΛΕΣΗ

Τα σταφύλια μεταφέρθηκαν μέσω του κοχλία της σταφυλοδόχου στο αποραγγιστήριο-θλιπτήριο και από εκεί μέσω της αντλίας ΜΟΗΝΟ, ο σταφυλοπολτός οδηγήθηκε στους οινοποιητές ερυθράς οινοποίησης. Όπως και στην λευκή οινοποίηση, η θείωση του σταφυλοπολτού κατά την μεταφορά του προς τους οινοποιητές, επιτεύχθηκε με την χρήση ρυθμιζόμενης αντλίας.

ΕΚΧΥΛΙΣΗ-ΖΥΜΩΣΗ

Μετά την πλήρωση του οινοποιητή πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός με επιλεγμένα στελέχη σακχαρομυκητών. Ακολούθησε προσθήκη θρεπτικών και αερισμός του γλεύκους. Η εκχύλιση των συστατικών του φλοιού της ράγας πραγματοποιήθηκε σε οινοποιητή ειδικού τύπου που διοχετεύει κατάλληλα το διοξείδιο του άνθρακα που παράγεται από τη ζύμωση, για την ανάμειξη των στερεών (στέμφυλα) με το υγρό (γλεύκος). Η ζύμωση και εκχύλιση έγιναν ταυτόχρονα έως ότου

το γλεύκος απέκτησε τα επιθυμητά χρωματικά χαρακτηριστικά, και έπειτα οδηγήθηκε στο πιεστήριο προς διαχωρισμό. Το γλεύκος εκροής μαζί με την πρώτη πίεση συνέχισαν τη ζύμωση σε διαφορετική δεξαμενή από ότι οι υπόλοιπες πιέσεις και η ανάμειξη τους πραγματοποιήθηκε μεταζυμωτικά. Η ζύμωση διήρκησε από 8-15 μέρες σε θερμοκρασία ανάμεσα στους 20-30 °C. Ο έλεγχος της θερμοκρασίας και της πορείας της αλκοολικής ζύμωσης ήταν παρόμοιος με αυτόν της λευκής οινοποίησης, με τη μόνη διαφορά ότι στην ερυθρά οινοποίηση η θερμοκρασία ζύμωσης διατηρείται στους 20-30 °C με ρύθμιση της ψύξεως του οινοποιητή (σύστημα ψύξεως με μανδύες). Επιπλέον πραγματοποιήθηκε έλεγχος εκχύλισης χρωστικών συστατικών φλοιού/γιγάρτων.

Οι υπόλοιπες διαδικασίες που ακολουθήθηκαν ήταν παρόμοιες με αυτές της λευκής οινοποίησης.

2.4 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ NMR

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για την προετοιμασία και επεξεργασία των δειγμάτων οίνου για την ανάλυσή τους με τη Φασματοσκοπία NMR ήταν η ακόλουθη:⁵⁵ Λήφθηκαν 2 ml δείγματος οίνου, τα οποία αποθηκεύθηκαν σε γυάλινο φιαλίδιο σε θερμοκρασία -18 °C για 12-24 ώρες, και το στερεό δείγμα λυοφιλοποιήθηκε (freeze-drying) σε λυοφιλοποιητή TELSTAR Cryodos, υπό πίεση 0.05-0.08 mbar και θερμοκρασία -50 °C. Το στερεό υπόλειμμα διαλύθηκε σε 400 μl D₂O και 400 μl ρυθμιστικού διαλύματος οξαλικού οξέος/ οξαλικού νατρίου (H₂C₂O₄/Na₂C₂O₄, pH=4) και το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στις 13000 στροφές σε μικροφυγόκεντρο Eppendorf Minispin Plus. Το υπερκείμενο διάλυμα μεταφέρθηκε σε γυάλινο σωληνάκι NMR διαμέτρου 5mm προκειμένου να γίνει η λήψη των φασμάτων NMR.

2.5 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΦΑΙΝΟΛΙΚΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΤΩΝ ΟΙΝΩΝ ΜΕ ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ

Για την εκχύλιση στερεάς φάσης ακολουθήθηκε η παρακάτω πειραματική διαδικασία:⁵⁶ 2 ml δείγματος οίνου μεταφέρθηκαν σε φιαλίδιο των 5 ml και προστέθηκε ίση ποσότητα HCl 0.01M. Στην συνέχεια, το διάλυμα πέρασε από μια στήλη εκχύλισης

στερεάς φάσης (SPE, OASIS HLB 3cc, 200 mg) αφού πρώτα είχε γίνει ενεργοποίηση της με 3 ml MeOH και 3 ml HCl 0.01M. Ακολούθως, η στήλη εκπλύθηκε με 4 ml HCl 0.01M. Το διάλυμα που διέρχεται από την στήλη σε αυτό το σημείο της εκχύλισης (υδατικό κλάσμα) περιέχει μικρά οργανικά οξέα, σάκχαρα, αμινοξέα κ.α. συλλέχθηκε σε σφαιρική φιάλη και απορρίφθηκε. Στη συνέχεια η στήλη τέθηκε υπό ροή αέρα μέσω μικροαντλίας για 30 λεπτά, ώστε να στεγνώσει και να απομακρυνθεί η υγρασία. Ακολούθως η στήλη εκλούσθηκε με 40 ml ακετονιτρίλιο:HCl 0.01M (95:5) και συλλέχθηκε ένα δεύτερο κλάσμα, το οποίο περιέχει τις φαινολικές ενώσεις του οίνου, σε σφαιρική φιάλη των 100 ml. Το δεύτερο κλάσμα συμπυκνώθηκε μέχρι ξηρού σε περιστροφικό εξατμιστήρα. Για την λήψη του φάσματος ^1H NMR του φαινολικού κλάσματος του δείγματος οίνου προστέθηκαν σε κάθε δείγμα απομονωθέντος στερεού υπολείμματος 700 μl δευτεριωμένης μεθανόλης που περιείχε 0.05% TMS (τετραμεθυλοσιλάνιο) ως εσωτερικό πρότυπο, και μεταφέρθηκε σε γυάλινο σωληνάκι NMR διαμέτρου 5mm.

2.6 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΙΝΟΥ ΜΕ ΤΗΝ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ^{31}P NMR

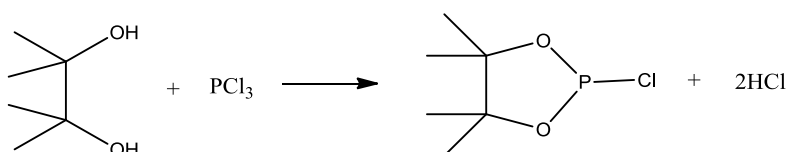
2.6.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ

Ζυγίστηκαν 33,8 mg κυκλοεξανόλης και 1,5 mg $\text{Cr}(\text{acac})_3$ και προστέθηκαν σε φιαλίδιο που περιείχε 16 mL ξηρή πυριδίνη και 10 mL CDI_3 (1.6:1 v/v). Το διάλυμα αποθηκεύθηκε σε γυάλινο φιαλίδιο που περιείχε μοριακά κόσκινα τύπου 5A για την προστασία του από την υγρασία.

2.6.2 ΣΥΝΘΕΣΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ ΦΩΣΦΟΡΟΥ

Το αντιδραστήριο του φωσφόρου (2-χλώρο-4,4,5,5-τετραμεθυλοδιοξαφωσφολάνιο) παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο που προτείνεται στη βιβλιογραφία.⁵⁷ Στην εικόνα 2.2 παρουσιάζεται η αντίδραση της πινακόλης με τον τριχλωριούχο σίδηρο. Το αντιδραστήριο είχε συντεθεί στο εργαστήριο από προηγούμενες μελέτες ως εξής: σε δίλιμνη σφαιρική των 500 mL με ψυκτήρα και προσθετική φιάλη των 100 mL προστέθηκαν 21, 5 ml τριχλωριούχου φωσφόρου (0.1 mol=8.7 mL) διαλυμένα σε 180 mL n-εξανίου. Σε κωνική φιάλη τοποθετήθηκαν 24 g

πινακόλης, τα οποία διαλύθηκαν σε 32 mL πυριδίνης και σε 150 mL εξανίου. Το διάλυμα της πινακόλης προστέθηκε στάγδην για μία ώρα υπό ανάδευση σε λουτρό πάγου, διότι η αντίδραση είναι εξώθερμη. Έπειτα το διάλυμα αφέθηκε για μία ώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για να αντιδράσει και στην συνέχεια διηθήθηκε με διηθητικό χαρτί. Το λευκό ίσημα που σχηματίστηκε εκπλύθηκε με 200 mL εξανίου. Το εξάνιο απομακρύνθηκε από το διάλυμα με απόσταξη στους 30⁰C και έπειτα έγινε απόσταξη του προϊόντος σε αντλία κενού.

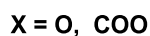
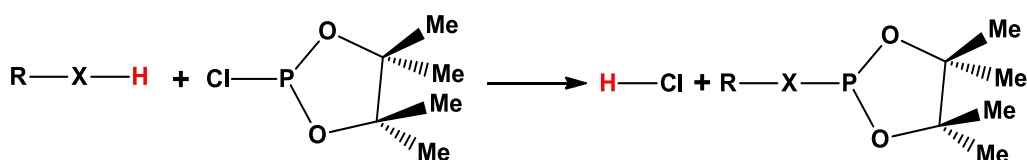


Εικόνα 2.1. Αντίδραση πινακόλης με τριχλωριούχο φώσφορο.

2.6.3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΙΝΟΥ ΜΕ ΤΗΝ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ³¹P NMR

Μετά την συλλογή του φαινολικού κλάσματος με την εκχύλιση στερεάς φάσης, και αφού πραγματοποιήθηκε η ανάλυση με τη Φασματοσκοπία ¹H NMR, εξατμίστηκε η MeOD μέχρι ξηρού στον περιστροφικό εξατμιστήρα και προστέθηκαν 600 μl διαλύτη (δευτεριωμένο χλωροφόρμιο CDCl₃:πυριδίνη 1.6:1) και 50 μl αντιδραστήριο 2-χλώρο-4,4,5,5-τετραμεθυλοδιοξαφωσφολάνιο. Το προκύπτον διάλυμα μεταφέρθηκε σε γυάλινο σωληνάκι NMR διαμέτρου 5mm για τη λήψη του φάσματος ³¹P NMR.

Με την συγκεκριμένη αντίδραση γίνεται αντικατάσταση των όξινων υδρογόνων χαρακτηριστικών ομάδων (υδροξύλια, καρβοξύλια) με το αντιδραστήριο φωσφόρου και χρησιμοποιείται η φασματοσκοπία ³¹P NMR για την ανίχνευση των φωσφιτυλιωμένων παραγώγων. Η αντίδραση που πραγματοποιείται παρουσιάζεται στην Εικόνα 2.2.



Εικόνα 2.2. Αντίδραση φωσφιτυλίωσης των όξινων υδρογόνων με το αντιδραστήριο 2-χλώρο-4,4,5,5-τετραμεθυλοδιοξαφωσφολάνιο.

2.7 ΦΑΣΜΑΤΑ NMR

Τα πειράματα φασματοσκοπίας 1H , ^{13}C και ^{31}P NMR που ελήφθησαν για τον προσδιορισμό των οργανικών ενώσεων του οίνου πραγματοποιήθηκαν σε φασματόμετρο Bruker AVANCE III λειτουργικής συχνότητας 500.1 MHz για τον πυρήνα του πρωτονίου, και σε θερμοκρασία 293.2 K, με τη χρήση των πρότυπων βιβλιοθηκών ακολουθιών παλμών που ήταν προεγκατεστημένες στο φασματόμετρο NMR.

2.7.1 ΜΟΝΟΔΙΑΣΤΑΤΑ ΦΑΣΜΑΤΑ 1H NMR

Τα μονοδιάστατα φάσματα 1H NMR ελήφθησαν με τη χρήση κατάλληλης ακολουθίας παλμών (WET) η οποία εξαλείφει το ισχυρό υπολειμματικό σήμα του νερού και της αιθανόλης των δειγμάτων οίνου.⁵⁸ Ελήφθησαν 64 K πραγματικά δεδομένα (data points), το φασματικό εύρος ήταν 20 ppm και ο χρόνος αναμονής (relaxation delay) μεταξύ δύο συνεχόμενων επαναλήψεων της ακολουθίας παλμών ήταν 4.27 sec. Ο χρόνος ανάκτησης (acquisition time) ήταν 3.27 sec. Πρίν την λήψη του φάσματος (256 σαρώσεις/scans) χρησιμοποιήθηκαν 8 ψευδοσαρώσεις (dummy scans) ώστε το σύστημα των σπιν να φτάσει σε δυναμική ισορροπία πριν την επανάληψη της ακολουθίας παλμών WET. Μετά τον μετασχηματισμό Fourier έγινε διόρθωση φάσης μηδενικής και πρώτης τάξης και έπειτα ακολούθησε διόρθωση της γραμμής βάσης του φάσματος με ένα πολώνυμο πέμπτης τάξης. Οι χημικές μετατοπίσεις των σημάτων 1H NMR αναφέρονται ως προς την κορυφή των πρωτονίων του εσωτερικού προτύπου TSP (δ 0.0) για τα δείγματα που είχαν αναλυθεί σε δευτεριωμένο νερό και TMS (δ 0.0) για τα δείγματα που είχαν αναλυθεί σε δευτεριωμένη μεθανόλη.

2.7.2 ΜΟΝΟΔΙΑΣΤΑΤΑ ΦΑΣΜΑΤΑ ^{31}P NMR

Για τη λήψη ποσοτικών φασμάτων ^{31}P NMR χρησιμοποιήθηκε η τεχνική inverse gated decoupling (αντίστροφη χρονισμένη αποσύζευξη), σύμφωνα με την οποία ο αποσυζευκτής πρωτονίων λειτουργεί μόνο κατά τη διάρκεια ανάκτησης (καταγραφής) του σήματος AQ, ενώ παραμένει κλειστός σε όλη την υπόλοιπη διάρκεια του πειράματος. Αυτό γίνεται για να αποκλειστεί η αλληλεπίδραση NOE μεταξύ του πυρήνα του φωσφόρου και των γειτονικών πρωτονίων των μορίων, διότι το φαινόμενο NOE προκαλεί μεταβολές στις εντάσεις των κορυφών, με αποτέλεσμα να μην είναι ποσοτικά τα αντίστοιχα φάσματα φωσφόρου NMR. Για την ελάττωση των χρόνων αποδιέγερσης σπιν πλέγμα T_1 των πυρήνων ^{31}P χρησιμοποιήθηκε το παραμαγνητικό αντιδραστήριο $\text{Cr}(\text{acac})_3$, ώστε ο μεγαλύτερος χρόνος αποδιέγερσης να μην υπερβαίνει τα 5s. Ο χρόνος αναμονής ήταν 17 sec (relaxation time), το φασματικό εύρος ήταν 20 ppm, ο χρόνος ανάκτησης 8.10 sec και ο αριθμός δεδομένων (data points) 64 K. Για κάθε φάσμα συλλέχθηκαν 64 επαναλήψεις (scans).

Μετά τον μετασχηματισμό Fourier έγινε διόρθωση φάσης μηδενικής και πρώτης τάξης και έπειτα ακολούθησε διόρθωση της γραμμής βάσης του φάσματος με ένα πολώνυμο πέμπτης τάξης. Οι χημικές μετατοπίσεις των σημάτων ^{31}P NMR αναφέρονται ως προς την κορυφή της κυκλοεξανόλης (δ 147.2), που χρησιμοποιήθηκε σαν εσωτερικό πρότυπο για την ποσοτικοποίηση των φασμάτων ^{31}P NMR.

2.7.3 ΔΙΣΔΙΑΣΤΑΤΑ ΦΑΣΜΑΤΑ NMR

Ομοπυρηνική φασματοσκοπία (^1H - ^1H gCOSY, Correlated Spectroscopy)

Για την λήψη των δισδιάστατων φασμάτων ομοπυρηνικής συσχέτισης (^1H - ^1H gCOSY) χρησιμοποιήθηκαν 2 K πραγματικά δεδομένα (data points) κατά τη διάρκεια ανίχνευσης (t_2) και 128 πραγματικά δεδομένα κατά τη διάρκεια εξέλιξης (t_1). Συλλέχθηκαν 128 πραγματικές FIDs και 16 ψευδοσαρώσεις (dummy scans), με χρόνο αναμονής (relaxation delay) 1.5 sec.

Ετεροπυρηνική φασματοσκοπία (^1H - ^{13}C -gHSQC, gHMBC)

Για το ετεροπυρηνικό φάσμα gHSQC χρησιμοποιήθηκαν 1 K πραγματικά δεδομένα (data points) κατά τη διάρκεια ανίχνευσης (t_2) και 128 πραγματικά δεδομένα

κατά τη διάρκεια εξέλιξης (t_1). Συλλέχθηκαν 128 πραγματικές FIDs και 32 ψευδοσάρωσεις (dummy scans) με χρόνο αναμονής (relaxation delay) 1.5 sec.

Για το ετεροπυρηνικό φάσμα gHMBC χρησιμοποιήθηκαν 2K πραγματικά δεδομένα (data points) κατά τη διάρκεια ανίχνευσης (t_2) και 160 πραγματικά δεδομένα κατά τη διάρκεια εξέλιξης (t_1). Συλλέχθηκαν 256 πραγματικές FIDs και 32 ψευδοσάρωσεις (dummy scans) με χρόνο αναμονής (relaxation delay) 1.5 sec.

Οι χημικές μετατοπίσεις των σημάτων ^1H NMR και ^{13}C NMR αναφέρονται ως προς την κορυφή των πρωτονίων της δευτεριωμένης μεθανόλης (δ 3.31, 49.15)

2.8 ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΤΟΥ ΟΙΝΟΥ

Ο προσδιορισμός των οργανικών ενώσεων και της χημικής σύστασης του οίνου πραγματοποιήθηκε με τη λήψη και την ανάλυση δισδιάστατων φασμάτων (2D) ομοπυρηνικής και ετεροπυρηνικής (^1H - ^{13}C) συσχέτισης (gCOSY, gHSQC, gHMBC) σε διάφορα δείγματα οίνου, με τη λήψη φασμάτων NMR πρότυπων ενώσεων των οποίων η παρουσία ήταν πιθανή στους οίνους, και τέλος με την σύγκριση των ληφθέντων φασμάτων NMR με διαθέσιμες βιβλιογραφικές πηγές και φασματοσκοπικές βάσεις δεδομένων.^{59,60}

Η ποσοτική ανάλυση των φασμάτων ^1H NMR πραγματοποιήθηκε με την ολοκλήρωση των κορυφών των φασμάτων που αντιστοιχούσαν σε γνωστές ενώσεις με το λογισμικό WIN-NMR, έχοντας λάβει υπ' όψιν τον αριθμό των πρωτονίων που συνεισφέρουν σε κάθε σήμα. Οι ποσοτικές ολοκληρώσεις των φασμάτων NMR έγιναν σε σχέση με το γνωστής έντασης ολοκλήρωμα της κορυφής του εσωτερικού προτύπου (TSP). Οι συγκεντρώσεις των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν εκφράστηκαν σε mg/L οίνου.

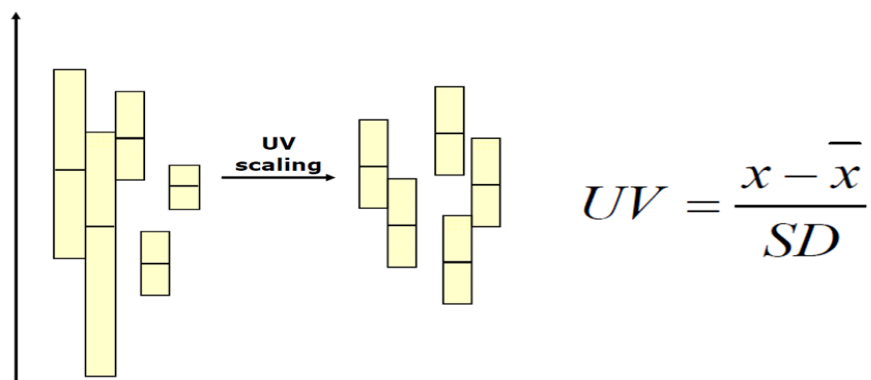
2.9 ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΙΝΟΥ

Για την μεταβολομική ανάλυση των δειγμάτων οίνου χρησιμοποιήθηκε το υπολογιστικό πρόγραμμα SIMCA 13.02 της εταιρείας Umetrics. Για την ανάλυση του μη πτητικού μέρους των οίνων με τη φασματοσκοπία ^1H NMR μεταφέρθηκαν με τη μορφή πίνακα και χρησιμοποιήθηκαν ως δεδομένα εισόδου στο SIMCA οι συγκεντρώσεις των ενώσεων που είχαν υπολογισθεί από την ποσοτικοποίηση των φασμάτων NMR για όλα τα δείγματα που αναλύθηκαν. Κάθε ποσοτικοποιημένος

μεταβολίτης του οίνου αντιστοιχούσε σε μία ανεξάρτητη μεταβλητή. Πριν την χημειομετρική ανάλυση των δεδομένων, όσες μεταβλητές παρουσίαζαν ασύμμετρη κατανομή ταυτοποιήθηκαν μέσω του προγράμματος Simca και κανονικοποιήθηκαν με λογαριθμικό μετασχηματισμό (log-transformation). Επιπλέον, έγινε προσαρμογή των μεταβλητών με την κλίμακα Unit Variance (UV-scaling), η οποία διαιρεί τις τιμές κάθε μεταβλητής με την τυπική της απόκλιση. Η μέθοδος UV-scaling χρησιμοποιείται για να προσαρμόζει μεταβολομικά δεδομένα έτσι ώστε η επίδραση κάθε μεταβλητής να συσχετίζεται με την στατιστική της σημαντικότητα και τα χημειομετρικά μοντέλα να μην επηρεάζονται ανισοβαρώς από μεταβλητές με μεγάλες αριθμητικές τιμές.

Για την μεταβολομική ανάλυση του φαινολικού προφίλ των οίνων χρησιμοποιήθηκαν τα φάσματα ^1H και ^{31}P NMR του πολυφαινολικού κλάσματος των οίνων. Τα φάσματα NMR μετατράπηκαν σε μορφή κατάλληλη για επεξεργασία με στατιστικές μεθόδους ανάλυσης με την εφαρμογή της τεχνικής «κάδου» (bucket analysis) με τη χρήση του ειδικού λογισμικού AMIX της εταιρίας Bruker. Τα φάσματα NMR χωρίστηκαν σε N υποπεριοχές (buckets) εύρους 0,05 ppm, και υπολογίστηκε το ολοκλήρωμα (S) που αντιστοιχεί σε κάθε υποπεριοχή, επιτρέποντας την πλήρη αναπαράστασή του φάσματος σε μορφή ραβδογράμματος N σημείων (υποπεριοχών, Buckets) εμβαδού S. Με αυτή τη μορφή, τα δεδομένα εισήχθησαν στο πρόγραμμα SIMCA 13.02 για την ανάλυσή τους με τη χρήση πολυπαραμετρικών στατιστικών μοντέλων ανάλυσης.

Για την προσαρμογή του μεταβολομικού σετ δεδομένων των πολυφαινολών του οίνου χρησιμοποιήθηκε η κλίμακα Pareto. Η κλίμακα Pareto χρησιμοποιείται κυρίως για φασματικά δεδομένα και παραμένει πιο κοντά στις αρχικές μετρήσεις συγκριτικά με το UV-scaling. Επιπλέον ελαχιστοποιεί την επίδραση του θορύβου των φασμάτων και χρησιμοποιεί την τετραγωνική ρίζα της τυπικής απόκλισης για την προσαρμογή των δεδομένων.⁶¹



Εικόνα 2.3. Δεδομένα πριν και μετά την εφαρμογή του UV-scaling.

2.10 ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΟΙΝΩΝ

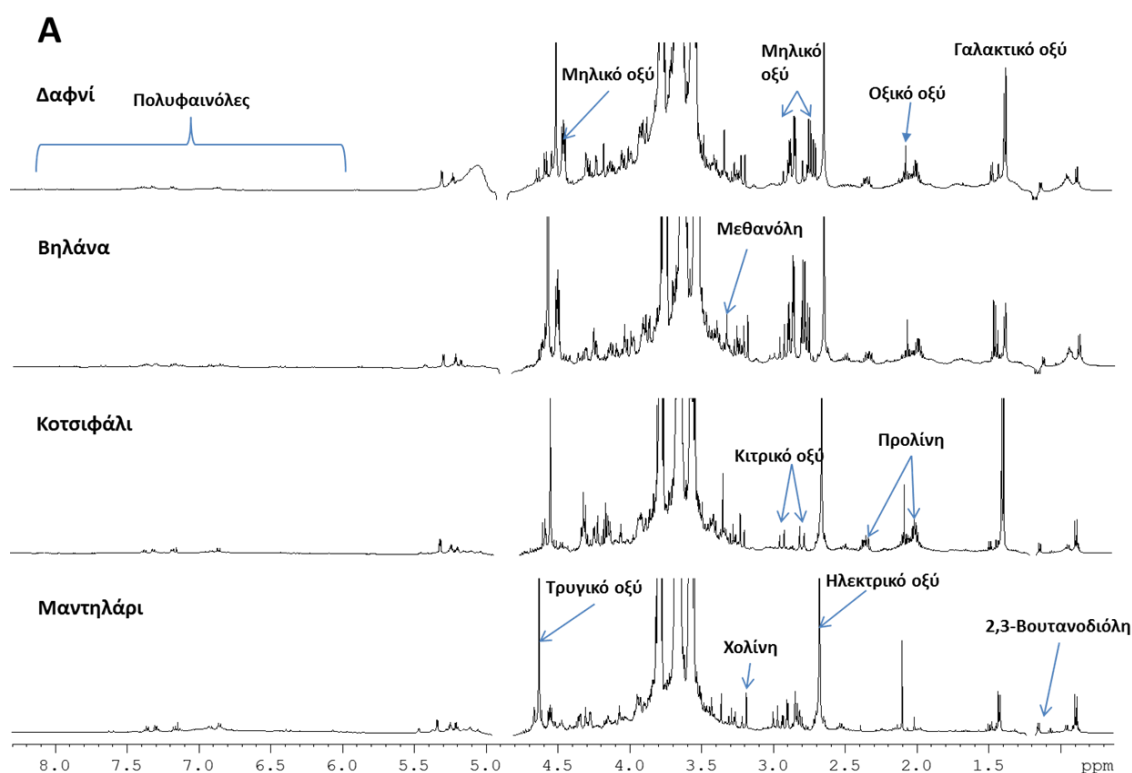
Οι γευστικές δοκιμές των οίνων πραγματοποιήθηκαν και για τις δύο χρονιές τρυγητού, μετά από 3, 6, 9 και 12 μήνες παραμονής στους περιέκτες. Η αξιολόγηση των οίνων έγινε από επαγγελματίες και ερασιτέχνες γευσσιγνώστες. Εκτός της επίσημης μεθόδου που έχει επιλεγεί για την οργανοληπτική εξέταση, οι οίνοι αξιολογήθηκαν από το πάνελ των επαγγελματιών ως προς το αρωματικό και το γευστικό τους προφίλ, το δυναμικό τους (βαθμολογία 1-10) και για την πιθανή ύπαρξη ελαττωμάτων (βαθμολογία 1-100).

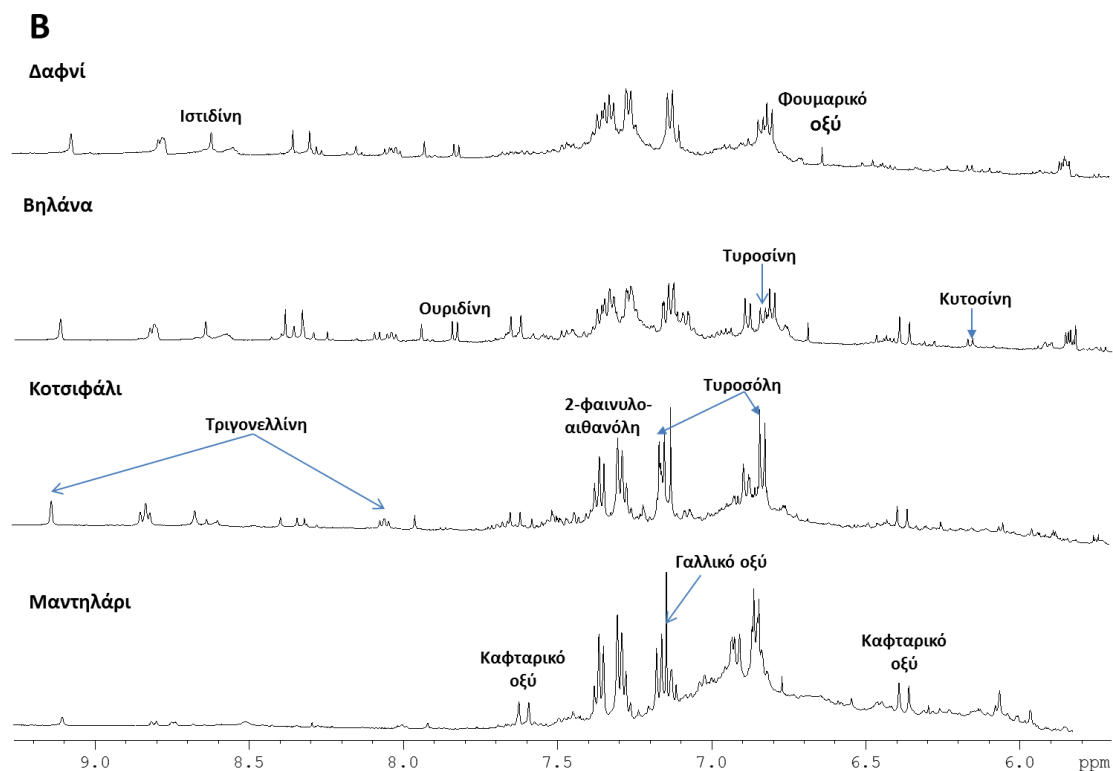
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 ΜΕΛΕΤΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΙΝΟΥ ΜΕ ΤΗΝ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ^1H NMR ΣΕ ΔΙΑΛΥΤΗ ΔΕΥΤΕΡΙΩΜΕΝΟ ΝΕΡΟ (D_2O)

3.1.1 ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΤΟΥ ΟΙΝΟΥ

Μετά την λυοφιλοποίηση των δειγμάτων οίνου και τη λήψη των φασμάτων NMR σε διαλύτη δευτεριωμένο νερό (D_2O) πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός των οργανικών ενώσεων του οίνου με την ανάθεση των κορυφών στα φάσματα ^1H NMR. Στην εικόνα 3.1 παρουσιάζονται τα φάσματα των δειγμάτων οίνου των τεσσάρων ποικιλιών (Μαντηλάρι, Κοτσιφάλι, Βηλάνα, Δαφνί) που αναλύθηκαν σε συμβατικό χρόνο μηδέν (πριν την τοποθέτησή τους σε περιέκτες) και οι κύριες ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν, μέσω του φάσματος ^1H NMR.





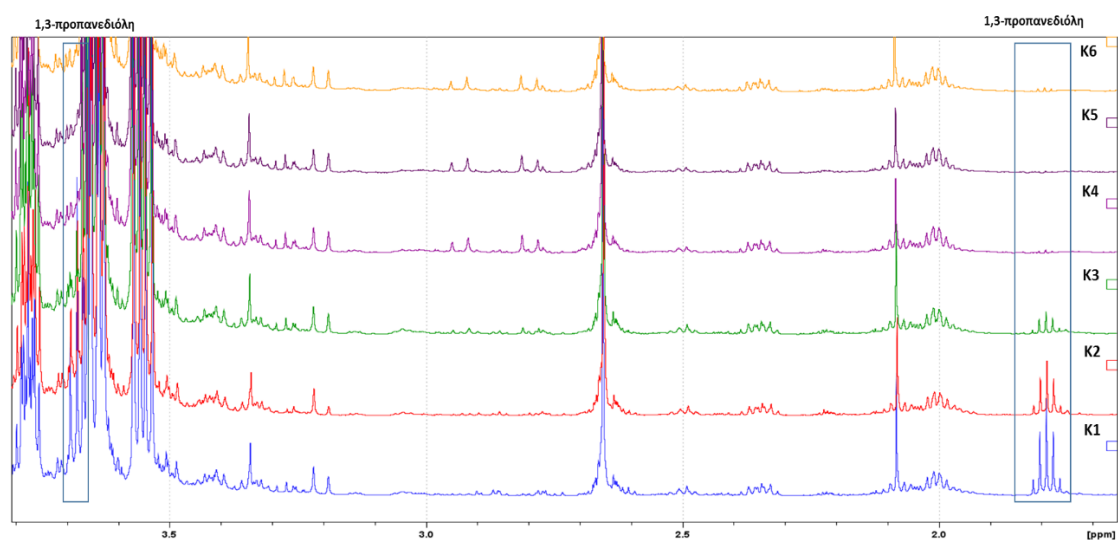
Εικόνα 3.1. Πλήρη φάσματα ^1H NMR (A) και αρωματική φασματική περιοχή (B) των οίνων από τις τέσσερις κρητικές ποικιλίες (Μαντηλάρι, Κοτσιφάλι-ερυθρά, Βηλάνα, Δαφνί-λευκά) πριν την αποθήκευσή τους στους περιέκτες. Επισημαίνονται οι κυριότερες ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν στους οίνους.

Ταυτοποιήθηκαν συνολικά πάνω από σαράντα διαφορετικές χημικές ενώσεις στους οίνους, κυρίως οργανικά οξέα, αμινοξέα, αλκοόλες, σάκχαρα, φαινολικές ενώσεις και πουρίνες/πυριμιδίνες. Στον πίνακα 3.1 παρουσιάζονται αναλυτικά οι χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις (ppm) στα φάσματα ^1H και του ^{13}C NMR όλων των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στους οίνους, ενώ στον πίνακα 3.2 παρουσιάζεται η χημική δομή των ενώσεων.

Τα φάσματα ^1H NMR που ελήφθησαν μετά την παραμονή των οίνων στους περιέκτες παρουσιάζουν αρκετές διαφοροποιήσεις, που οφείλονται κυρίως στην ωρίμανση των δειγμάτων και στον τύπο του περιέκτη, και θα αναλυθούν εκτενώς στο Κεφ. 3.1.3.

Σημαντικές διαφοροποιήσεις υπήρξαν στα φάσματα ^1H NMR που ελήφθησαν μετά την δωδεκάμηνη ωρίμανση του δείγματος Κοτσιφάλι στους διάφορους περιέκτες, μόνο στα δείγματα του Α' τρύγου. Στα φάσματα ^1H NMR εμφανίζεται η κορυφή της

ένωσης 1,3-προπανεδιόλη. Σε μεγαλύτερη ένταση εμφανίζεται η κορυφή της στα φάσματα που αντιστοιχούν στα δείγματα K1, K2, K3 (δεξαμενή, δεξαμενή με ρινίσματα δρυός, βαρέλι αμερικάνικης δρυός). Έχει αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες^{62,63} ότι η 1,3-προπανοδιόλη μπορεί να συντεθεί μέσω γαλακτικών βακτηρίων από την γλυκερόλη. Στην εικόνα 3.2 παρουσιάζονται τα φάσματα ¹H NMR της ποικιλίας Κοτσιφάλι μετά από 12 μήνες ωρίμανσης στους περιέκτες, όπου εμφανίζονται οι κορυφές της 1,3-προπανοδιόλης.




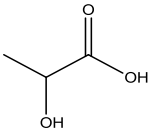
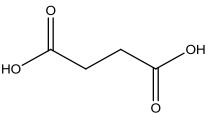
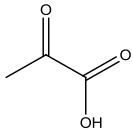
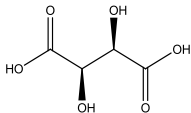
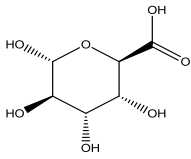
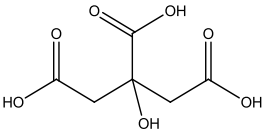
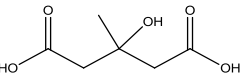
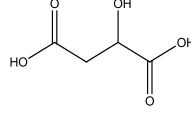
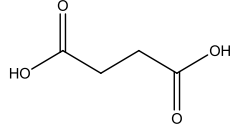
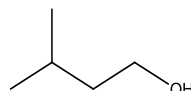
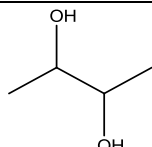
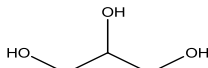
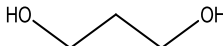
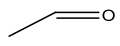
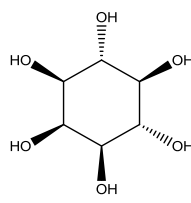
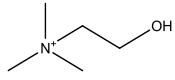
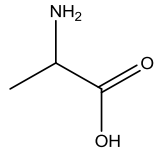
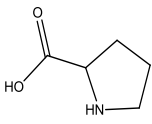
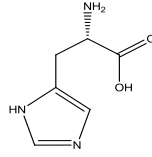
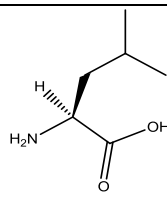
Εικόνα 3.2. Φάσματα ¹H NMR της ποικιλίας Κοτσιφάλι μετά από 12 μήνες ωρίμανσης στους περιέκτες και η ανάθεση των κορυφών της 1,3-προπανοδιόλης.

Πίνακας 3.1. Ενώσεις και χαρακτηριστικές χημικές μετατόψεις των ενώσεων που αναλύθηκαν με NMR.

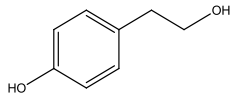
Ένωση	Χημική μετατόπιση (ppm)	
	¹ H	¹³ C
Ισοπεντανόλη	0.89	24.7
Λευκίνη	0.95	24.1
2,3 Βουτανεδιόλη	1.14	20.1
Αιθανόλη	1.19	19.8
Λακτικό οξύ	1.41	22.5
Αλανίνη	1.49	22.6
Προλίνη	2.01	26.7
	2.09	31.4
Οξικό οξύ	2.08	31.9
Πυροσταφυλικό οξύ	2.39	29.3

Κιτρικό οξύ	2.91, 2.77	46.5
Μηλικό οξύ	2.72	42.4
	2.86	41.8
	4.45	70.7
Ηλεκτρικό οξύ	2.65	32.2
Χολίνη	3.19	56.8
β-γλυκόζη	3.25	77.2
	4.65	98.8
Μεθανόλη	3.35	49.1
Γλυκερόλη	3.56	65.8
	3.66, 3.78	75.1
α-γλυκόζη	5.23	94.7
Ινοσιτόλη	4.06	74.9
Φρουκτόζη	4.02	74.9
Τριαλόζη	5.20	96.4
Γαλακτουρονικό οξύ	5.32	95.0
Σουκρόζη	5.45	94.5
trans-καφταρικό οξύ	6.41	131.9
	7.64	149.7
Τυροσίνη	6.88	118.7
Τυροσώλη	6.86	118.7
	7.18	133.2
Γαλλικό οξύ	7.15	112.8
2-Φαινυλο-αιθανόλη	7.31	131.9
Ουριδίνη	7.86	144.6
Ουρακίλη	5.79	103.7
Κυτιδίνη	6.20	97.8
Τριγονελλίνη	8.81	148.4
	9.11	149.3
Διϋδρορομπινετίνη	6.42	105.5
	6.66	114.1
	6.72	110.6
	7.76	132.1
Ρομπινετίνη	7.25	110.8
Ακεταλδεΐδη	9.66	199.0
Ιστιδίνη	8.66	137.0
Κιτρομηλικό οξύ	1.42	28.10
Φουμαρικό οξύ	6.73	137.6
1,3-προπανοδιόλη	1.79	36.5

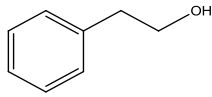
Πίνακας 3.2. Χημική δομή των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στα δείγματα οίνου με την Φασματοσκοπία NMR.

ΟΡΓΑΝΙΚΑ ΟΞΕΑ				
				
Οξικό οξύ	Λακτικό οξύ	Ηλεκτρικό οξύ	Πυροσταφυλικό οξύ	Τρυγικό οξύ
				
Γαλακτουρονικό οξύ	Κιτρικό οξύ	Κιτρομηλικό οξύ	Μηλικό οξύ	
				
	Φουμαρικό οξύ			
ΑΛΚΟΟΛΕΣ-ΑΛΛΕΥΔΕΣ				
				
Ισοπεντανόλη	2,3-Βουτανοδιόλη	Γλυκερόλη	1,3-Προπανεδιόλη	
				
Ακεταλδεϋδη	Ινοσιτόλη	Χολίνη		
ΑΜΙΝΟΞΕΑ				
				
Αλανίνη	Προλίνη	Ιστιδίνη	Λευκίνη	

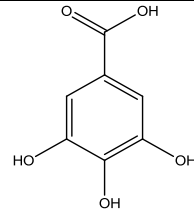
ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ



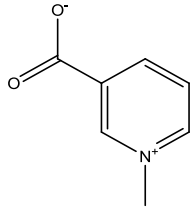
Τυροσόλη



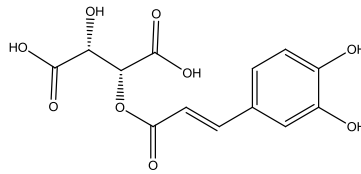
2-Φαινυλο-αιθανόλη



Γαλλικό οξύ

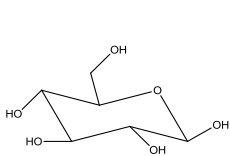


Τριγονελλίνη

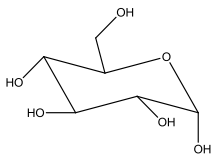


trans-Καφταρικό οξύ

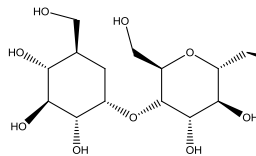
ΣΑΚΧΑΡΑ



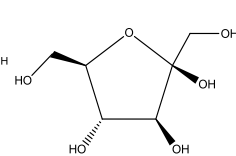
β-Γλυκόζη



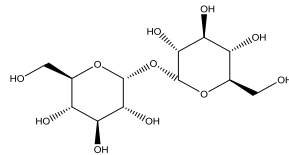
α-Γλυκόζη



Σουκρόζη

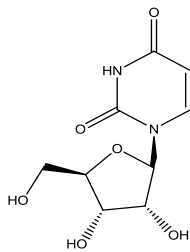


Φρουκτόζη

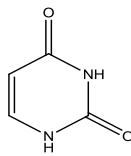


Τριαλόζη

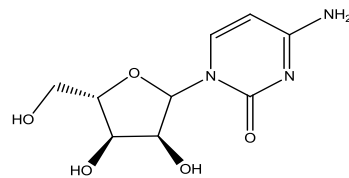
ΠΟΥΡΙΝΕΣ-ΠΥΡΙΜΙΔΙΝΕΣ



Ουριδίνη

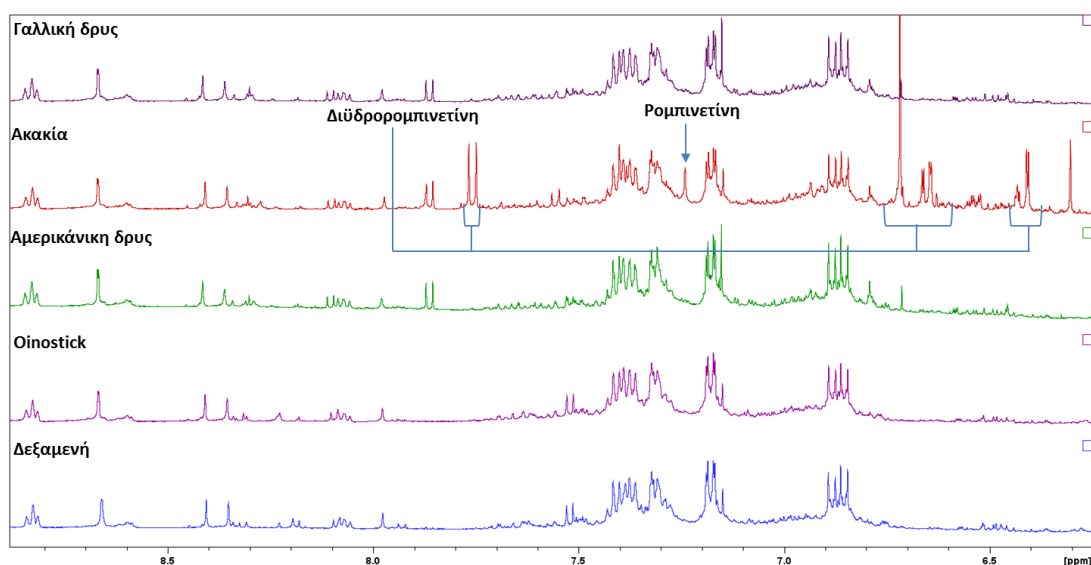


Ουρακίλη

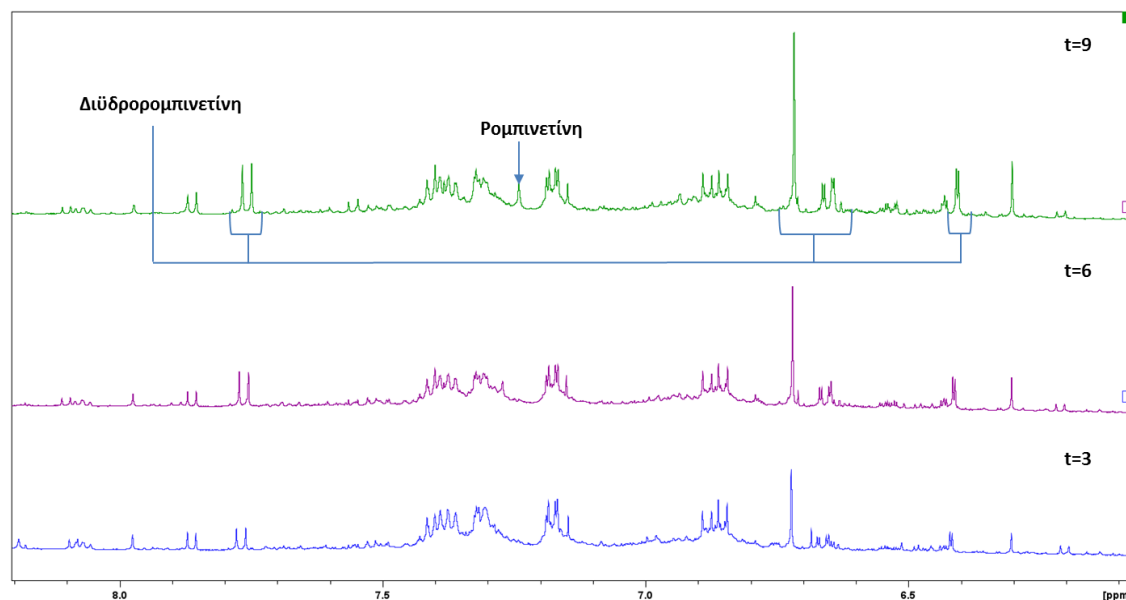


Κυτιδίνη

Μιά άλλη σημαντική διαφοροποίηση στην ποιοτική σύσταση που παρατηρήθηκε αφορά τους οίνους που είχαν αποθηκευθεί σε βαρέλια ακακίας. Στα αντίστοιχα φάσματα ^1H NMR εμφανίζονται στην αρωματική περιοχή επιπλέον κορυφές, οι οποίες ταυτοποιήθηκαν με την χρήση της δισδιάστατης Φασματοσκοπίας NMR και βρέθηκαν να αντιστοιχούν στις ενώσεις διϋδρορομπινετίνη και ρομπινετίνη. Η παρουσία των συγκεκριμένων ενώσεων στο ξύλο της ακακίας έχει αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες με την χρήση της φασματοσκοπίας μαζών,⁶⁴ και έχουν προταθεί ως δείκτες για την ταυτοποίηση του ξύλου που έχει χρησιμοποιηθεί για την αποθήκευση του οίνου. Στην παρούσα διατριβή ανιχνεύονται για πρώτη φορά ως συστατικά οίνου που έχει ωριμάσει σε βαρέλι ακακίας με την Φασματοσκοπία NMR. Στην εικόνα 3.3 παρουσιάζονται τα φάσματα των οίνων της ποικιλίας Δαφνί (Α' τρύγος) μετά από εννιάμηνη ωρίμανση τους στους διάφορους περιέκτες. Στα φάσματα ^1H NMR παρατηρείται η παρουσία των δύο πολυφαινολών (διϋδρορομπινετίνη, ρομπινετίνη) αποκλειστικά και μόνο στα δείγματα που είχαν αποθηκευθεί σε βαρέλια ακακίας. Στην εικόνα 3.4 παρουσιάζονται τα φάσματα ^1H NMR του δείγματος Δαφνί (Α τρύγος) που έχουν αποθηκευθεί σε βαρέλι ακακίας για 3, 6 και 9 μήνες. Οι εντάσεις των κορυφών των δύο ενώσεων αυξάνονται με την πάροδο του χρόνου. Αυτό υποδηλώνει ότι όσο περισσότερο χρόνο παραμένει ο οίνος στο βαρέλι ακακίας τόσο αυξάνεται και η συγκέντρωση των δύο ενώσεων στον οίνο, γεγονός που συμφωνεί και με την βιβλιογραφία.³⁹



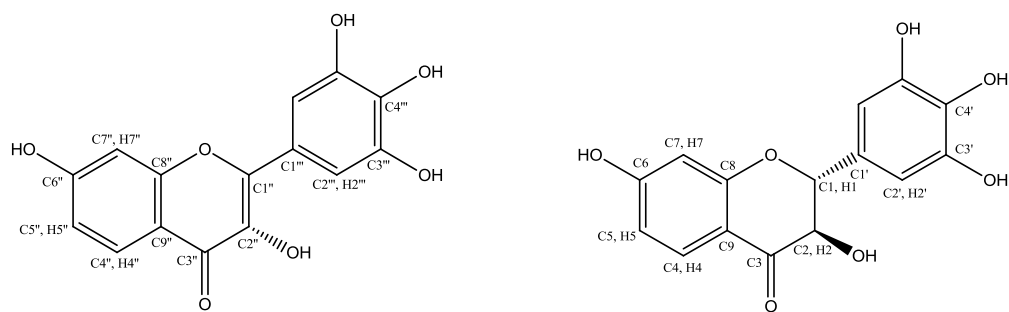
Εικόνα 3.3. Φάσματα ^1H NMR της ποικιλίας Δαφνί (Α τρύγος) μετά από εννιάμηνη ωρίμανση στους περιέκτες. Επισημαίνονται οι κορυφές που ανήκουν στις ενώσεις διϋδρορομπινετίνη και ρομπινετίνη και ταυτοποιήθηκαν στα δείγματα οίνων που είχαν αποθηκευθεί σε βαρέλια ακακίας.



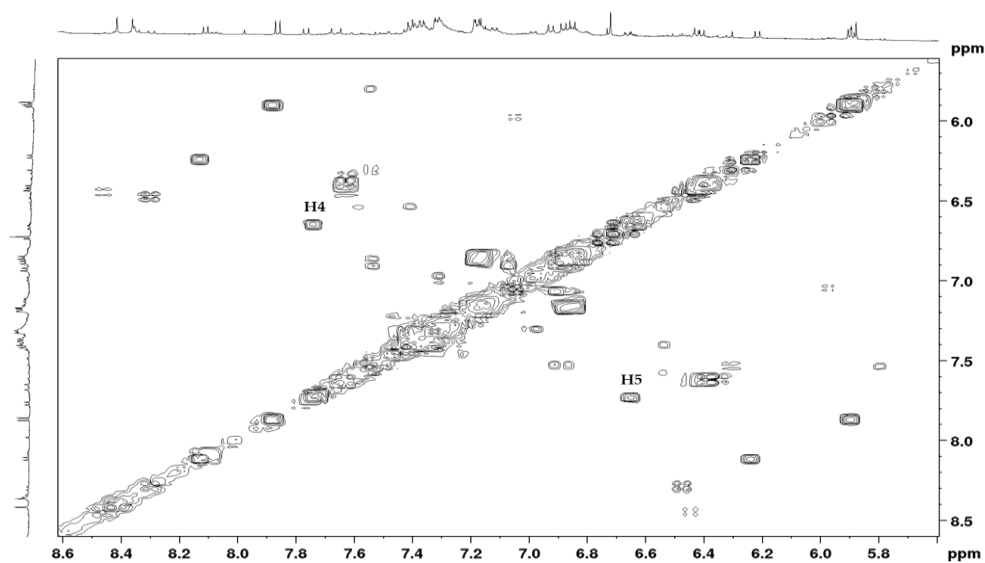
Εικόνα 3.4. Φάσματα ^1H NMR της ποικιλίας Δαφνί (Α τρύγος) μετά από 3, 6 και 9 μήνες παραμονής σε βαρέλια ακακίας.

3.1.2 ΑΝΑΘΕΣΗ ΤΩΝ ΚΟΡΥΦΩΝ ΤΗΣ ΔΙϋΔΡΟΜΠΙΝΕΤΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΡΟΜΠΙΝΕΤΙΝΗΣ ΣΤΑ ΦΑΣΜΑΤΑ NMR ΤΟΥ ΟΙΝΟΥ

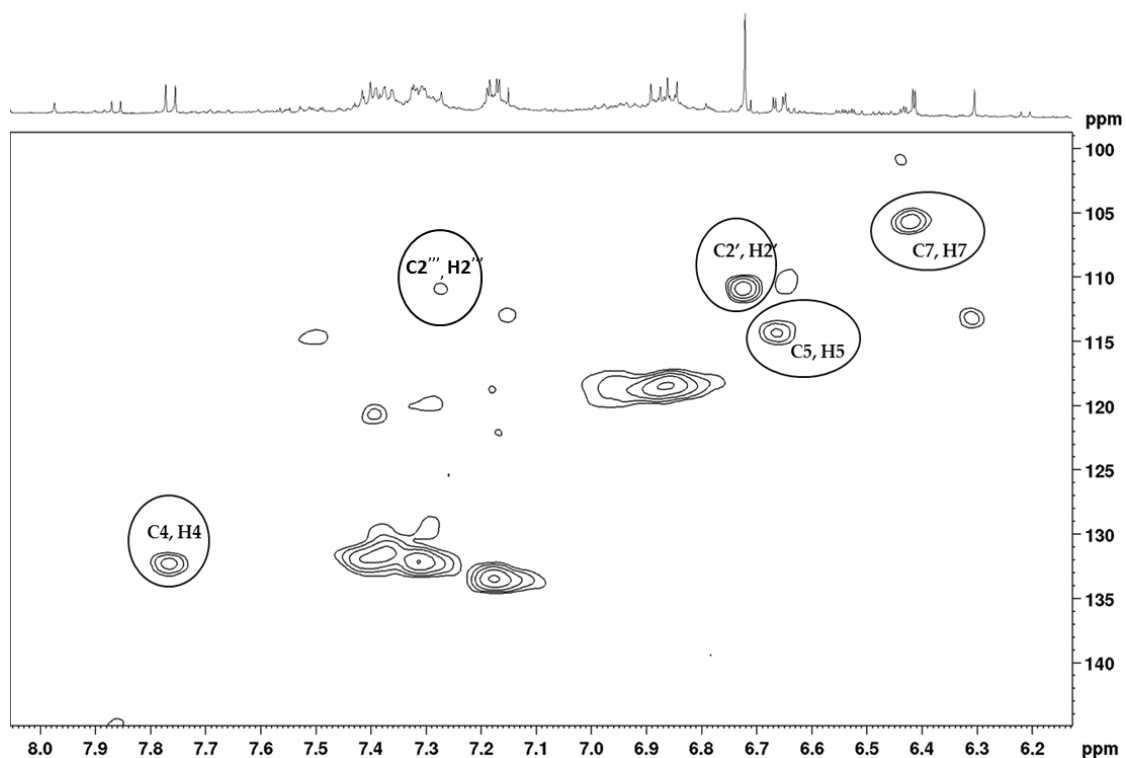
Η πλήρης ανάθεση των κορυφών της διϋδρορομπινετίνης και της ρομπινετίνης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της διδιάστατης φασματοσκοπίας NMR ομοπυρηνικής (^1H - ^1H) (COSY) και ετεροπυρηνικής συσχέτισης (^1H - ^{13}C) (HSQC, HMBC), καθώς και με την χρήση πρότυπων ενώσεων. Στις εικόνες 3.6 και 3.7 παρουσιάζονται τα διδιάστατα φάσματα gCOSY και gHSQC με τις αναθέσεις των κορυφών των ενώσεων.



Εικόνα 3.5. Χημική δομή της ρομπινετίνης και της διϋδρορομπινετίνης.



Εικόνα 3.6. Αρωματική περιοχή φάσματος 2D ομοπυρηνικής συσχέτισης (^1H - ^1H) (COSY) του δείγματος Δαφνί (Α τρύγος) και η ανάθεση των κορυφών των γειτονικών πρωτονίων της διϋδρορομπινετίνης.



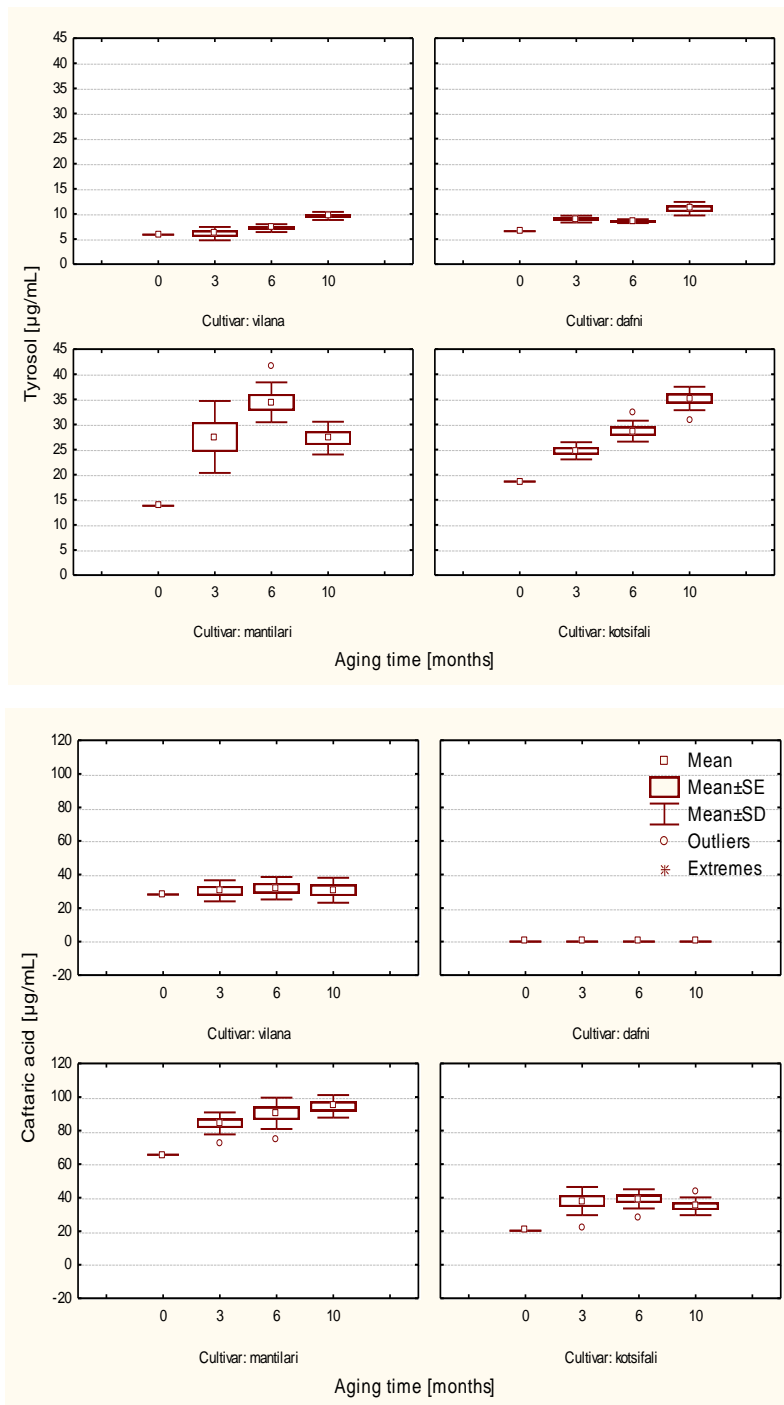
Εικόνα 3.7. Αρωματική περιοχή φάσματος 2D ετεροπυρηνικής συσχέτισης (^1H - ^{13}C) (HSQC) του δείγματος Δαφνί (Α τρύγος) και η ανάθεση των κορυφών της διϋδρορομπινετίνης και της ρομπινετίνης.

3.1.3 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΙΝΟΥ

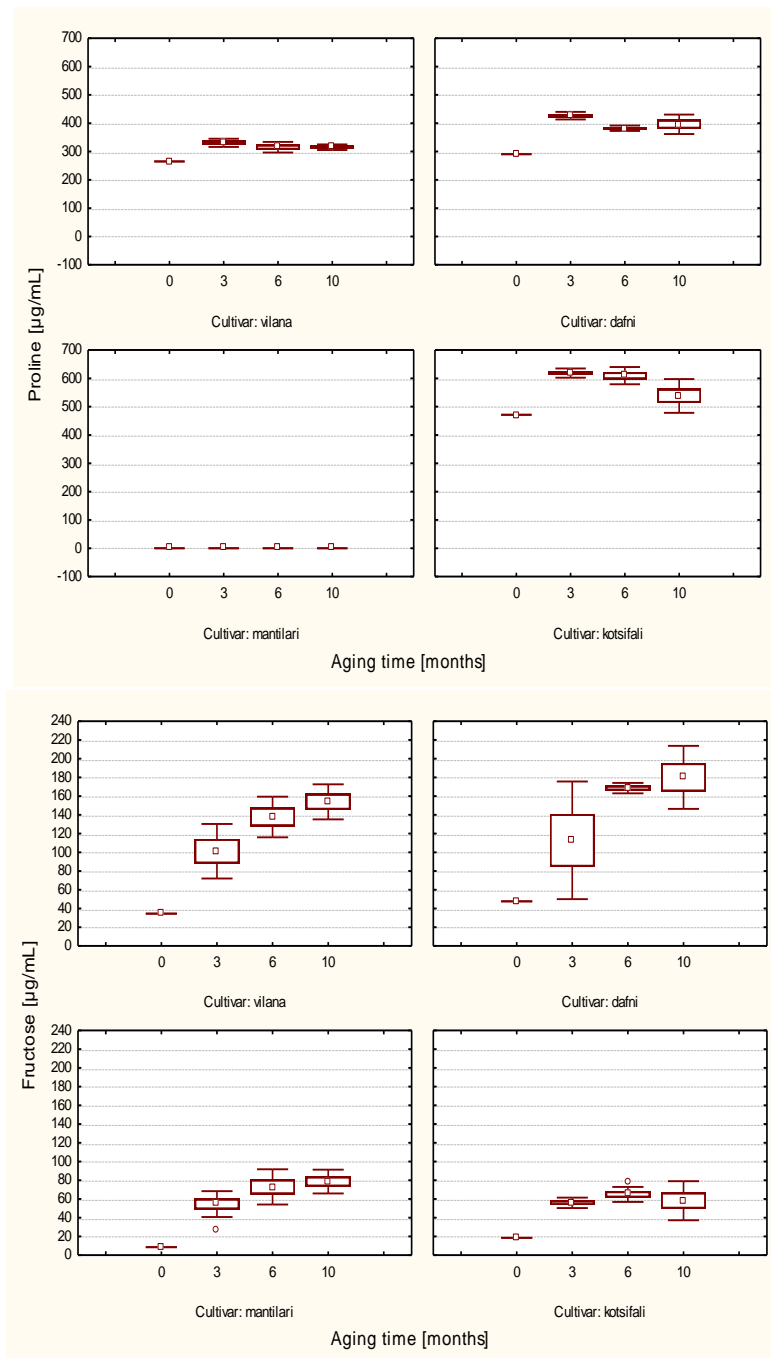
Η ποσοτική ανάλυση των φασμάτων 1D ^1H NMR πραγματοποιήθηκε με σκοπό τον υπολογισμό των συγκεντρώσεων των οργανικών ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στα δείγματα οίνου. Η ποσοτικοποίηση ήταν δυνατή για τις ενώσεις που εμφάνιζαν στο φάσμα ^1H NMR τουλάχιστον μία κορυφή ελεύθερη από αλληλεπικαλύψεις. Το εσωτερικό πρότυπο που χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση των ενώσεων ήταν το TSP (δ 0.0). Η διαδικασία της ποσοτικοποίησης που ακολουθήθηκε ήταν η εξής: Μετά την ταυτοποίηση της κάθε ένωσης πραγματοποιήθηκε α) ολοκλήρωση των κορυφών που επιλέχθηκαν ως οι πλέον κατάλληλες για ποσοτικοποίηση με το λογισμικό WIN-NMR, β) κανονικοποίηση ως προς τον αριθμό των πρωτονίων που συνεισφέρουν σε κάθε κορυφή και γ) πολλαπλασιασμός με τη μοριακή μάζα κάθε χημικής ένωσης. Τέλος, έγινε η διαίρεση με τον όγκο του δείγματος οίνου που χρησιμοποιήθηκε. Με τον τρόπο αυτό υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις (mg/L) των

ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στα δείγματα οίνου που αναλύθηκαν. Στο Παράρτημα 1, στους πίνακες 1 και 2 παρουσιάζονται αναλυτικά οι συγκεντρώσεις (mg/L) των ενώσεων για τα δείγματα του Α και Β τρύγου αντίστοιχα και στον πίνακα 3 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των ενώσεων για τα δείγματα οίνου που είχαν αποθηκευθεί 12 μήνες επιπλέον σε φιάλες. Οι συγκεντρώσεις που υπολογίστηκαν για κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν έπειτα για την μεταβολομική ανάλυση των οίνων.

Η ποσοτική ανάλυση των οίνων έδειξε ότι αυτοί διαφοροποιούνται ισχυρά όσον αφορά τη χημική τους σύσταση με βάση τον τύπο (λευκός ή ερυθρός οίνος) όσο και την ποικιλία (για τον ίδιο τύπο οίνου, π.χ. Δαφνί-Βηλάνα και Μαντηλάρι-Κοτσιφάλι). Επίσης, πολύ σημαντική είναι και η επίδραση του χρόνου ωρίμανσης στη συγκέντρωση των μεταβολιτών του οίνου. Η τυροσόλη στην εικόνα 3.8 εμφανίζεται σε μεγαλύτερη ποσότητα στους κόκκινους οίνους (Μαντηλάρι-Κοτσιφάλι) σε σχέση με τους λευκούς, και η συγκέντρωσή της αυξάνεται συναρτήσει του χρόνου ωρίμανσης. Το καφταρικό οξύ επίσης αυξάνεται ελαφρά με την εξέλιξη της ωρίμανσης, αλλά διαφοροποιεί και τους οίνους ιδίου τύπου, αφού δεν υπάρχει καθόλου στην ποικιλία Δαφνί, ενώ βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στον οίνο της ποικιλίας Μαντηλάρι, σε σχέση με τον οίνο Κοτσιφάλι. Επιπλέον στην εικόνα 3.9 παρουσιάζεται η μεταβολή στις συγκεντρώσεις του αμινοξέος προλίνη και του δισακχαρίτη φρουκτόζη συναρτήσει του χρόνου ωρίμανσης στους οίνους. Όπως προκύπτει, οι δύο λευκοί οίνοι έχουν παρόμοια επίπεδα προλίνης, η οποία απουσιάζει εντελώς από την ερυθρή ποικιλία Μαντηλάρι, αλλά βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στην ποικιλία Κοτσιφάλι. Η συγκέντρωση της φρουκτόζης είναι μεγαλύτερη στους λευκούς οίνους σε σχέση με τους ερυθρούς, και φαίνεται να αυξάνεται με την ωρίμανση σε περιέκτες.



Εικόνα 3.8. Συγκεντρώσεις των πολυφαινολικών συστατικών τυροσόλη και καφταρικό οξύ στους τέσσερις οίνους συναρτήσει του χρόνου ωρίμανσης σε περιέκτες για τον πρώτο τρύγο Α', όπως υπολογίστηκαν με τη Φασματοσκοπία ^1H NMR.

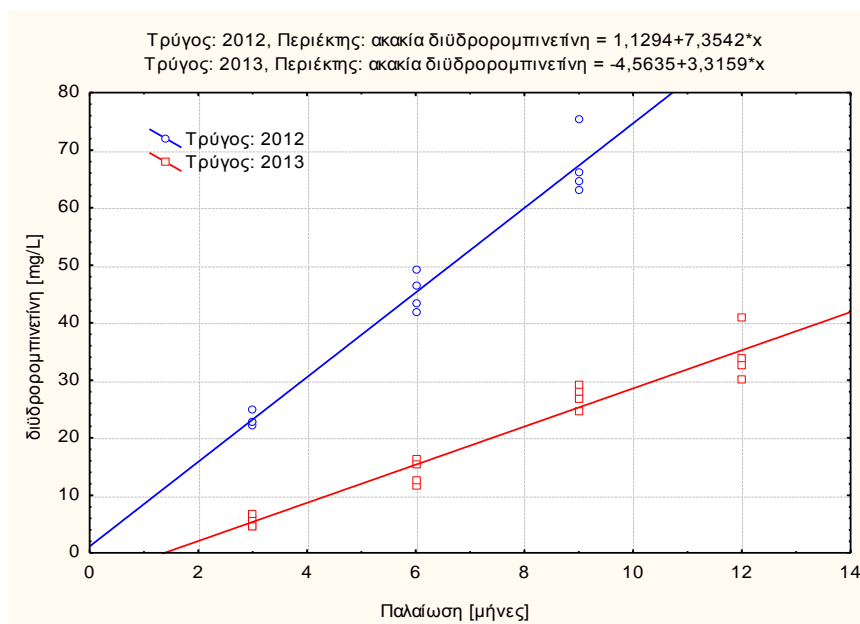


Εικόνα 3.9. Συγκεντρώσεις της προλίνης και της φρουκτόζης στους τέσσερις οίνους συναρτήσει του χρόνου ωρίμανσης σε περιέκτες για τον πρώτο τρύγο Α', όπως υπολογίστηκαν με τη Φασματοσκοπία ^1H NMR.

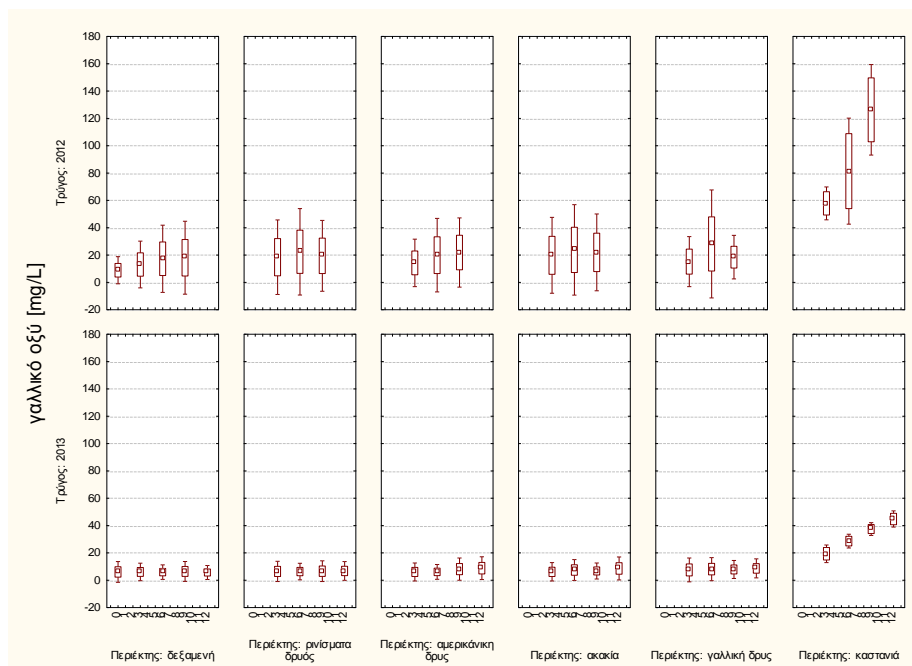
Όσον αφορά τις διαφοροποιήσεις ανάμεσα στους διαφορετικούς τύπους περιεκτών, αναφέρθηκε ήδη ότι οι οίνοι που είχαν ωριμάσει σε βαρέλια ακακίας περιείχαν υψηλές συγκεντρώσεις της φαινόλης διυδρορομπινετίνης, η οποία είχε

μηδενικές συγκεντρώσεις σε όλους τους άλλους περιέκτες. Υπολογίστηκε ότι κατά τον πρώτο τρύγο η συγκέντρωση της διυδρορομπινετίνης αυξάνεται κατά 7,3 mg/L οίνου για κάθε μήνα παλαίωσης σε βαρέλι ακακίας τον πρώτο χρόνο χρήσης των βαρελιών, ενώ κατά το δεύτερο χρόνο χρήσης τους, λόγω της εξάντλησης του ξύλου, η συγκέντρωση της διυδροξυρομπινετίνης αυξάνεται κατά περίπου 3,3 mg/L οίνου για κάθε μήνα παλαίωσης (Εικόνα 3.10). Η διυδρορομπινετίνη μπορεί επομένως να χρησιμοποιηθεί σαν ιχνηλάτης (marker) της παλαίωσης του οίνου σε βαρέλια ακακίας.

Οι οίνοι που ωρίμασαν σε βαρέλι καστανιάς έδειξαν ιδιαίτερα αυξημένες συγκεντρώσεις της φαινόλης γαλλικό οξύ, όπως φαίνεται στην εικόνα 3.11, μιας ένωσης που ωστόσο υπάρχει και ενδογενώς στους οίνους. Και εδώ παρατηρήθηκαν μικρότερες συγκεντρώσεις του γαλλικού οξέος κατά τον δεύτερο τρύγο (2013), λόγω της εξάντλησης του ξύλου της καστανιάς, ωστόσο το γαλλικό οξύ μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν ιχνηλάτης (marker) παλαίωσης του οίνου σε βαρέλια καστανιάς.



Εικόνα 3.10. Συγκεντρώσεις της διυδρορομπινετίνης στους οίνους συναρτήσει του χρόνου ωρίμανσης για το ίδιο βαρέλι ακακίας και για τους δύο τρύγους, όπως υπολογίστηκαν με τη Φασματοσκοπία $^1\text{H NMR}$.



Εικόνα 3.11. Συγκεντρώσεις του γαλλικού οξέος στους οίνους συναρτήσεως του χρόνου ωρίμανσης για κάθε περιέκτη και για τους δύο τρύγους, όπως υπολογίστηκαν με τη Φασματοσκοπία ^1H NMR.

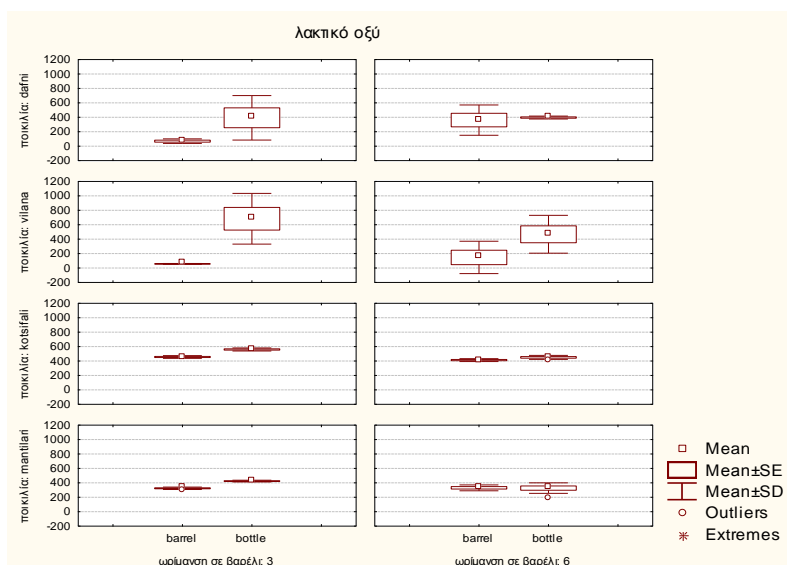
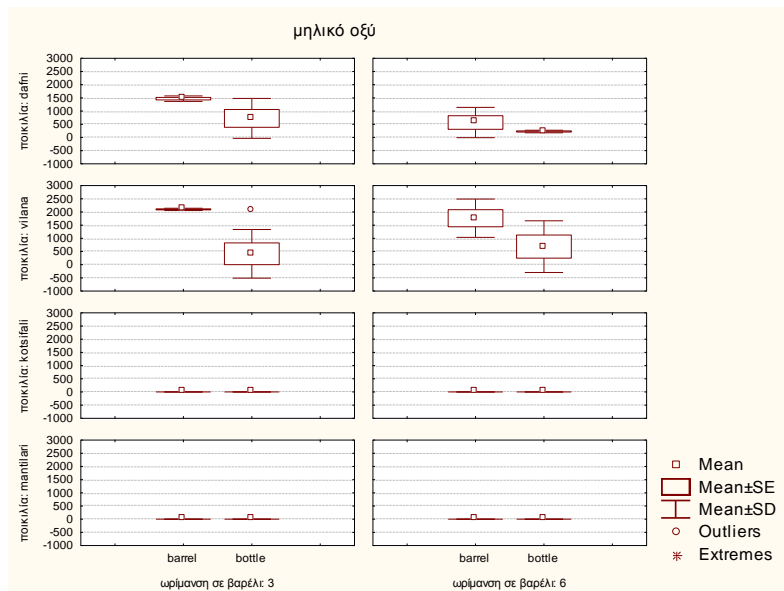
3.1.4 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΙΝΟΥ ΠΟΥ ΕΙΧΑΝ ΑΠΟΘΗΚΕΥΘΕΙ ΣΕ ΦΙΑΛΕΣ ΓΙΑ 12 ΜΗΝΕΣ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΣΤΟΥΣ ΠΕΡΙΕΚΤΕΣ ΓΙΑ 3 ΚΑΙ 6 ΜΗΝΕΣ

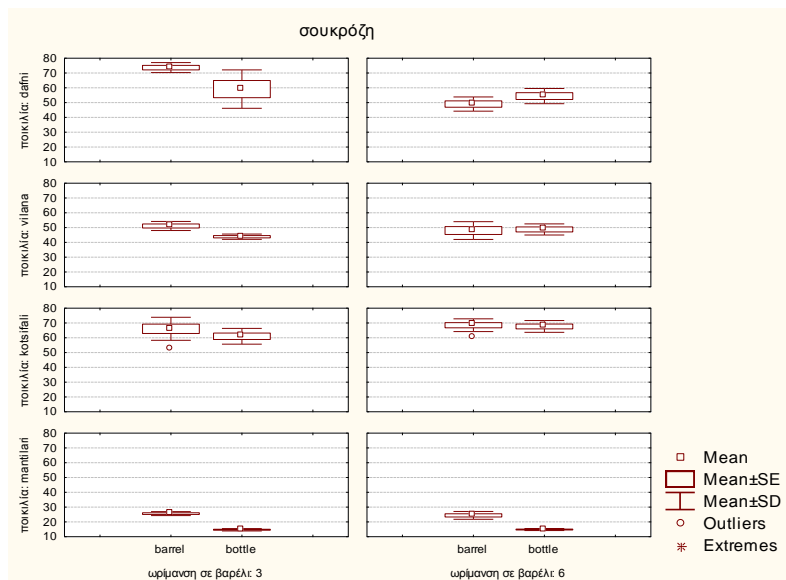
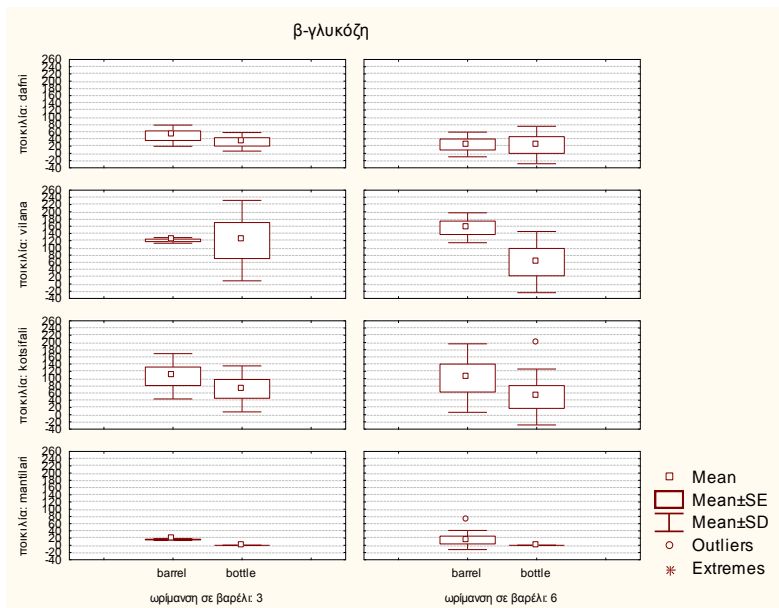
Δείγματα οίνου που είχαν ωριμάσει για 3 και 6 μήνες σε διάφορους περιέκτες εμφιαλώθηκαν, και αποθηκεύθηκαν για 12 μήνες. Τα δείγματα αυτά αναλύθηκαν στη συνέχεια με τη φασματοσκοπία NMR, ώστε να εντοπιστούν οι διαφορές που επιφέρει η διατήρηση σε φιάλη των οίνων μετά την ωρίμανσή τους σε βαρέλια. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων των φιαλών για 3 και 6 μήνες ωρίμανσης σε περιέκτες δίνονται στο Παράρτημα.

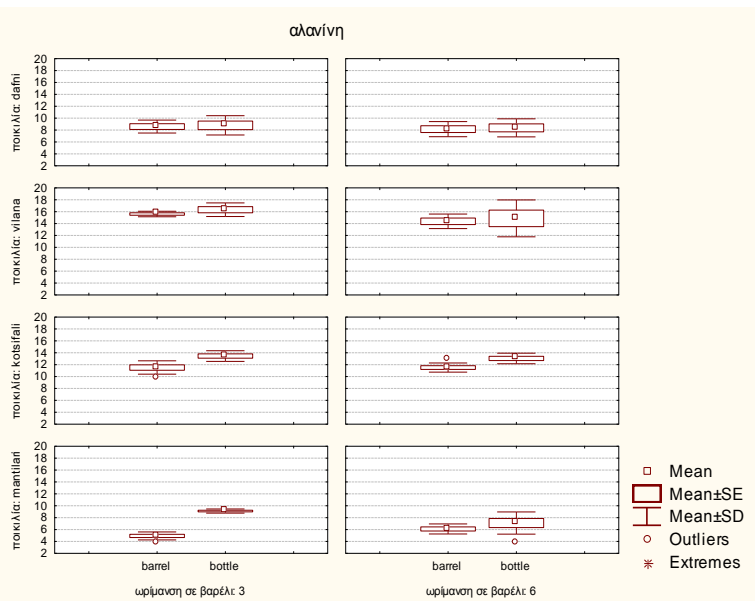
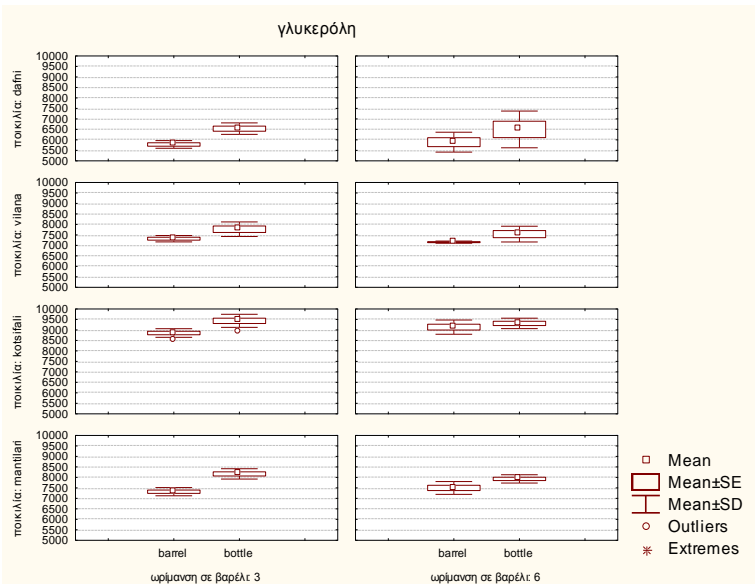
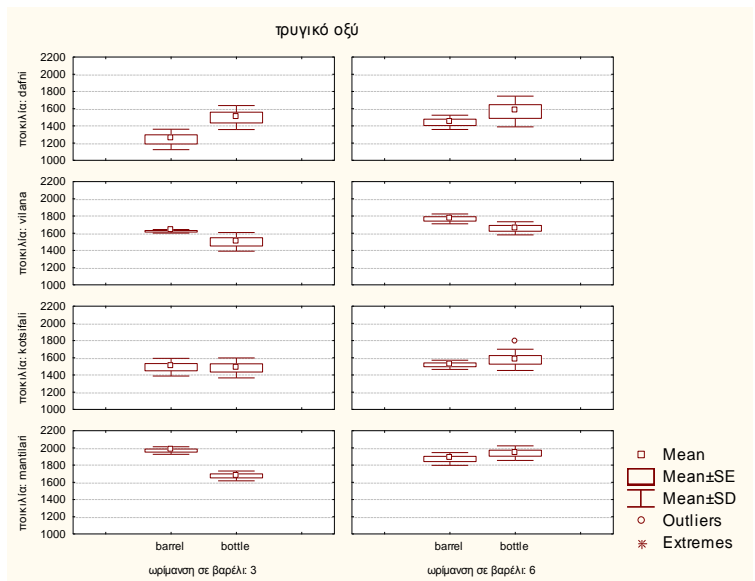
Παρατηρήθηκαν αρκετές σημαντικές διαφοροποιήσεις στο μεταβολομικό προφίλ των οίνων μετά την παραμονή τους σε φιάλες για 12 μήνες. Οι συγκεντρώσεις του καφταρικού οξέος της σουκρόζης και της α - και β - γλυκόζης βρέθηκαν χαμηλότερες σε όλους τους οίνους μετά την παραμονή για 12 μήνες σε φιάλες, όπως και η ουριδίνη και τα οξέα φουμαρικό και μηλικό, τα οποία υπάρχουν μόνο στους λευκούς οίνους. Το γαλακτικό οξύ αυξάνεται στους λευκούς οίνους, ενώ στις ερυθρές ποικιλίες που δεν περιέχουν μηλικό οξύ οι συγκεντρώσεις του γαλακτικού οξέος

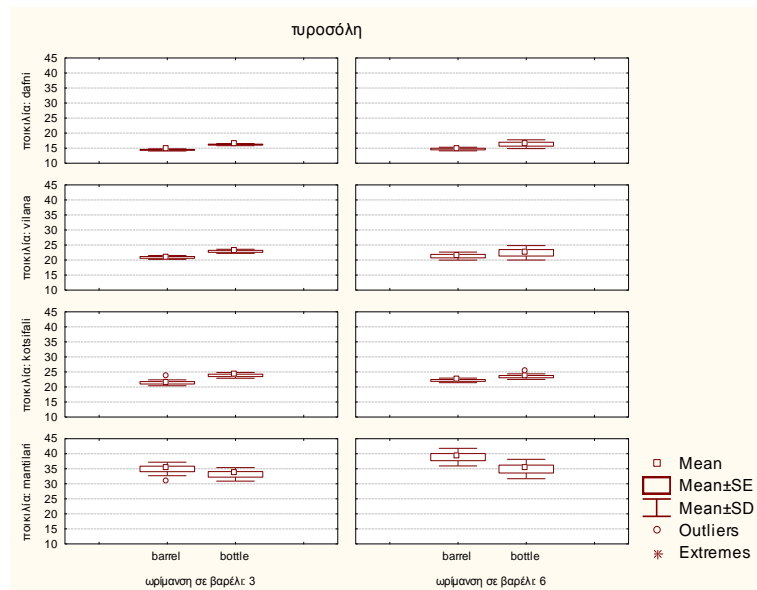
παραμένουν σχεδόν σταθερές, αλλά αυξάνονται αυτές του κιτρομηλικού οξέος. Το τρυγικό οξύ αυξάνεται μετά την παραμονή σε φιάλη για την ποικιλία Δαφνί, αλλά μειώνεται για τη Βηλάννα, ενώ δεν εμφανίζεται σταθερή τάση για τους ερυθρούς οίνους.

Οι ενώσεις των οποίων η συγκέντρωση αυξάνεται με την παραμονή σε φιάλη για όλους τους οίνους είναι η τριγονελίνη, ιστιδίνη, ξανθίνη, γλυκερόλη, γαλακτουρονικό οξύ, ηλεκτρικό και οξικό οξύ, και το αμινοξύ προλίνη. Η αλανίνη αυξάνεται στους ερυθρούς οίνους, αλλά παραμένει σταθερή στους λευκούς. Η φαινολική ένωση τυροσόλη αυξάνεται ελαφρά σε όλους τους οίνους, αλλά μειώνεται στην ποικιλία Μαντηλάρι, ενώ το ηλεκτρικό οξύ αυξάνεται ελαφρά σε όλους τους οίνους, πλην της Βηλάννας. Η ουρακίλη αυξάνεται στους λευκούς οίνους μετά την παραμονή τους σε φιάλη για 12 μήνες, ενώ μειώνεται ελαφρά στους ερυθρούς.









Εικόνα 3.12. Συγκεντρώσεις (mg/L οίνου) του μηλικού και του γαλακτικού οξέος, των σακχάρων β-γλυκόζη και σουκρόζη, του τρυγικού οξέος, της γλυκερόλης, της αλανίνης κι της τυροσόλης στους οίνους μετά την παραμονή τους στους περιέκτες για 3 ή 6 μήνες και την επιπλέον δωδεκάμηνη παραμονή τους σε φιάλες, όπως υπολογίστηκαν με τη Φασματοσκοπία ^1H NMR.

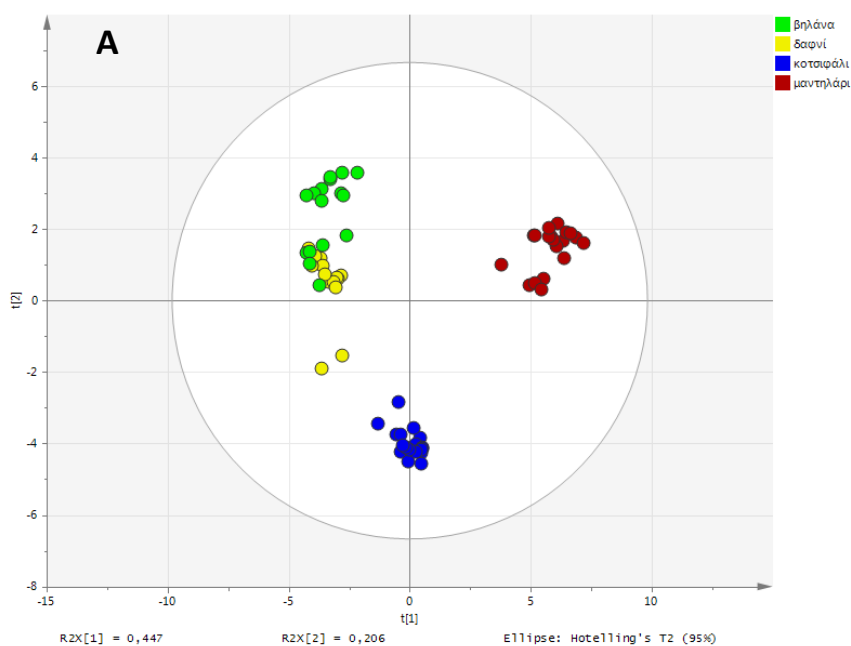
3.1.5 ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΙΝΟΥ ΤΟΥ Α ΤΡΥΓΟΥ (2012)

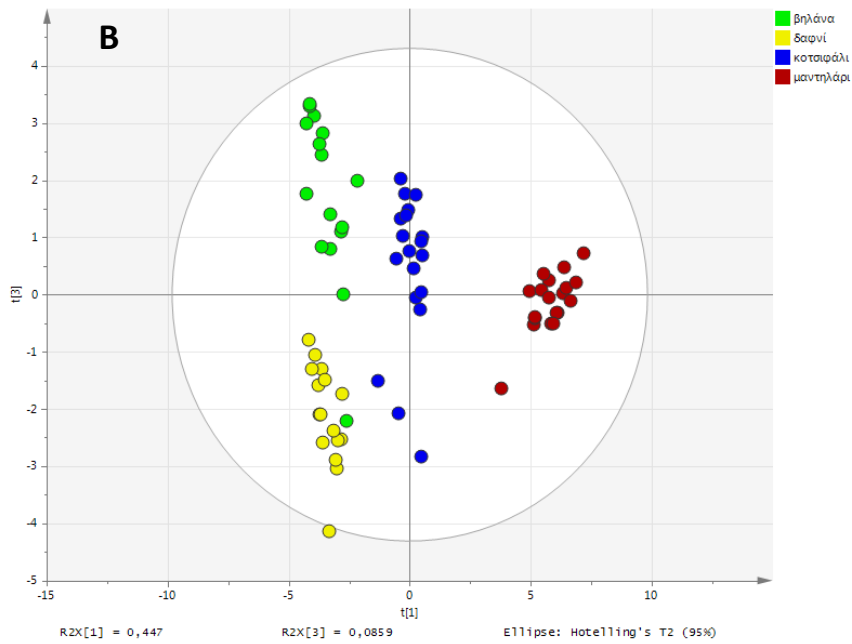
Ποικιλία

Πραγματοποιήθηκε η ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) με το λογισμικό Simca στα δείγματα των λευκών και ερυθρών οίνων σε χρόνο μηδέν ($t=0$), μετά από 3, 6 και 9 μήνες ωρίμανσης σε διάφορους περιέκτες. Τα δείγματα οίνου μετά από 12 μήνες ωρίμανσης στους περιέκτες δεν συμπεριλήφθηκαν στην μεταβολομική ανάλυση, διότι κατά την εμφιάλωσή τους πριν την παράδοση προς ανάλυση υπήρξε επιμόλυνση μεταξύ διαφορετικών περιεκτών, η οποία και ταυτοποιήθηκε από τα φάσματα NMR των αντίστοιχων δειγμάτων. Ο αριθμός των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκε στη μεταβολομική ανάλυση των οίνων του Α' τρύγου ήταν 70 και ο αριθμός των μεταβολιτών (X μεταβλητές) 34. Η ανάλυση κύριων συνιστωσών είναι μη-επιβλεπόμενη (unsupervised) στατιστική μέθοδος στην οποία η διαφοροποίηση των δειγμάτων γίνεται αποκλειστικά με βάση τις πειραματικές τιμές των διαφόρων μεταβλητών τους. Ένα επιτυχημένο μοντέλο περιγράφει ένα μεγάλο ποσοστό της συνολικής διασποράς της διακύμανσης των μεταβλητών ($R^2 > 0.50$) και έχει ισχυρή προβλεπτική ικανότητα ($Q^2 > 0.50$).

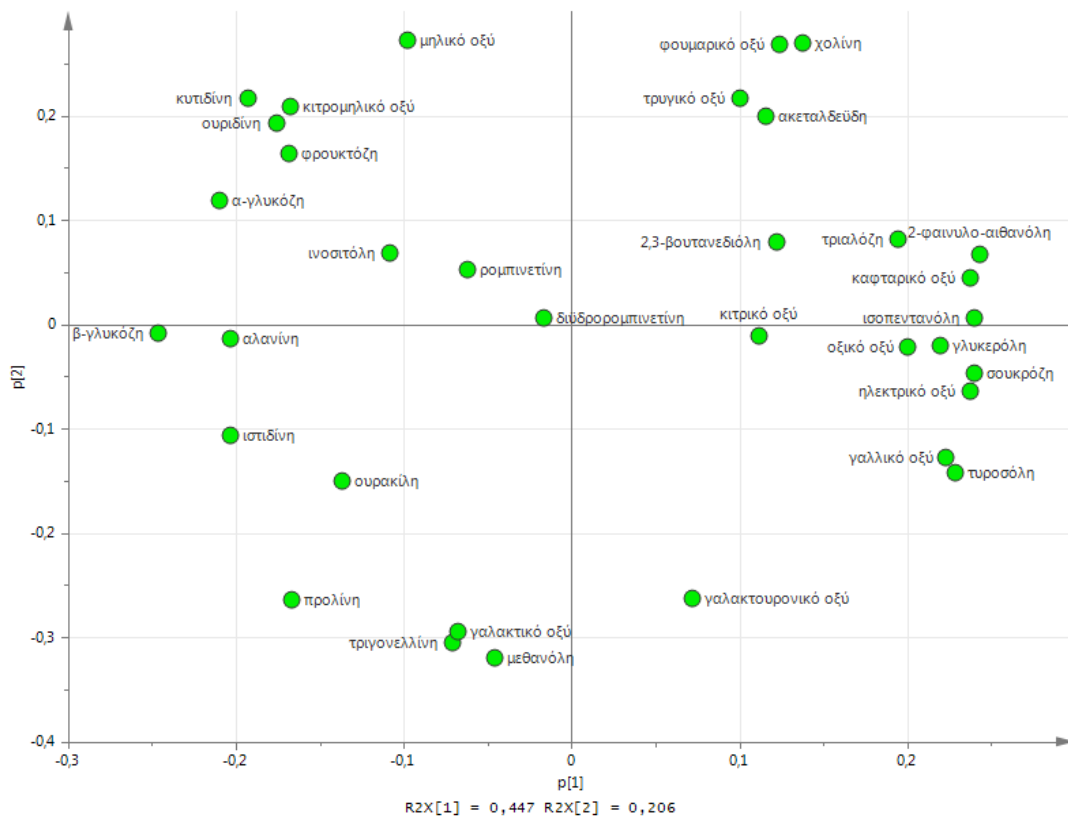
Στην εικόνα 3.8 παρουσιάζεται το διάγραμμα τιμών που προκύπτει από την ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) των ερυθρών οίνων-Μαντηλάρι και Κοτσιφάλι, και των λευκών οίνων-Βηλάνια και Δαφνί, όπου φαίνεται ότι υπάρχει ισχυρή διαφοροποίηση μεταξύ των ποικιλιών και του τύπου των οίνων. Για το μοντέλο ανάλυσης PCA οι κύριοι άξονες που προσδιορίστηκαν ήταν 6. Οι δύο πρώτοι κύριοι άξονες περιγράφουν το 65.3% της συνολικής διασποράς των μεταβλητών. Ο κύριος άξονας PC1 περιγράφει το 44.7% της διασποράς, ενώ ο δεύτερος κύριος άξονας περιγράφει το 20.6% της διασποράς. Από το διάγραμμα Α της Εικόνας 3.8 (PC1-PC2) προκύπτει ότι με τους δύο πρώτους άξονες υπάρχει καλή διαφοροποίηση μεταξύ ερυθρών και λευκών οίνων, και μεταξύ των δύο ερυθρών οίνων, ενώ στο διάγραμμα Β διαφοροποιούνται καλύτερα οι δύο λευκές ποικιλίες μεταξύ τους. Ο κύριος άξονας PC3 περιγράφει το 8.6% της διασποράς των μεταβλητών. Το μοντέλο ανάλυσης PCA που προέκυψε από τα φασματικά δεδομένα NMR περιγράφει συνολικά το 88.8% της διασποράς των μεταβλητών. Η προβλεπτική ικανότητα (Q^2) του μοντέλου PCA ήταν αρκετά υψηλή, και ίση με 0.676.

Στην εικόνα 3.9 παρουσιάζεται το διάγραμμα βαρύτητας μεταβλητών (loadings) του μοντέλου PCA, στο οποίο παρουσιάζονται οι ενώσεις που συνεισφέρουν στον διαχωρισμό και την ταυτοποίηση των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών για κάθε ποικιλία. Στα δείγματα της ποικιλίας Μαντηλάρι μεγαλύτερη συνεισφορά στον χημειομετρικό διαχωρισμό έχουν οι ενώσεις γαλλικό οξύ, τυροσόλη, ισοπεντανόλη, τριαλόζη, γλυκερόλη, χολίνη, ηλεκτρικό οξύ, καφταρικό οξύ και 2-φαινυλο-αιθανόλη, ενώ στην ποικιλία Κοτσιφάλι έχουν οι ενώσεις τριγονελλίνη, γαλακτικό οξύ, γαλακτουρονικό οξύ, μεθανόλη και προλίνη. Τα δείγματα των λευκών ποικιλιών διαφοροποιήθηκαν από τις υπόλοιπες ποικιλίες λόγω των αυξημένων συγκεντρώσεων των ενώσεων ιστιδίνη, ουριδίνη, μηλικό οξύ, αλανίνη και κυτιδίνη, ενώ το Δαφνί λόγω των ενώσεων α -, β -γλυκόζη και φρουκτόζη.





Εικόνα 3.8. Διαγράμματα ανάλυσης κύριων συνιστωσών (PCA) για τις τέσσερις κρητικές ποικιλίες του Α' τρύγου. Συνιστώσες PC1 και PC2 (Α) και συνιστώσες PC1 και PC3 (Β).

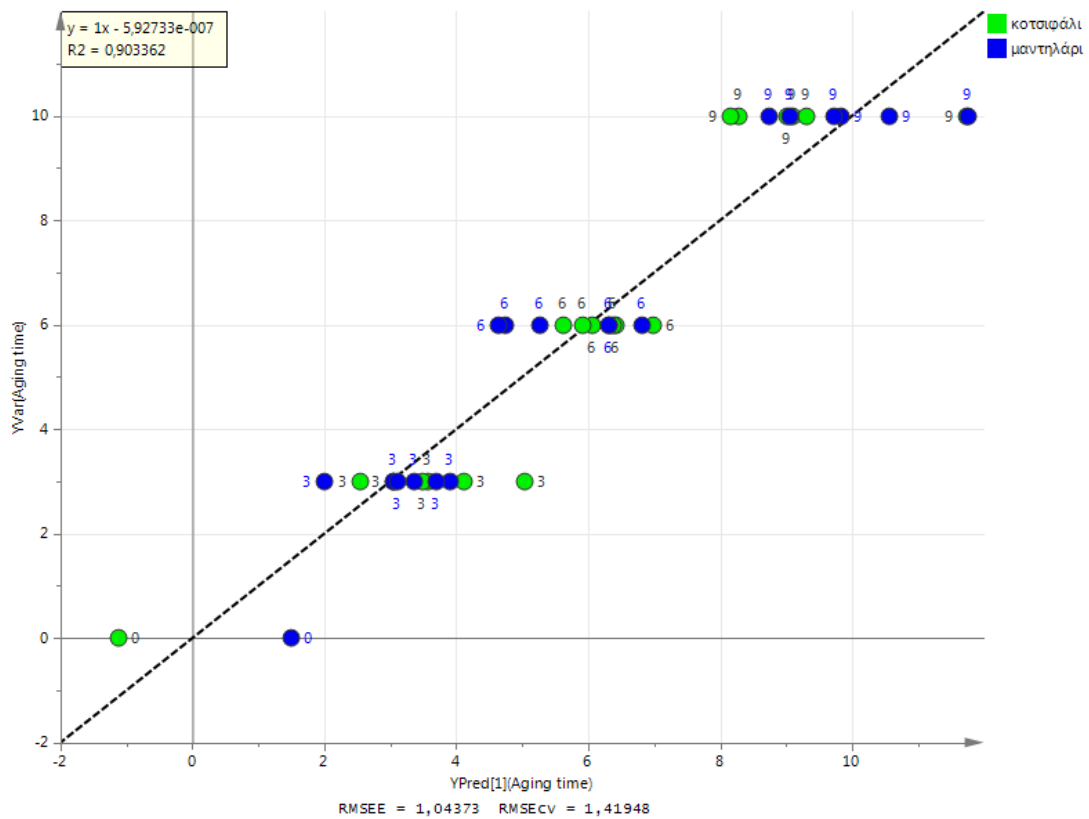
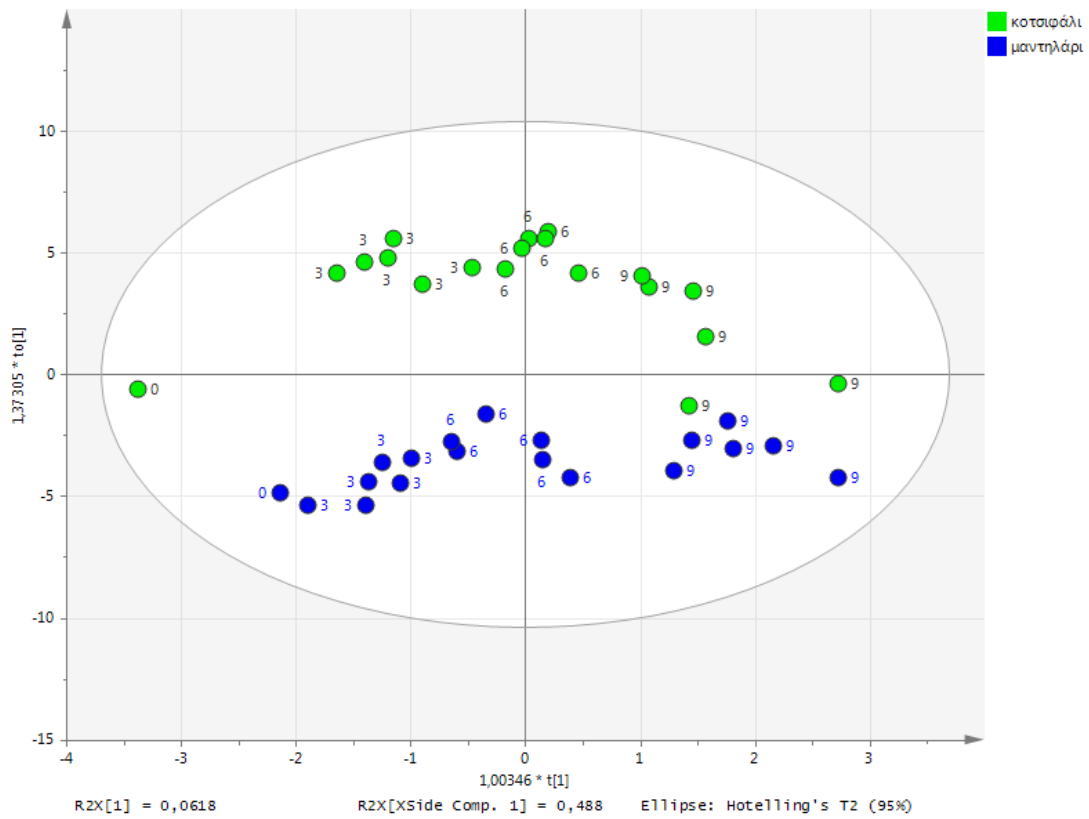


Εικόνα 3.9. Διάγραμμα βαρύτητας μεταβλητών (PC loadings) για τις τέσσερις κρητικές ποικιλίες που αναλύθηκαν.

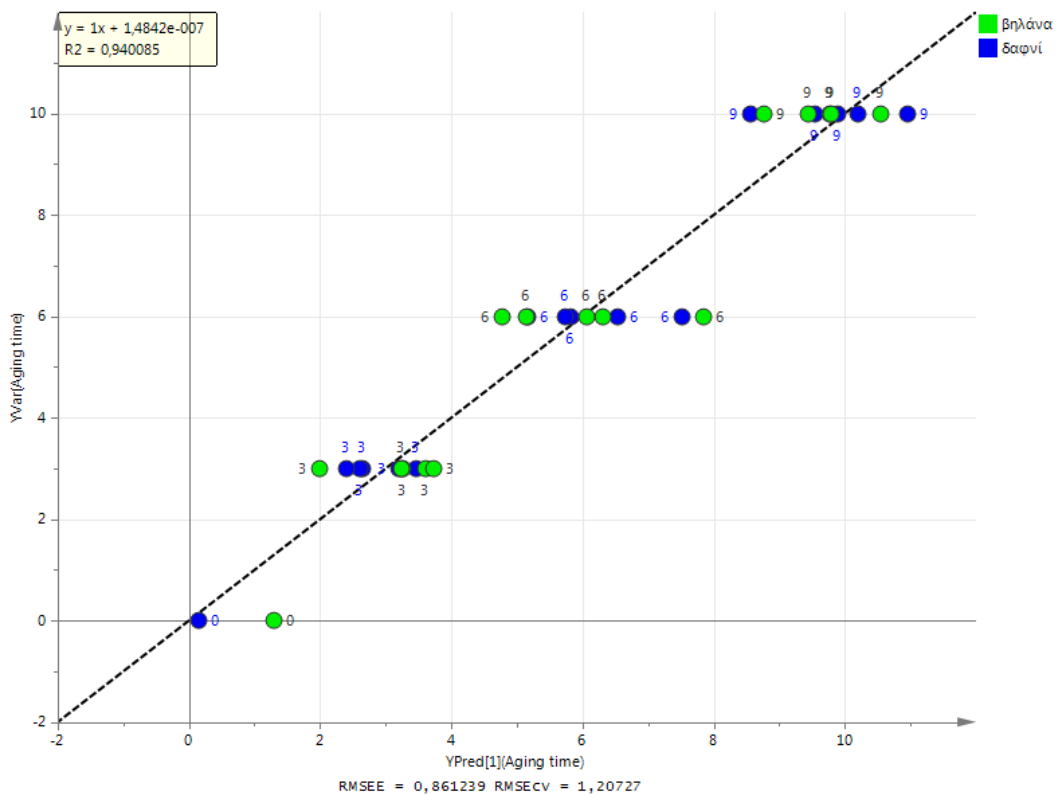
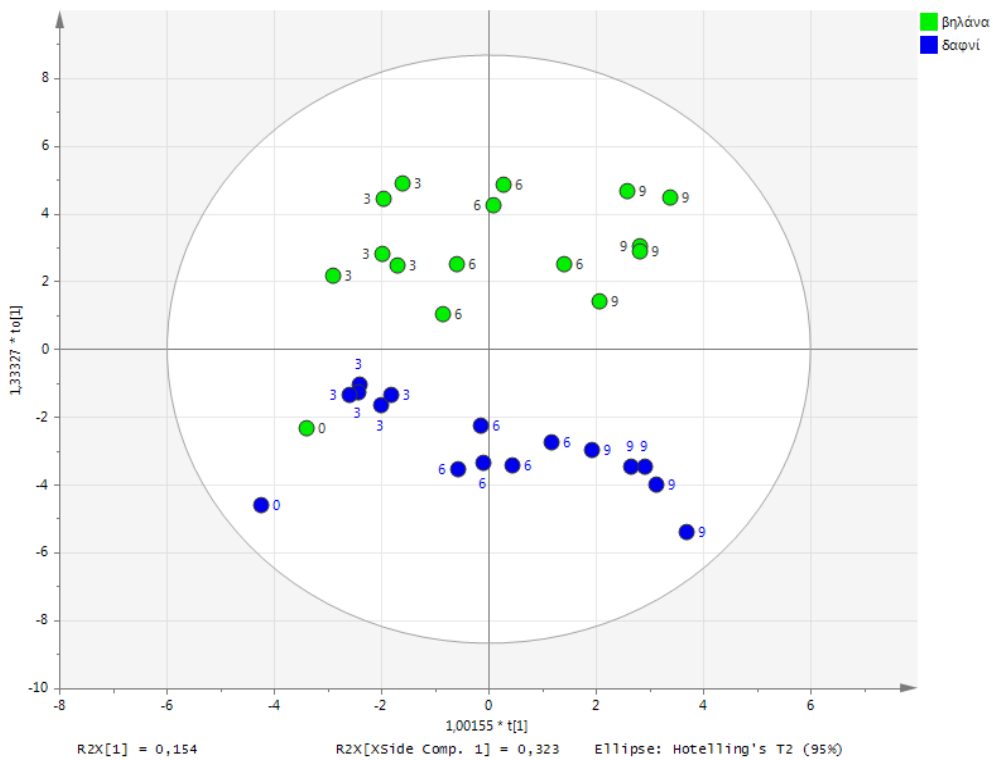
Χρόνος ωρίμανσης

Για την ανάλυση των δειγμάτων οίνου ως προς τον χρόνο ωρίμανσης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των ορθογωνικών μερικών ελαχίστων τετραγώνων OPLS. Στις εικόνες 3.10 και 3.11 παρουσιάζονται τα διαγράμματα OPLS των ερυθρών ποικιλιών, Μαντηλάρι και Κοτσιφάλι και των λευκών ποικιλιών, Βηλάνα και Δαφνί, σύμφωνα με τον χρόνο ωρίμανσης. Στη μέθοδο OPLS η διαφοροποίηση του μεταβολομικού προφίλ των δειγμάτων οίνου (παράμετροι X) συναρτήσεως της παραμέτρου Y που μοντελοποιείται (εν προκειμένω ο χρόνος ωρίμανσης σε περιέκτη) εκφράζεται από τον παράγοντα PLS t1, ο οποίος παριστάνεται στον άξονα x, ενώ διαφοροποιήσεις εξαιτίας άλλων αιτιών (ποικιλία, τύπος περιέκτη) συγκεντρώνεται σε ορθογωνικούς παράγοντες, εκ των οποίων ο πρώτος (to1) παριστάνεται στον άξονα των y.

Από τα διαγράμματα t1/to1 παρατηρείται ότι η εσωτερική διαφοροποίηση μεταξύ των δύο λευκών και των δύο ερυθρών οίνων λόγω ποικιλίας συγκεντρώνεται επιτυχώς στον ορθογωνικό παράγοντα to1, ενώ ο χρόνος ωρίμανσης προσομοιώνεται και απεικονίζεται αποτελεσματικά από τον παράγοντα PLS t1, με τα δείγματα των οίνων να κατατάσσονται από αριστερά προς τα δεξιά κατά αυξανόμενο χρόνο ωρίμανσης. Τα διαγράμματα πραγματικού χρόνου ωρίμανσης (y) και προβλεφθέντος από το μοντέλο OPLS χρόνου ωρίμανσης (x) παρουσιάζονται στην εικόνα 3.10, και εμφανίζουν πολύ καλούς γραμμικούς συντελεστές συσχέτισης ($R^2=0.94$ για τους λευκούς και 0.90 για τους ερυθρούς οίνους) και υψηλή προβλεπτική ικανότητα ($Q^2=0.86$ για τους λευκούς και 0.79 για τους ερυθρούς οίνους). Η εσωτερική επικύρωση (cross validation) των μοντέλων OPLS που αναπτύχθηκαν με βάση τα δεδομένα NMR έδειξε ότι είναι σε θέση να υπολογίζουν τον χρόνο ωρίμανσης του οίνου με ακρίβεια $\pm 1.2-1.4$ μήνες.



Εικόνα 3.10. Διαγράμματα OPLS t1/to1 (πάνω) και προβλεφθέντος χρόνου ωρίμανσης (κάτω) για τις δύο ερυθρές (Μαντηλάρι, Κοτσιφάλι) κρητικές ποικιλίες οίνου κατά τον πρώτο τρύγο (2012) από την ανάλυση του NMR μεταβολικού προφίλ.

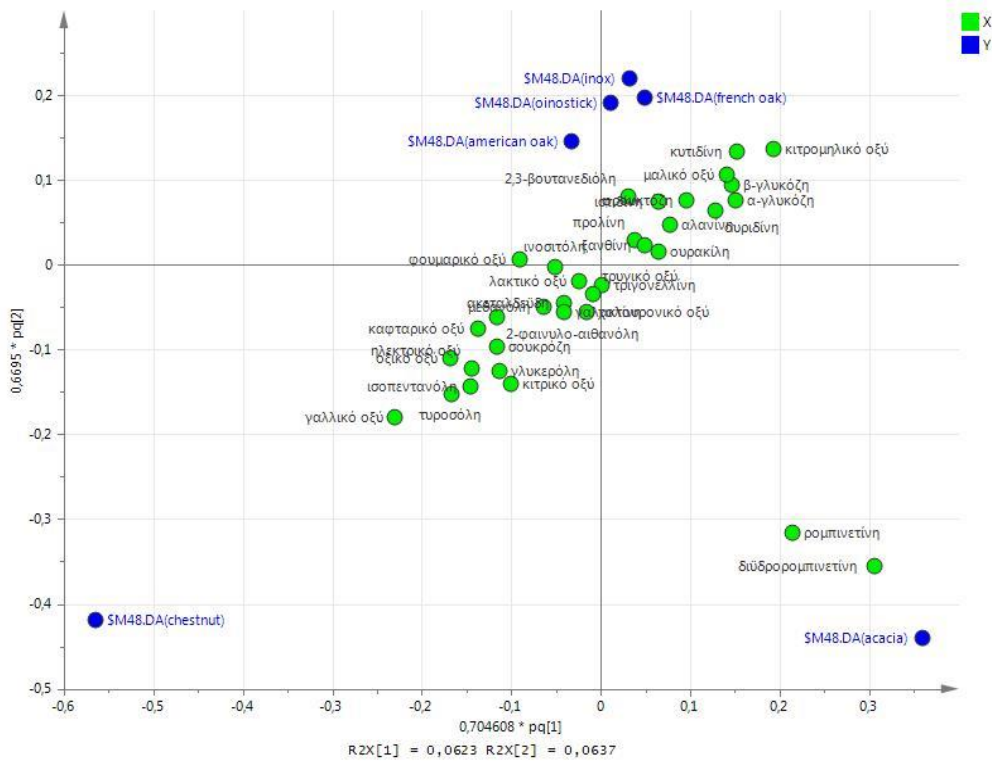
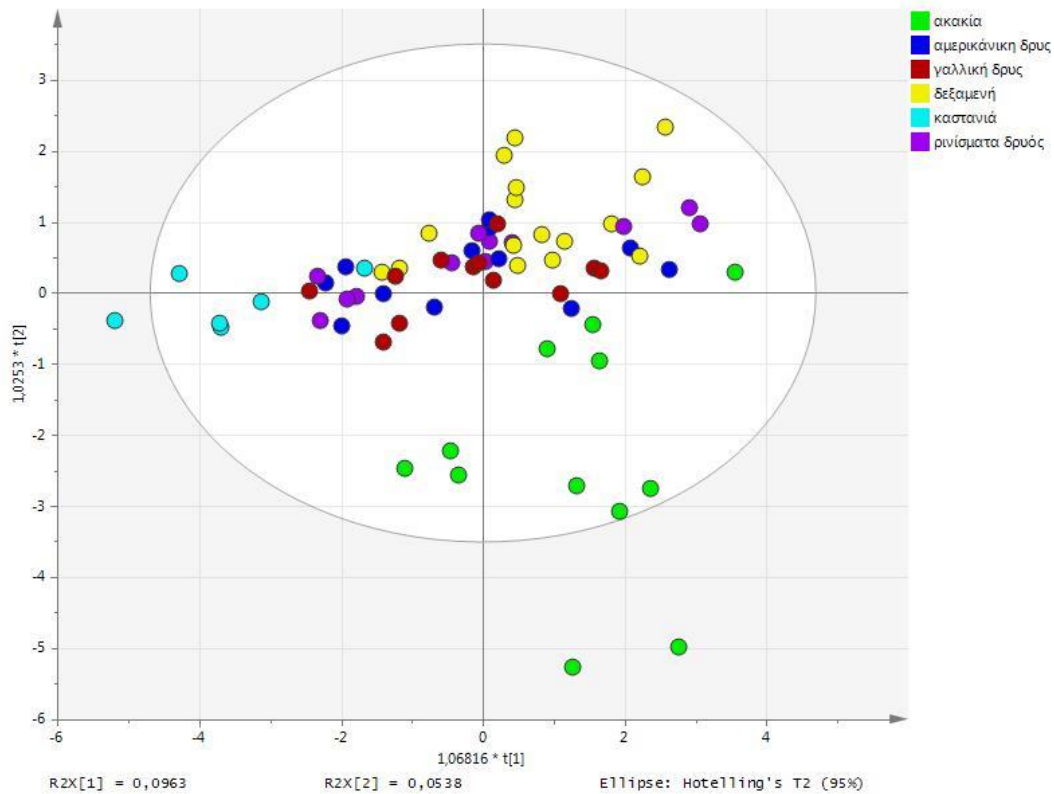


Εικόνα 3.11. Διαγράμματα OPLS t1/to1 (πάνω) και προβλεφθέντος χρόνου ωρίμανσης (κάτω) για τις δύο λευκές (Βηλάννα, Δαφνί) κρητικές ποικιλίες οίνου κατά τον πρώτο τρύγο (2012) από την ανάλυση του NMR μεταβολικού προφίλ.

Τύπος περιέκτη

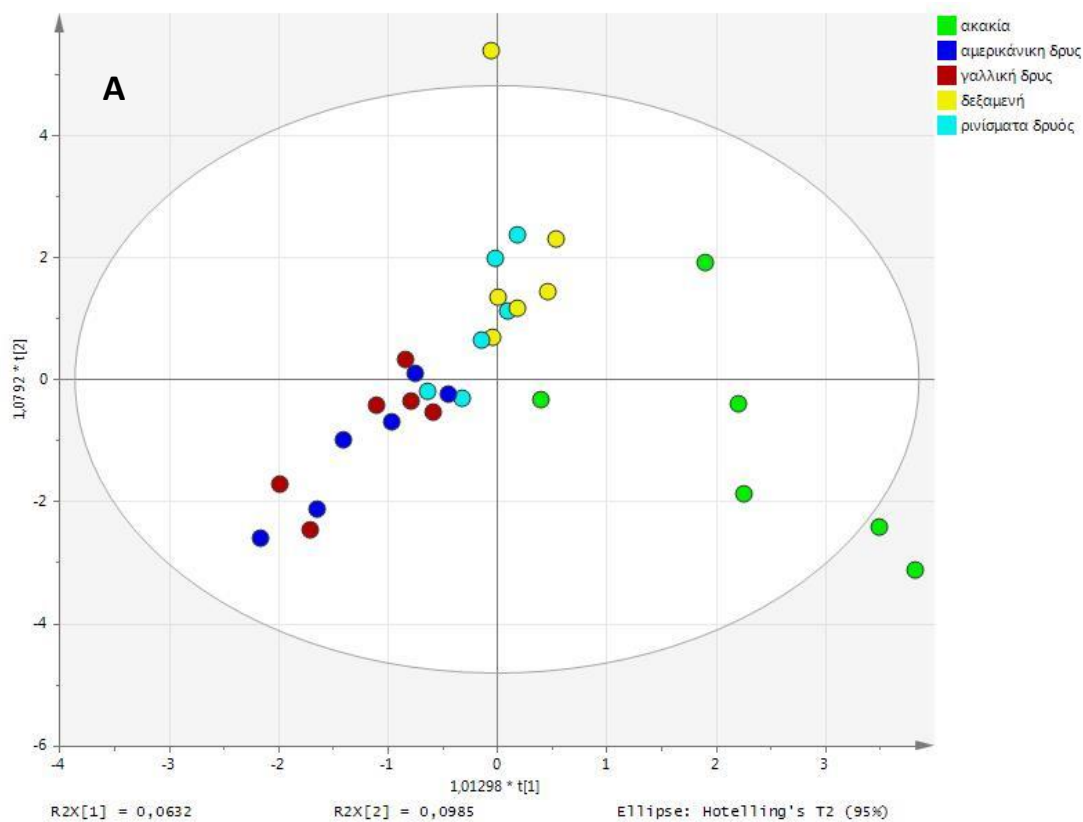
Για την ταξινόμηση των δειγμάτων οίνου που είχαν αποθηκευθεί και ωριμάσει σε διάφορους περιέκτες χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ανάλυσης διακριτότητας μερικών ορθογωνικών ελαχίστων τετραγώνων (Orthogonal Partial Least Square-Discriminal Analysis, OPLS-DA). Στη μέθοδο OPLS-DA η διαφοροποίηση του μεταβολομικού προφίλ (X metabolite variance) των δειγμάτων οίνου εξαιτίας αιτιών (ποικιλία, χρόνος ωρίμανσης σε περιέκτη) που δεν σχετίζονται με την μεταβλητή Y που μοντελοποιείται συγκεντρώνεται σε ορθογωνικούς παράγοντες, ενώ στη συνέχεια πραγματοποιείται ανάλυση διακριτότητας ως προς την επιθυμητή παράμετρο Y, που στην προκειμένη περίπτωση είναι ο τύπος του περιέκτη. Το μοντέλο OPLS-DA απαιτείται για την μεγιστοποίηση της διαφοροποίησης των δειγμάτων ανάλογα με τον περιέκτη αφού όπως αναλύθηκε πιο πάνω, η μεταβολομική επίδραση λόγω ποικιλίας (μοντέλο PCA) και χρόνου ωρίμανσης (μοντέλο OPLS) των οίνων είναι εξαιρετικά ισχυρές και κυριαρχούν.

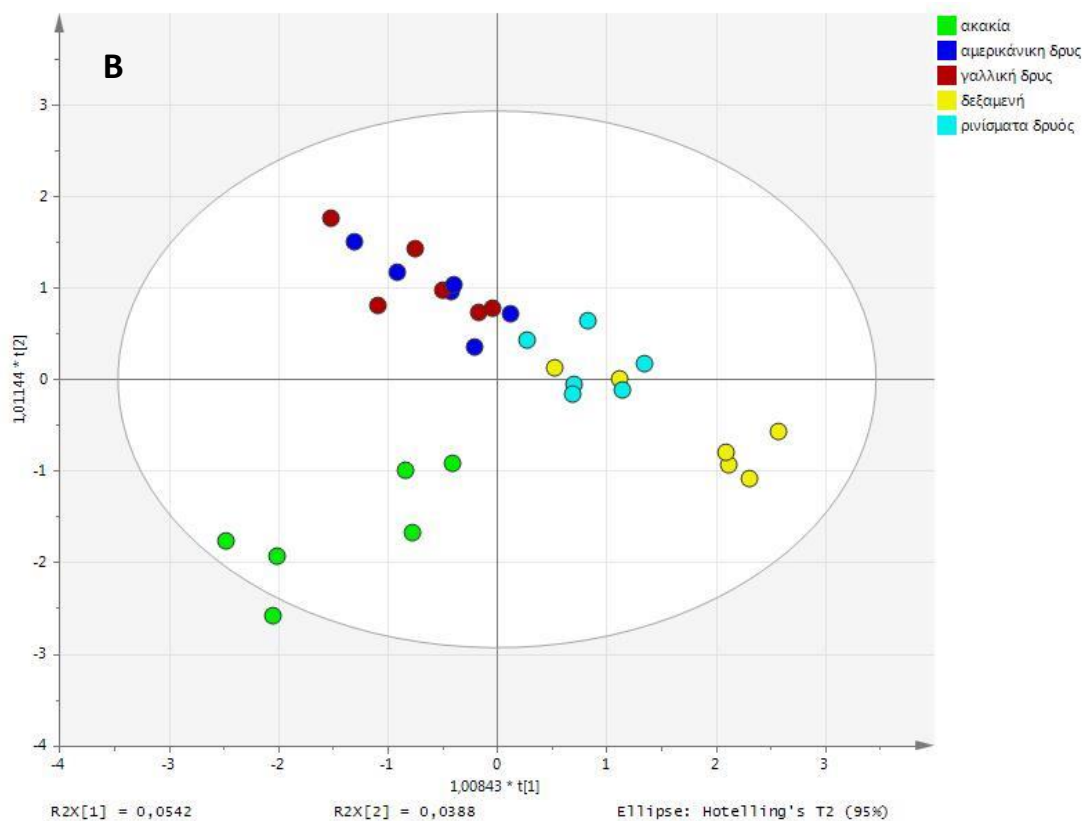
Στην εικόνα 3.12 παρουσιάζεται το διάγραμμα OPLS-DA που προήλθε από την ανάλυση των μεταβολιτών των ερυθρών και λευκών οίνων για τα δείγματα που είχαν αποθηκευθεί σε δεξαμενές (απουσία και παρουσία ρινισμάτων δρυός) και σε ξύλινα βαρέλια (αμερικανική και γαλλική δρυς, ακακία, καστανιά). Η συνολική διασπορά της διακύμανσης των μεταβολιτών σε ορθογωνικούς παράγοντες ήταν R_x^2 ήταν ίση με 0.869. Τα δείγματα που είχαν ωριμάσει σε βαρέλια ακακίας διαφοροποιούνται από τους υπόλοιπους περιέκτες σημαντικά, λόγω της παρουσίας των δύο φαινολών (διϋδρορομπινετίνη, ρομπινετίνη) που ταυτοποιήθηκαν μόνο στα βαρέλια ακακίας, και προέρχονται από το ξύλο της ακακίας. Αξιοσημείωτες διαφοροποιήσεις εμφανίζονται και στα δείγματα οίνου που είχαν αποθηκευθεί σε βαρέλια καστανιάς (περιέκτης μόνο για τους ερυθρούς οίνους), οι οποίες οφείλονται στην αυξημένη συγκέντρωση του γαλλικού οξέος που προέρχεται από το ξύλο της καστανιάς.



Εικόνα 3.12. Διάγραμμα OPLS-DA για τα δείγματα οίνου που είχαν αποθηκευθεί σε inox δεξαμενές (απουσία και παρουσία ρινισμάτων δρυός) και ξύλινα βαρέλια (καστανιά, αμερικάνικη και γαλλική δρυς, ακακία) και το διάγραμμα βαρύτητας μεταβλητών (loadings).

Έπειτα μελετήθηκαν ξεχωριστά οι λευκές και οι ερυθρές ποικιλίες και η ωρίμανση τους σε διαφορετικούς περιέκτες, με εξαίρεση όσα δείγματα είχαν αποθηκευθεί σε βαρέλια καστανιάς, η οποία είχε χρησιμοποιηθεί μόνο στους ερυθρούς οίνους. Στην εικόνα 3.13 παρουσιάζεται το διάγραμμα OPLS-DA για όλα τα δείγματα οίνου των ερυθρών και λευκών ποικιλιών. Όπως παρατηρείται και από τα διαγράμματα υπάρχει ομαδοποίηση μεταξύ των δειγμάτων που είχαν αποθηκευθεί σε δρύινα βαρέλια (αμερικάνικη, γαλλική δρυς) και στα δείγματα που είχαν αποθηκευθεί στις δεξαμενές (ίποκ, ίποκ με ρινίσματα δρυός). Από την ανάλυση των αντίστοιχων διαγραμμάτων βαρύτητας μεταβλητών, βρέθηκε ότι η ένωση που συνεισφέρει ισχυρότερα στην ομαδοποίηση των δειγμάτων των λευκών ποικιλιών που είχαν αποθηκευθεί σε δρύινα βαρέλια (αμερικάνικη, γαλλική δρυς) είναι το γαλλικό οξύ. Τα δείγματα που είχαν αποθηκευθεί στις δεξαμενές διαφοροποιούνται από τα υπόλοιπα λόγω της ακεταλδεΐδης. Όσα δείγματα είχαν αποθηκευθεί στα βαρέλια ακακίας διαφοροποιούνται από τα υπόλοιπα, λόγω των ενώσεων που προαναφέρθηκαν.





Εικόνα 3.13. Διάγραμμα OPLS-DA για τα δείγματα οίνου των λευκών ποικιλιών (A) και των ερυθρών ποικιλιών (B) που είχαν αποθηκευθεί σε διάφορους περιέκτες.

3.1.6 ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΙΝΟΥ ΤΟΥ Β ΤΡΥΓΟΥ (2013)

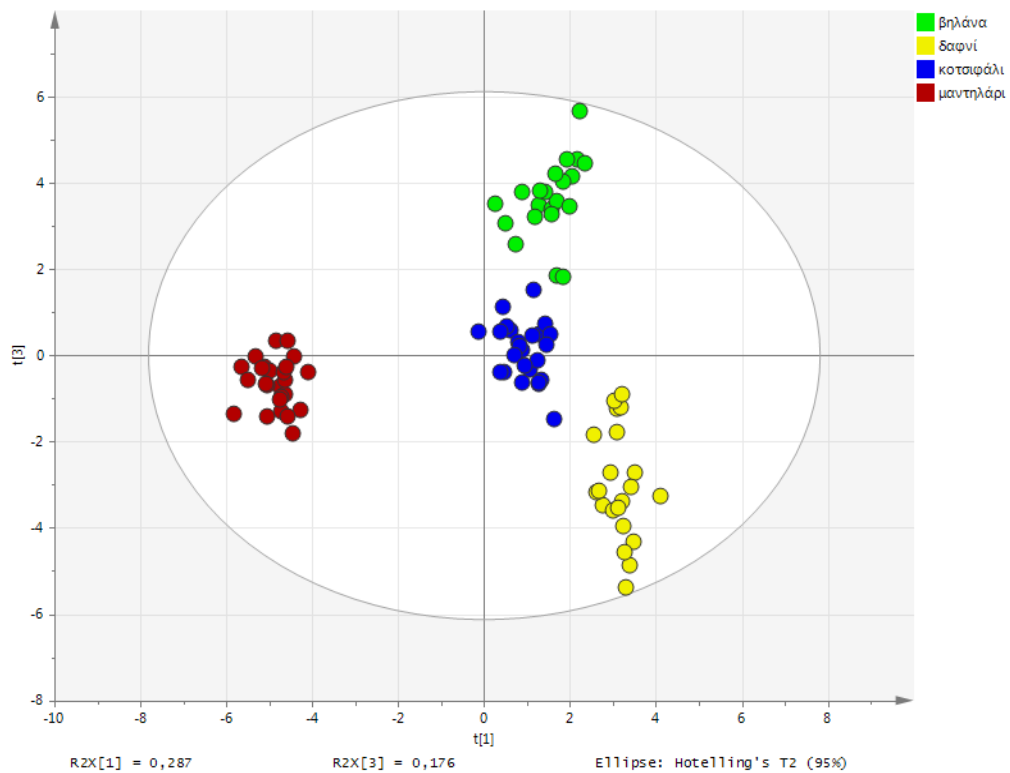
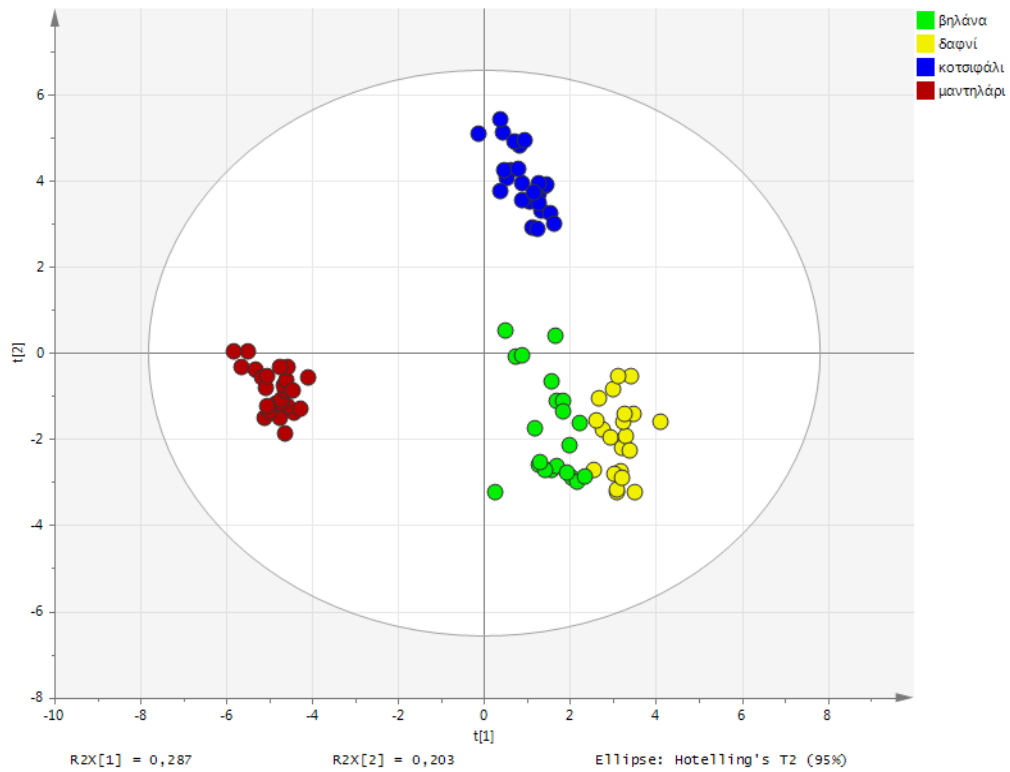
Ποικιλία

Πραγματοποιήθηκε ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) με το λογισμικό Simca στα δείγματα των λευκών και ερυθρών οίνων της δεύτερης χρονιάς τρύγου (2013) σε χρόνο μηδέν ($t=0$), μετά από 3, 6, 9 και 12 μήνες ωρίμανσης σε διάφορους περιέκτες, καθώς και μετά την παραμονή των οίνων σε φιάλες για 12 μήνες (μετά από ωρίμανση σε βαρέλι για διάστημα 3 και 6 μήνες). Ο αριθμός των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκε ήταν 92, ο αριθμός των μεταβολιτών 34 και ο αριθμός των κύριων αξόνων που υπολογίστηκαν ήταν 4.

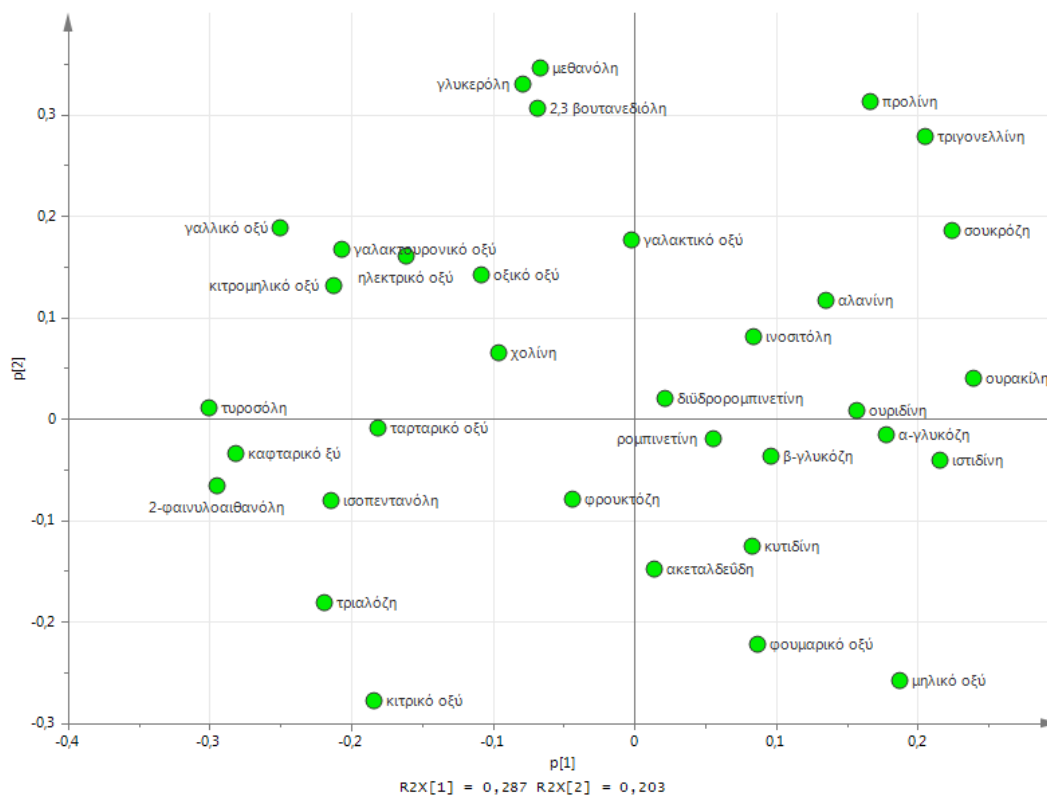
Στην εικόνα 3.14 παρουσιάζεται η ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) των μεταβολομικών δεδομένων NMR των οίνων που παράχθηκαν κατά τον Β' τρύγο (Σεπτέμβριος 2013) για τις τέσσερις κρητικές ποικιλίες (Μαντηλάρι, Κοτσιφάλι, Βηλιάνα, Δαφνί). Στο διάγραμμα PCA οι δύο πρώτοι κύριοι άξονες περιγράφουν το

49.0% της συνολικής διασποράς των μεταβλητών. Ο κύριος άξονας PC1 περιγράφει το 28.7% της διασποράς, ενώ ο δεύτερος κύριος άξονας PC2 περιγράφει το 20.3% της διασποράς. Ο χημειομετρικός διαχωρισμός των ερυθρών ποικιλιών είναι εξαιρετικός, ενώ η διαφοροποίηση μεταξύ των λευκών ποικιλιών είναι αρκετά καλύτερη κατά τον Β' τρύγο, σε σχέση με τον Α' τρύγο. Ο κύριος άξονας PC3 περιγράφει το 17.6% της διασποράς των μεταβλητών. Το μοντέλο ανάλυσης που προέκυψε από τα φασματικά δεδομένα περιγράφει το 76.3% της διασποράς των μεταβλητών και έχει καλή προβλεπτική ικανότητα Q^2 0.621.

Στην εικόνα 3.15 παρουσιάζεται το διάγραμμα βαρύτητας μεταβλητών (loadings), το οποίο δείχνει ποιές ενώσεις συνεισφέρουν περισσότερο στο μοντέλο PCA για την κάθε ποικιλία. Στα δείγματα της ποικιλίας Μαντηλάρι μεγαλύτερη συνεισφορά στην διαφοροποίηση της ποικιλίας είχαν οι ενώσεις γαλλικό οξύ, τυροσόλη, κιτρικό οξύ, τριαλόζη, κιτρομηλικό οξύ, ισοπεντανόλη, καφταρικό οξύ και 2-φαινυλο-αιθανόλη, σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της αντίστοιχης ανάλυσης στα δείγματα του Α' τρύγου. Στην ποικιλία Κοτσιφάλι οι ενώσεις που συνεισφέρουν περισσότερο στην διαφοροποίηση της ποικιλίας είναι η τριγονελλίνη, η γλυκερόλη, η μεθανόλη, η 2,3-βουτανεδιόλη και η προλίνη. Στα δείγματα των λευκών ποικιλιών, η Βηλάνα διαφοροποιήθηκε από τις υπόλοιπες ποικιλίες λόγω των αυξημένων συγκεντρώσεων του μηλικού οξέος, καθώς και της ένωσης κυτιδίνης που ταυτοποιήθηκε μόνο στα δείγματα της ποικιλίας Βηλάνα.



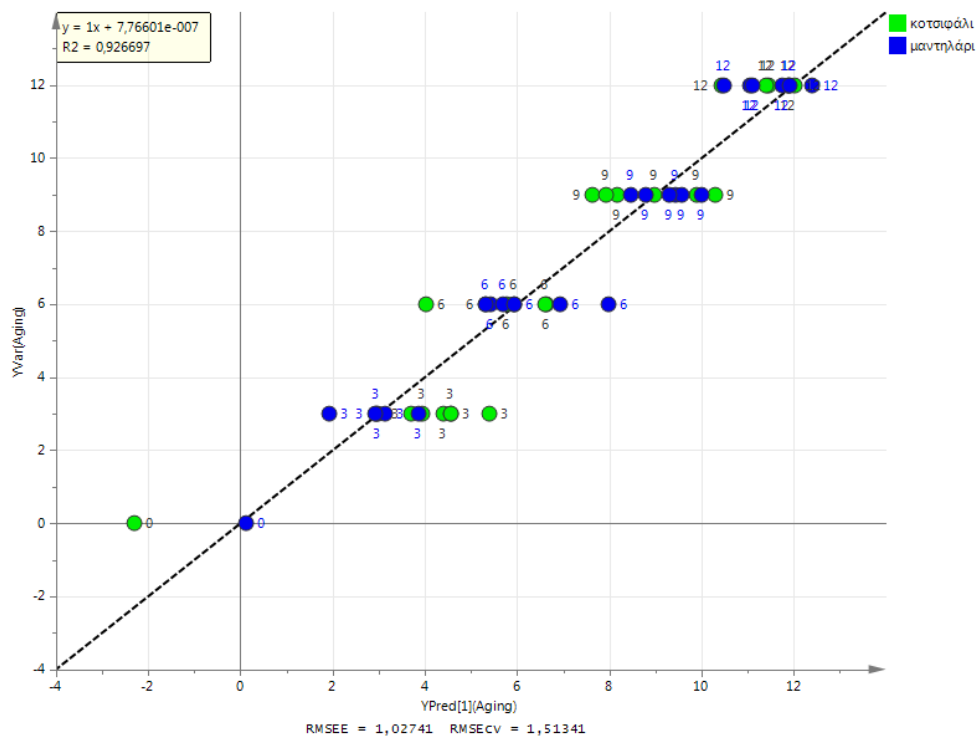
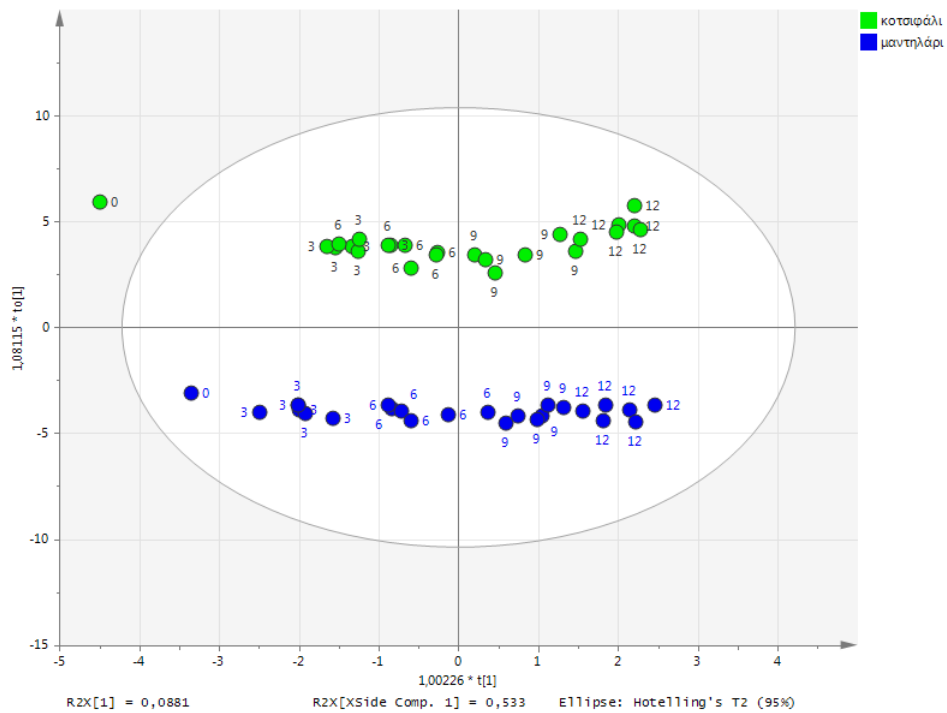
Εικόνα 3.14. Διάγραμμα ανάλυσης κύριων συνιστωσών (PCA) για τις τέσσερις κρητικές ποικιλίες οίνων του Β' τρύγου. συνιστώσες PC1 και PC2 πάνω, συνιστώσες PC1 και PC3 κάτω.



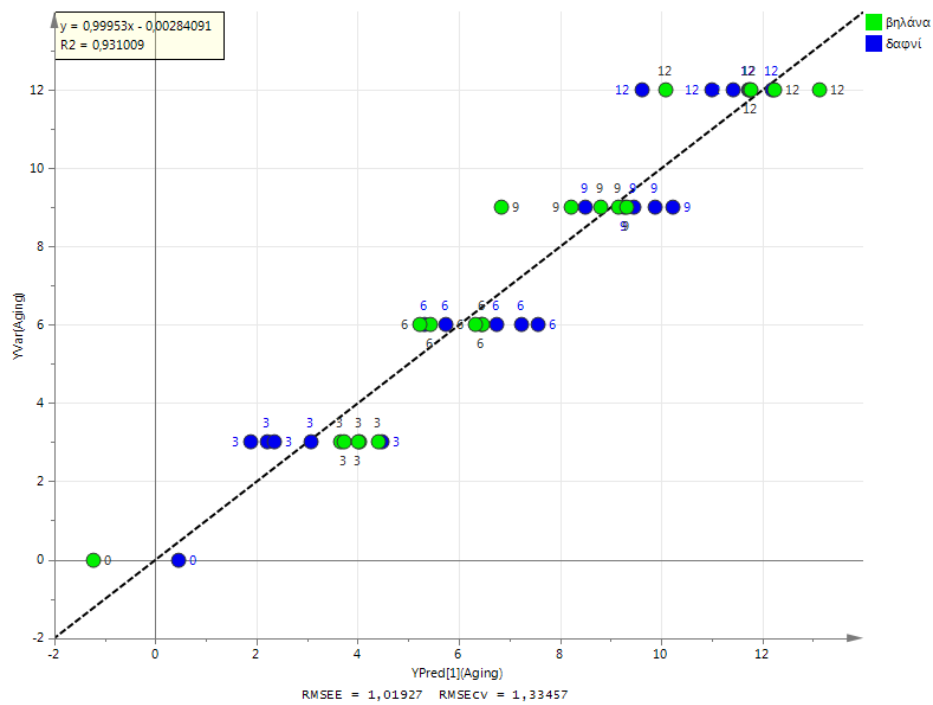
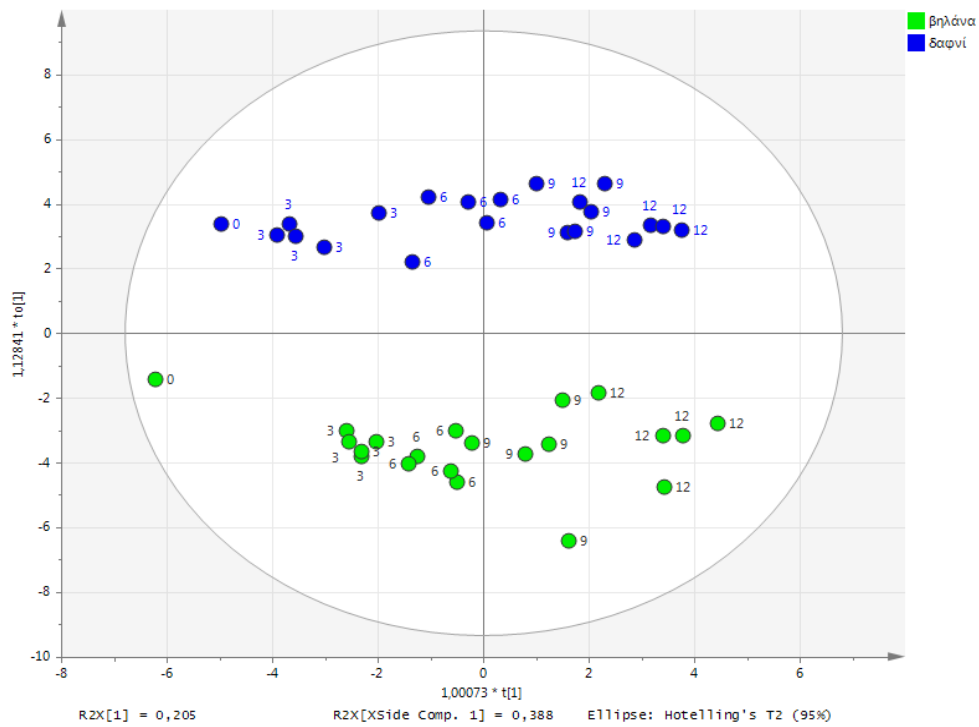
Εικόνα 3.15. Διάγραμμα βαρύτητας μεταβλητών (loadings) για τις τέσσερις κρητικές ποικιλίες (Μαντηλάρι, Κοτσιφάλι, Βηλάνα, Δαφνί) που αναλύθηκαν.

Χρόνος ωρίμανσης

Για την ανάλυση των δειγμάτων ως προς τον χρόνο ωρίμανσης χρησιμοποιήθηκε όπως και για τον A' τρύγο η μέθοδος των ορθογωνικών μερικών ελαχίστων τετραγώνων OPLS. Στις εικόνες 3.16 και 3.17 παρουσιάζονται αντίστοιχα τα διαγράμματα OPLS των ερυθρών ποικιλιών, Μαντηλάρι και Κοτσιφάλι και των λευκών ποικιλιών, Βηλάνα και Δαφνί, σύμφωνα με τον χρόνο ωρίμανσης. Όπως και στην ανάλυση του A' τρύγου, στα διαγράμματα OPLS παρατηρείται διαφοροποίηση ως προς τον χρόνο ωρίμανσης (t_1 , άξονας x), αλλά και μεταξύ των ποικιλιών στον ορθογωνικό παράγοντα to_1 (άξονας y). Η προβλεπτική ικανότητα Q^2 του μοντέλου OPLS για τους ερυθρούς οίνους είναι ίση με 0.823, ενώ για τους λευκούς είναι 0.866, δείχνοντας ότι το μεταβολικό προφίλ NMR των οίνων μπορεί να χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για τον προσδιορισμό του χρόνου ωρίμανσης των ποικιλιών που μελετήθηκαν.



Εικόνα 3.16. Διαγράμματα OPLS t1/to1 (πάνω) και προβλεφθέντος χρόνου ωρίμανσης (κάτω) για τις δύο ερυθρές (Μαντηλάρι, Κοτσιφάλι) κρητικές ποικιλίες οίνου κατά τον δεύτερο τρύγο (2013) από την ανάλυση του NMR μεταβολικού προφίλ.

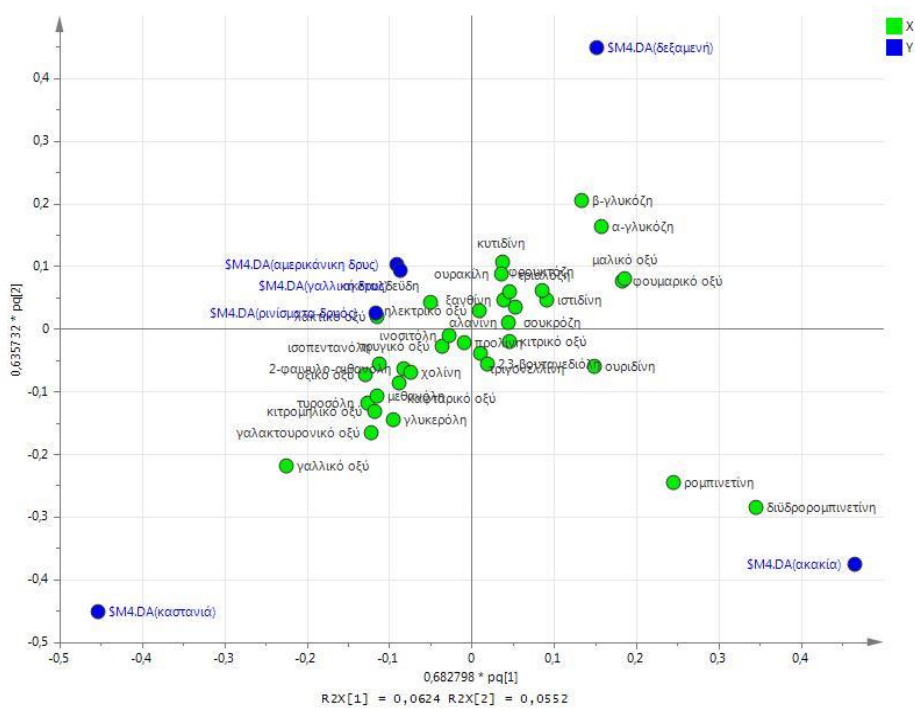
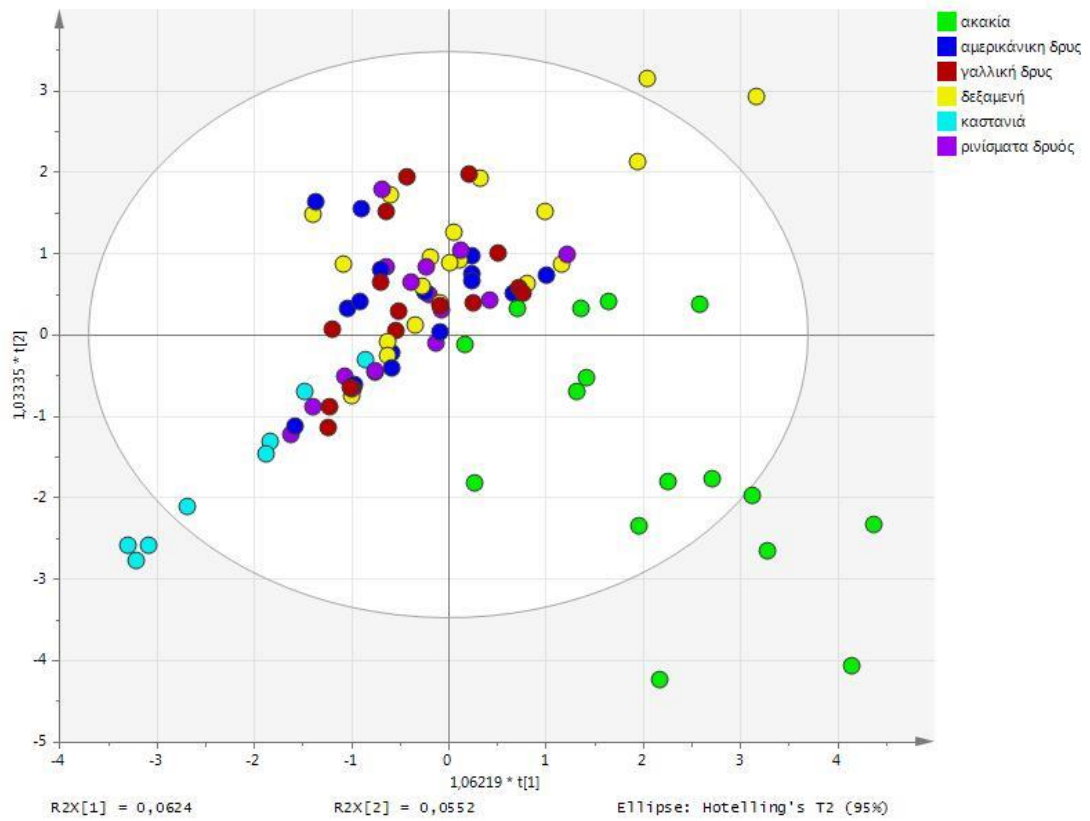


Εικόνα 3.17 Διαγράμματα OPLS t1/to1 (πάνω) και προβλεφθέντος χρόνου ωρίμανσης (κάτω) για τις δύο λευκές (Βηλάνα, Δαφνί) κρητικές ποικιλίες οίνου κατά τον δεύτερο τρύγο (2013) από την ανάλυση του NMR μεταβολικού προφίλ.

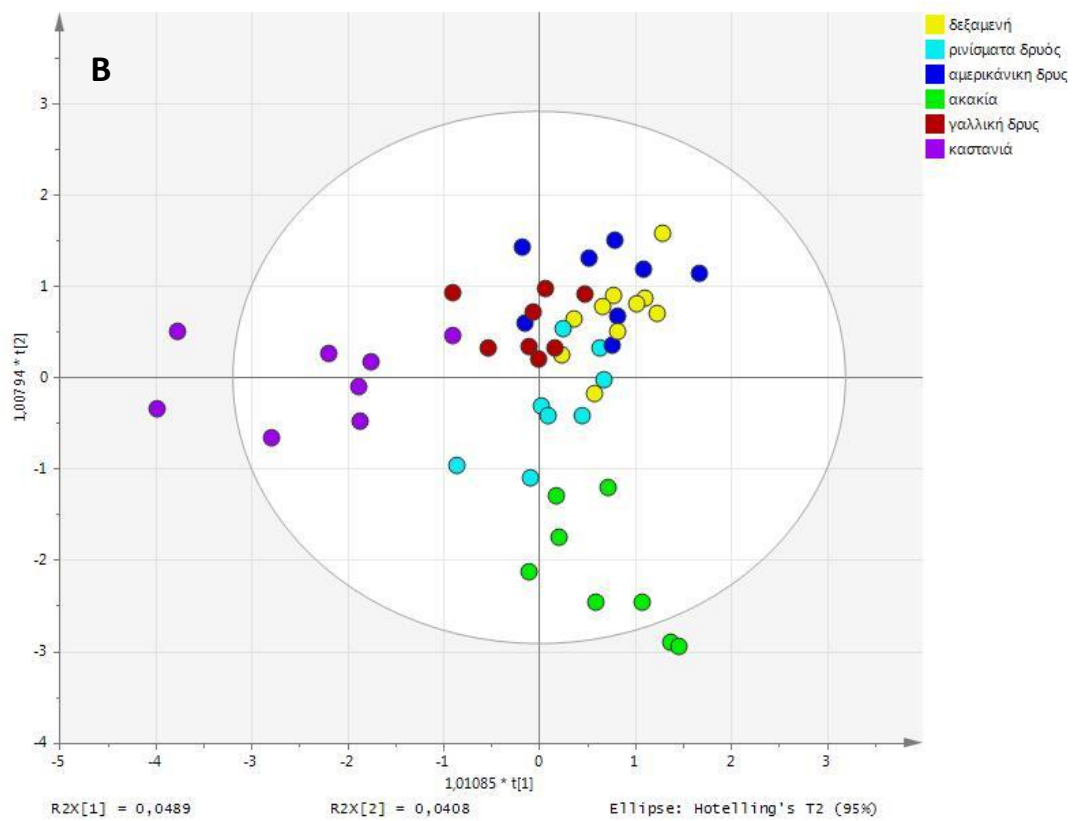
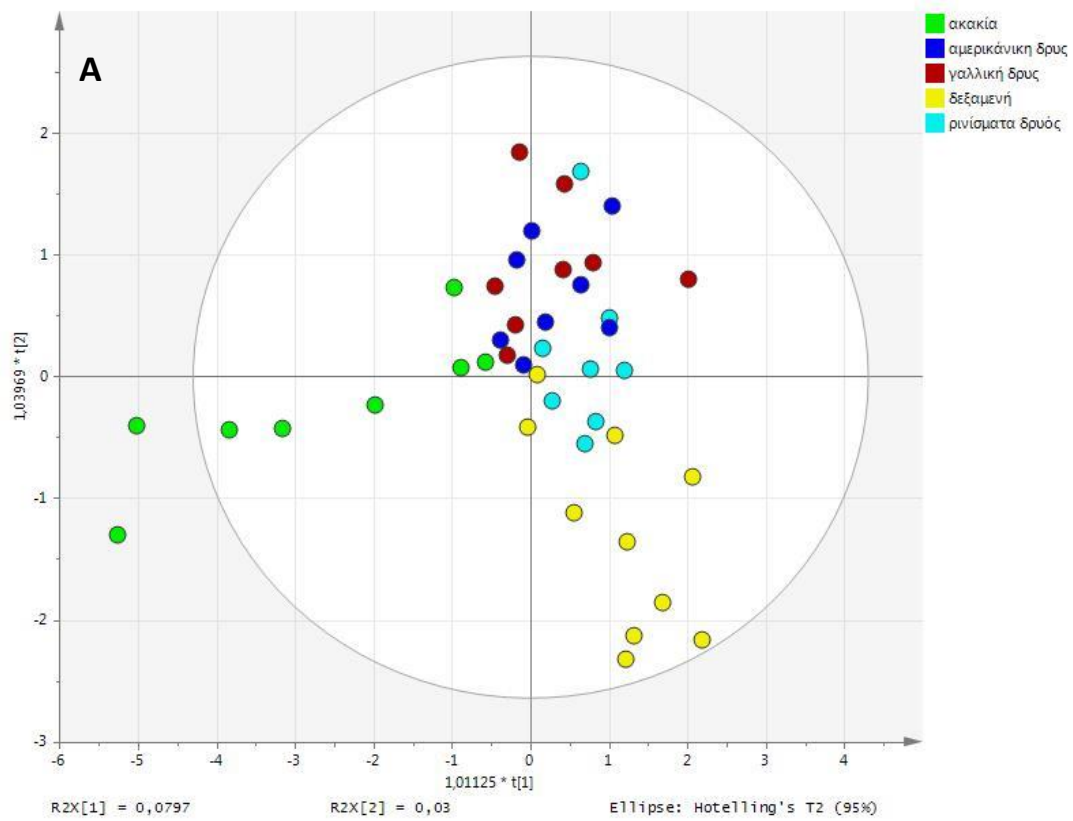
Τύπος περιέκτη

Για την ανάλυση των δειγμάτων οίνου που είχαν αποθηκευθεί σε διάφορους περιέκτες χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση μερικών ορθογωνικών ελαχίστων τετραγώνων (OPLS-DA). Στην εικόνα 3.18 παρουσιάζεται το διάγραμμα OPLS-DA για τα δείγματα που είχαν αποθηκευθεί σε δεξαμενές και ξύλινα βαρέλια. Όπως και στα δείγματα της πρώτης χρονιάς τρύγου από το διάγραμμα παρατηρείται ότι και τα δείγματα της δεύτερης χρονιάς τρύγου που είχαν αποθηκευθεί σε βαρέλια ακακίας διαφοροποιούνται από τα υπόλοιπα, καθώς και τα δείγματα που είχαν αποθηκευθεί σε βαρέλια καστανιάς, κυρίως λόγω της αυξημένης συγκέντρωσης του γαλλικού οξέος στα δείγματα οίνου.

Έπειτα μελετήθηκε ο τύπος των ποικιλιών ξεχωριστά (ερυθρές, λευκές) για να βρεθούν οι πιθανές διαφοροποιήσεις μεταξύ των άλλων περιεκτών. Στην εικόνα 3.19 παρουσιάζεται το διάγραμμα OPLS-DA για όλα τα δείγματα οίνου των ερυθρών και λευκών ποικιλιών. Όπως παρατηρείται και από τα διαγράμματα, υπάρχει ομαδοποίηση μεταξύ των δειγμάτων που είχαν αποθηκευθεί σε δρύινα βαρέλια (αμερικάνικη, γαλλική δρυς) και στα δείγματα που είχαν αποθηκευθεί στις δεξαμενές (ίνοχ, ρινίσματα δρυός). Τα δείγματα που είχαν αποθηκευθεί στα βαρέλια ακακίας και καστανιάς διαφοροποιούνται από τα υπόλοιπα όπως και στα δείγματα του Α τρύγου, λόγω των ενώσεων διϋδρορομπινετίνη και ρομπινετίνη για τα βαρέλια ακακίας και λόγω του γαλλικού οξέος για τα βαρέλια καστανιάς. Η ένωση που συνεισφέρει περισσότερο στην ομαδοποίηση των δειγμάτων των λευκών ποικιλιών που είχαν αποθηκευθεί σε δρύινα βαρέλια (αμερικάνικη, γαλλική δρυς) είναι το γαλλικό οξύ. Τα δείγματα που είχαν αποθηκευθεί στις δεξαμενές διαφοροποιούνται από τα υπόλοιπα λόγω της ακεταλδεΐδης, η οποία προέρχεται από την οξείδωση της αιθανόλης, όπως αναφέρθηκε και στα δείγματα του πρώτου τρύγου. Στα δείγματα των ερυθρών ποικιλιών διαφοροποιούνται όσα είχαν αποθηκευθεί σε βαρέλια καστανιάς και ακακίας, όπως και στην περίπτωση του Α' τρύγου.



Εικόνα 3.18. Διάγραμμα OPLS-DA για τα δείγματα οίνου που είχαν αποθηκευθεί σε δεξαμενές και ξύλινα βαρέλια (καστανιά, δρυς, ακακία) και το διάγραμμα βαρύτητας μεταβλητών (loadings).



Εικόνα 3.19. Διάγραμμα OPLS-DA για τα δείγματα οίνου των λευκών ποικιλιών (A) και των ερυθρών ποικιλιών (B) που είχαν αποθηκευθεί σε διάφορους περιέκτες.

3.1.7 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΙΝΟΥ ΠΟΥ ΑΝΑΛΥΘΗΚΑΝ ΓΙΑ ΤΟΥΣ 2 ΤΡΥΓΗΤΟΥΣ (2012, 2013)

Από τη σύγκριση του NMR μεταβολικού προφίλ των δειγμάτων οίνου που μελετήθηκαν για τις δύο συνεχόμενες χρονιές τρυγητού (2012, 2013) προκύπτουν αρκετά ενδιαφέροντα συμπεράσματα, που δίνονται ακολούθως.

Η διϋδρορομπινετίνη και η ρομπινετίνη, ενώσεις που προέρχονται από το ξύλο και οφείλονται στην αποθήκευση των οίνων σε βαρέλια ακακίας εμφανίζουν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στα δείγματα του πρώτου τρύγου (2012) σε σχέση με το δεύτερο τρύγο, όπως παρουσιάστηκε αναλυτικά στην παράγραφο 3.1.3 Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα βαρέλια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα ίδια και για τις δύο χρονιές, επομένως τη δεύτερη χρονιά μεταφέρθηκε μικρότερη ποσότητα αυτών των ενώσεων στους οίνους από το ξύλο του βαρελιού, το οποίο είχε μερικώς εξαντληθεί.

Στην ποικιλία Δαφνί δεν ανιχνεύθηκε το καφταρικό οξύ στον πρώτο χρόνο τρυγητού, ενώ την δεύτερη χρονιά αυξημένες ήταν οι συγκεντρώσεις στις ενώσεις: σουκρόζη, ουρακίλη, ηλεκτρικό οξύ, τυροσόλη, ακεταλδεΐδη, τριγονελλίνη και λακτικό οξύ. Την δεύτερη χρονιά το μηλικό οξύ μετατράπηκε πιο γρήγορα σε λακτικό οξύ συγκριτικά με τον πρώτο τρύγο.

Στην ποικιλία Βηλάννα, την δεύτερη χρονιά τρυγητού, αυξημένες ήταν οι συγκεντρώσεις του ηλεκτρικού οξέος, της γλυκερόλης, του καφταρικού οξέος, της τυροσόλης, της ουρακίλης, της φρουκτόζης, της χολίνης, της ακεταλδεΐδης και του γαλακτουρονικού οξέος.

Στην ποικιλία Κοτσιφάλι, την δεύτερη χρονιά τρυγητού, αυξημένες ήταν οι συγκεντρώσεις του ηλεκτρικού οξέος, της γλυκερόλης, του καφταρικού οξέος, της προλίνης, της ουρακίλης, του τρυγικού οξέος, της ουριδίνης, της χολίνης και της ακεταλδεΐδης.

Στην ποικιλία Μαντηλάρι, την δεύτερη χρονιά τρυγητού, αυξημένες ήταν οι συγκεντρώσεις του καφταρικού οξέος, της προλίνης, της ουρακίλης, της φρουκτόζης, της αλανίνης και του λακτικού οξέος. Η ένωση προλίνη δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα δείγμα της ποικιλίας Μαντηλάρι την πρώτη χρονιά τρυγητού.

Το καφταρικό οξύ υπάρχει σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε όλα τα δείγματα οίνου που αναλύθηκαν την δεύτερη χρονιά τρυγητού (2013), και προκύπτει από την

εστεροποίηση του καφεϊκού οξέος με το τρυγικό οξύ. Η διαφορά στις συγκεντρώσεις του καφταρικού οξέος μεταξύ των δύο τρύγων πιθανότατα να οφείλεται στην συνεχή εξέλιξη της σύστασης του οίνου και των πολλαπλών αντιδράσεων που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της παραγωγής και αποθήκευσης του στους διάφορους περιέκτες. Επιπλέον έχει παρατηρηθεί ότι όταν είναι αυξημένες οι συγκεντρώσεις των εστεροποιημένων οξέων (καφταρικό οξύ), οι συγκεντρώσεις των ελεύθερων οξέων (π.χ. καφεϊκό οξύ) είναι μειωμένες και το αντίστροφο.⁶⁵ Έχει αναφερθεί ότι η αυξημένη συγκέντρωση του καφταρικού οξέος και η χαμηλή συγκέντρωση του καφεϊκού οξέος στους οίνους οφείλεται στις χαμηλές θερμοκρασίες της ζύμωσης και την προσθήκη ενζύμων που ενισχύουν το χρώμα τους.⁶⁶

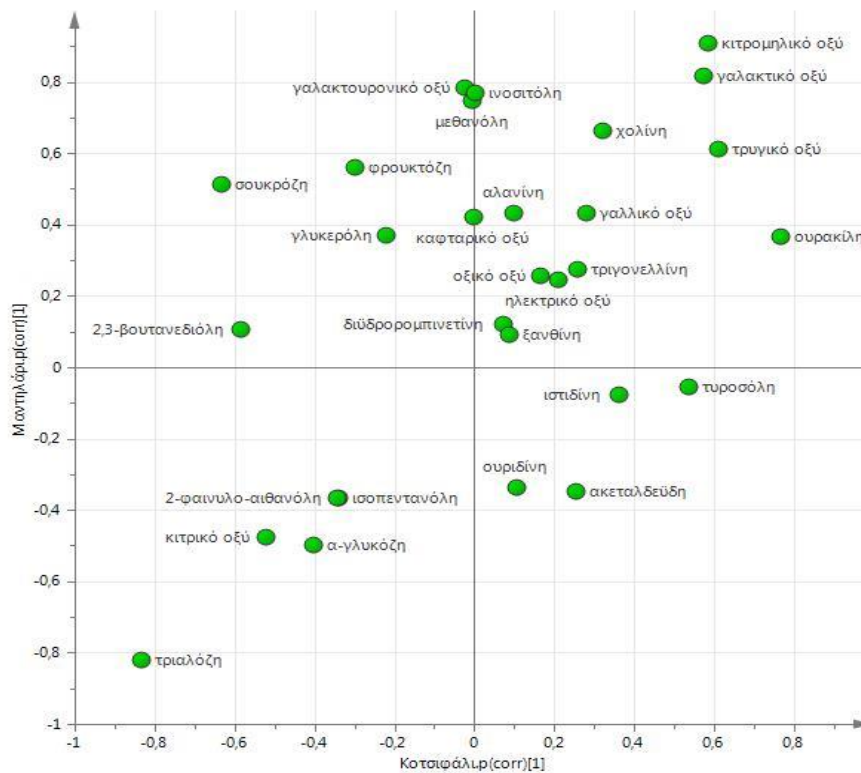
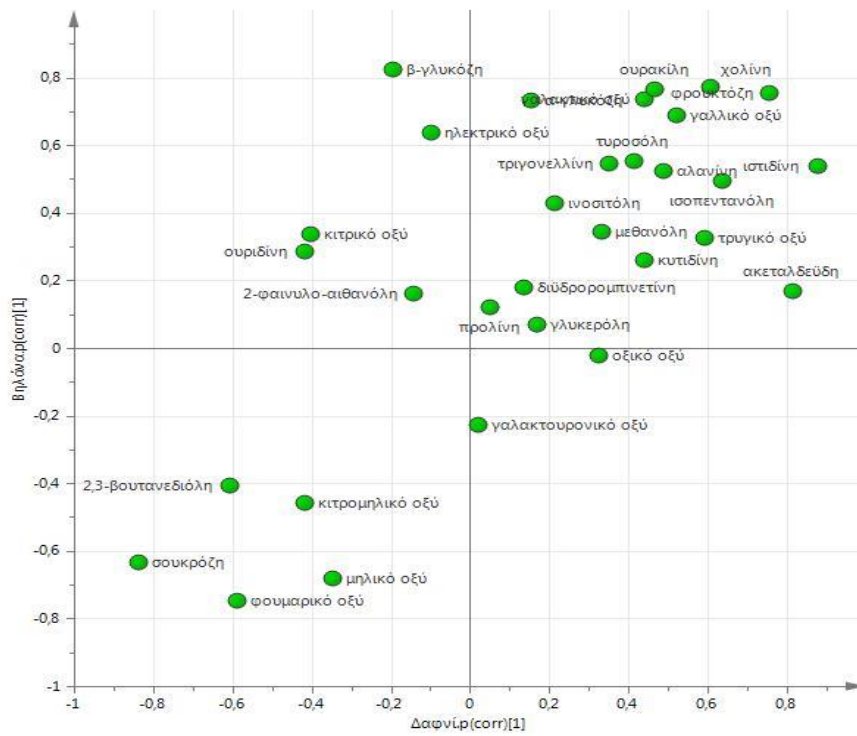
Επιπλέον το αμινοξύ προλίνη βρέθηκε σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα περισσότερα δείγματα οίνου που αναλύθηκαν. Έχει αναφερθεί σε άλλες μελέτες⁶⁷ ότι η συγκέντρωση της προλίνης στους οίνους εξαρτάται από τις κλιματικές συνθήκες που επικρατούν στον αμπελώνα, αλλά και από την ποικιλία του σταφυλιού. Οι αυξημένες συγκεντρώσεις της προλίνης στον οίνο σχετίζονται με ξηρό και ζεστό κλίμα. Στα δείγματα οίνου που αναλύθηκαν βρέθηκε η προλίνη σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στον πρώτο τρύγο για τους λευκούς οίνους και σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στον δεύτερο τρύγο για τους ερυθρούς. Συγκεκριμένα στην ποικιλία Μαντηλάρι δεν βρέθηκε προλίνη στα δείγματα του πρώτου τρύγου, ενώ στα δείγματα του δεύτερου τρύγου υπήρχε σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις συγκριτικά με τις άλλες ποικιλίες.

Ακόμη μία ένωση που παρουσιάζει διαφορές μεταξύ των δύο τρύγων είναι το μηλικό οξύ. Οι παράγοντες που καθορίζουν την περιεκτικότητα των οίνων σε μηλικό οξύ είναι η ποικιλία της αμπέλου και οι καιρικές συνθήκες που επικρατούν κατά την ωρίμανση. Υπάρχουν ποικιλίες αμπέλου που είναι πλούσιες σε μηλικό οξύ, ενώ άλλες που καλλιεργούνται στους ίδιους αμπελώνες με τις ίδιες κλιματολογικές συνθήκες είναι φτωχές. Κατά την ωρίμανση το μηλικό οξύ ελαττώνεται πολύ και ειδικά λόγω των υψηλών θερμοκρασιών του καλοκαιριού. Στα δείγματα οίνου που αναλύθηκαν το μηλικό οξύ δεν βρέθηκε στην ποικιλία Κοτσιφάλι και στους δύο τρυγητούς, ενώ στην ποικιλία Μαντηλάρι βρέθηκε μόνο στα δείγματα του πρώτου τρύγου. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στις μεγαλύτερες θερμοκρασίες που επικράτησαν στον αμπελώνα την δεύτερη χρονιά. Επιπλέον το μηλικό οξύ μετατρέπεται σε λακτικό οξύ και διοξειδίο του άνθρακα μέσω της μηλογαλακτικής ζύμωσης, που είναι ένας βιολογικός τρόπος μείωσης της οξύτητας, έτσι ώστε στον οίνο να παραμένει ελάχιστη ποσότητα μηλικού

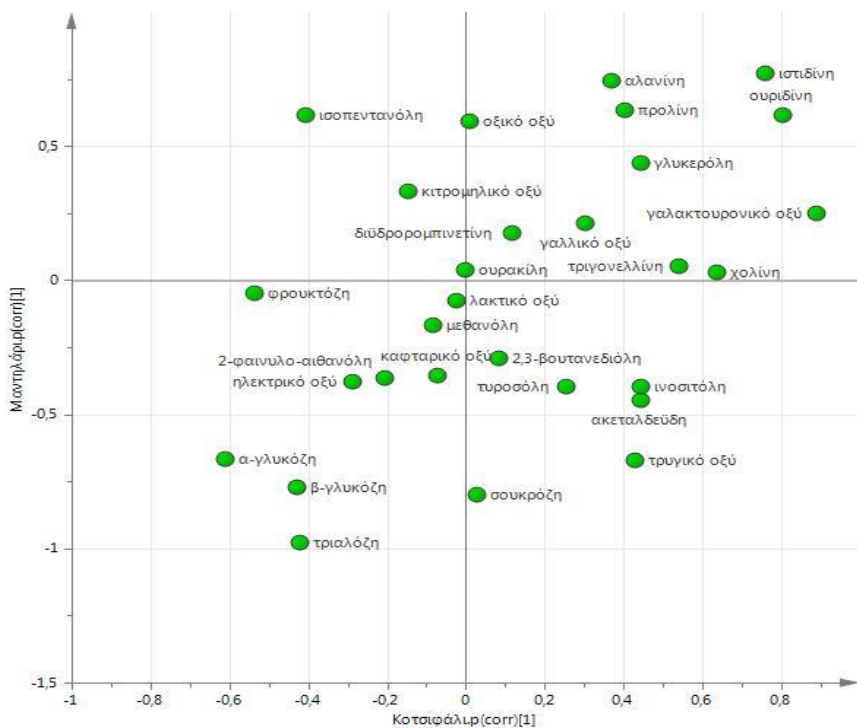
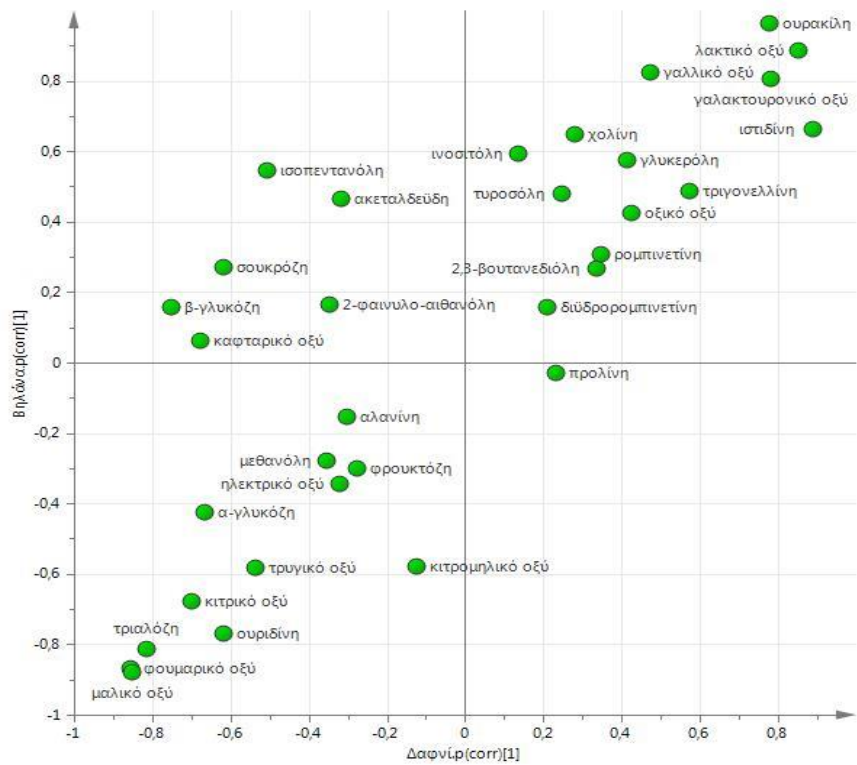
οξέος ή και καθόλου.²⁹ Έχει αναφερθεί σε άλλη μελέτη⁶⁸ ότι κατά την μηλογαλακτική ζύμωση αυξάνονται οι συγκεντρώσεις ορισμένων μεταβολιτών εκτός του λακτικού οξέος, όπως της ουρακίλης και της αλανίνης και μειώνονται οι μονοσακχαρίτες, η γλυκερόλη, το μηλικό και το κιτρικό οξύ.

Επιπλέον έγινε συσχέτιση των μεταβολιτών για τις λευκές και ερυθρές ποικιλίες με τον χρόνο ωρίμανσης και για τις δύο χρονιές τρυγητού ξεχωριστά για κάθε ποικιλία, ώστε να αναδειχθούν πιθανές διαφορές στην ωρίμανση. Στις εικόνες 3.20 και 3.21 παρουσιάζονται τα διαγράμματα SUS-plots (Shared and Unique Structure) και οι μεταβολίτες που συνεισφέρουν θετικά και αρνητικά στον χρόνο ωρίμανσης. Μεταβολίτες που συνδέονται θετικά (αυξάνεται η συγκέντρωσή τους) με την ωρίμανση βρίσκονται στο άνω δεξιά τεταρτημόριο, ενώ όσοι συνδέονται αρνητικά στο κάτω αριστερά τεταρτημόριο κάθε διαγράμματος SUS. Οι μεταβολίτες στα άλλα δύο τεταρτημόρια εμφανίζουν διαφορετική συμπεριφορά για κάθε οίνο του ίδιου τύπου (λευκό ή ερυθρό). Στον Α' τρύγο οι περισσότεροι μεταβολίτες έχουν θετική συσχέτιση με το χρόνο γήρανσης και στους λευκούς και στους ερυθρούς οίνους, ενώ η 2,3-βουτανοδιόλη, η τριαλόζη και τα οργανικά οξέα κιτρικό, φουμαρικό και μηλικό έχουν αρνητική συσχέτιση. Εμφανίζονται διαφορές στην ωρίμανση των λευκών και ερυθρών οίνων, με την α-γλυκόζη και την ισοπεντανόλη να αυξάνονται με την ωρίμανση στα λευκά κρασιά και να μειώνονται στα ερυθρά, ενώ το κιτρομηλικό οξύ αυξάνεται με την ωρίμανση στα ερυθρά κρασιά, αλλά μειώνεται στα λευκά. Επίσης εμφανίζονται διαφορές στη συγκέντρωση ορισμένων μεταβολιτών που είναι αποκλειστικές για μία ποικιλία, όπως για παράδειγμα στους ερυθρούς οίνους, όπου η γλυκερόλη αυξάνεται με τη γήρανση στο Μαντηλάρι, αλλά ελαττώνονται στην ερυθρή ποικιλία Κοτσιφάλι. Στον Β' τρύγο οι μεταβολίτες που εμφανίζουν αρνητική συσχέτιση με τη γήρανση είναι τα οργανικά οξέα φουμαρικό, μηλικό, κιτρικό και τα σάκχαρα α-, β-γλυκόζη και τριαλόζη.

Ο ενώσεις των λευκών ποικιλιών που εμφανίζουν θετική συσχέτιση με τη γήρανση και στους 2 τρυγητούς είναι η ουρακίλη, το γαλακτικό οξύ, η χολίνη και η διϋδρορομπινετίνη, ενώ για τις ερυθρές ποικιλίες είναι το γαλλικό οξύ, η τριγονελλίνη και η αλανίνη.



Εικόνα 3.20. Διαγράμματα SUS-plot τα δείγματα οίνου των λευκών (Δαφνί, Βηλάνα) και των ερυθρών (Κοτσιφάλι, Μανηλάρι) ποικιλιών για τον πρώτο τρύγο (2012).



Εικόνα 3.21. Διαγράμματα SUS-plot τα δείγματα οίνου των λευκών (Δαφνί, Βηλάνα) και των ερυθρών (Κοτσιφάλι, Μαντηλάρι) ποικιλιών για τον δεύτερο τρύγο (2013).

Η συσχέτιση των δεδομένων του Α' τρύγου με αυτά του Β' τρύγου, όπου επαναλήφθηκαν όλες οι μετρήσεις για ωρίμανση σε όλους τους περιέκτες μέχρι 12

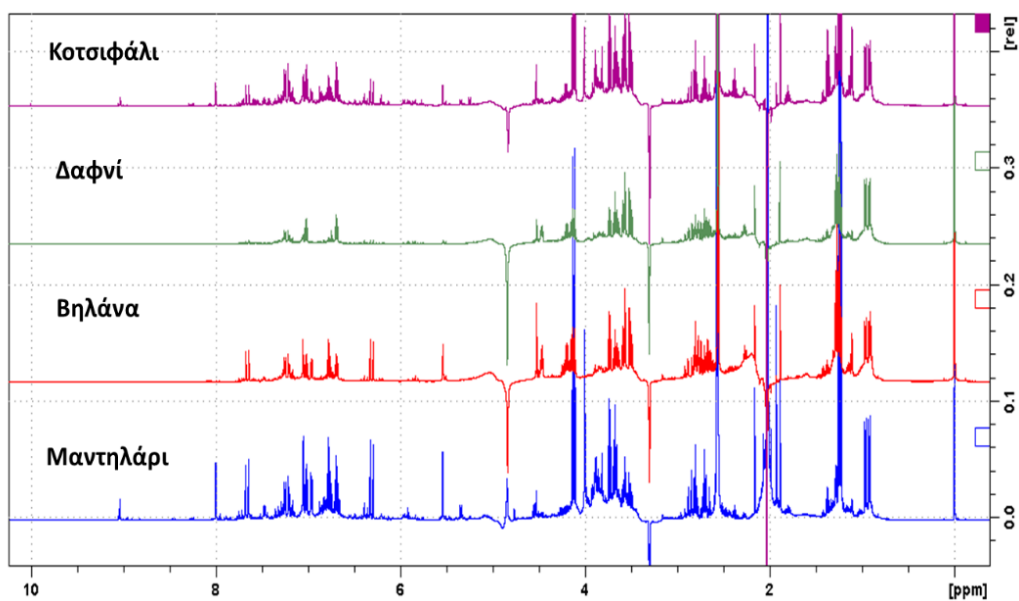
μήνες, έδειξε ότι οι μεταβολίτες που εμφανίζουν την σταθερότερη συμπεριφορά για διαδοχικές οινοποιητικές περιόδους είναι η τριαλόζη, τα οργανικά οξέα φουμαρικό και μηλικό, η 2,3-βουτανοδιόλη (η οποία εμφανίζει αύξηση της συγκέντρωσης μετά τους 9 μήνες ωρίμανσης), και το κιτρικό οξύ (ισχυρή ελάττωση συγκέντρωσης μετά τους 6 μήνες ωρίμανσης). Κατά τον Β' τρύγο η σουκρόζη, η α-γλυκόζη και η ισοπεντανόλη μειωνόταν συναρτήσει του χρόνου ωρίμανσης τόσο στους ερυθρούς, όσο και στους λευκούς οίνους, ενώ η γλυκερόλη αυξάνεται για όλους τους τύπους και ποικιλίες οίνων με το χρόνο ωρίμανσης σε περιέκτες.

3.2 ΜΕΛΕΤΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΙΝΟΥ ΜΕ ΤΗΝ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ¹H NMR ΣΕ ΔΙΑΛΥΤΗ ΔΕΥΤΕΡΙΩΜΕΝΗ ΜΕΘΑΝΟΛΗ

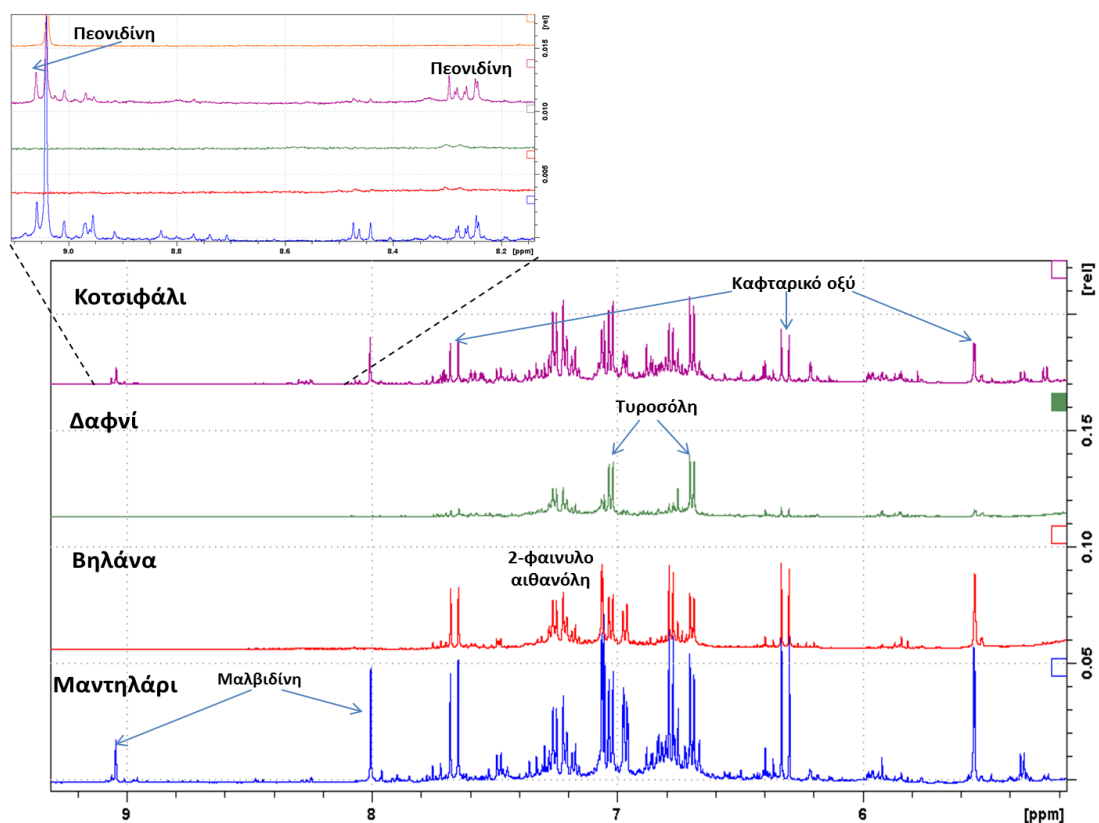
3.2.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΤΟΥ ΟΙΝΟΥ ΣΤΑ ΦΑΣΜΑΤΑ ¹H NMR

Για την μελέτη των πολυφαινολών του οίνου χρησιμοποιήθηκε η εκχύλιση στερεάς φάσης προκειμένου να γίνει ο διαχωρισμός του υδατικού και του οργανικού κλάσματος του οίνου (δείτε Πειραματικό Μέρος). Τα οργανικά οξέα, τα αμινοξέα και τα σάκχαρα συγκεντρώνονται στο πρώτο κλάσμα, ενώ στο δεύτερο συγκεντρώνονται οι πολυφαινόλες του οίνου. Στο φάσμα ¹H NMR του οργανικού κλάσματος απουσιάζουν οι κορυφές των μικρών οργανικών ενώσεων, με αποτέλεσμα να υπάρχει καλύτερη διάκριση των κορυφών στην αρωματική περιοχή του φάσματος για να γίνει η ταυτοποίηση των πολυφαινολών του οίνου.

Ο προσδιορισμός των πολυφαινολών του οίνου πραγματοποιήθηκε με την ανάθεση των κορυφών στα φάσματα ¹H NMR. Στην εικόνα 3.22 παρουσιάζονται τα φάσματα των δειγμάτων οίνου των τεσσάρων ποικιλιών που αναλύθηκαν σε χρόνο μηδέν. Στην εικόνα 3.23 παρουσιάζεται η αρωματική περιοχή των φασμάτων και ορισμένες από τις φαινολικές ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν σε κάθε δείγμα. Όπως φαίνεται και από τα φάσματα ¹H NMR, η λευκή ποικιλία Δαφνί έχει τις λιγότερες φαινολικές ενώσεις στην αρωματική περιοχή του φάσματος, ενώ η ερυθρή ποικιλία Μαντηλάρι έχει τις περισσότερες. Οι φαινολικές ενώσεις προέρχονται από τα στερεά μέρη του σταφυλιού γι' αυτό και βρίσκονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις κυρίως στους ερυθρούς οίνους.



Εικόνα 3.22. Φάσμα ^1H NMR του δεύτερου (φαινολικού) SPE κλάσματος των δειγμάτων οίνου Μαντηλάρι, Κοτσιφάλι, Δαφνί, Βηλάνα σε διαλύτη δευτεριωμένη μεθανόλη.

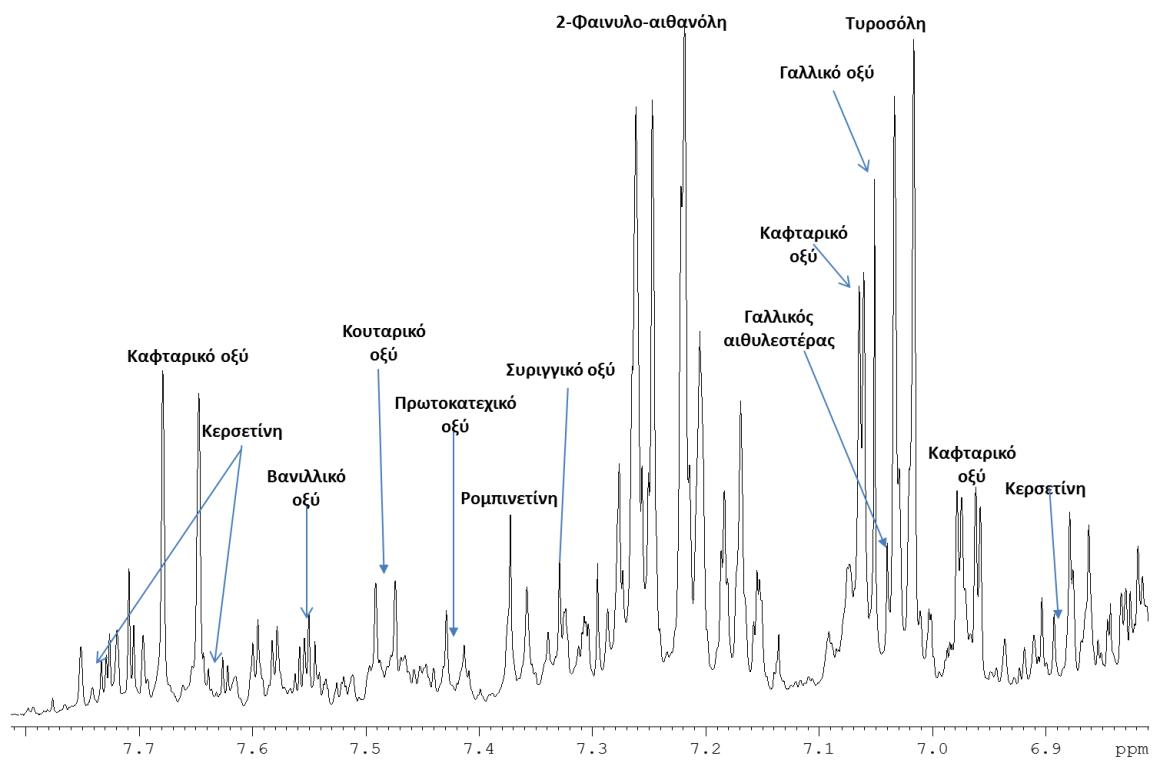
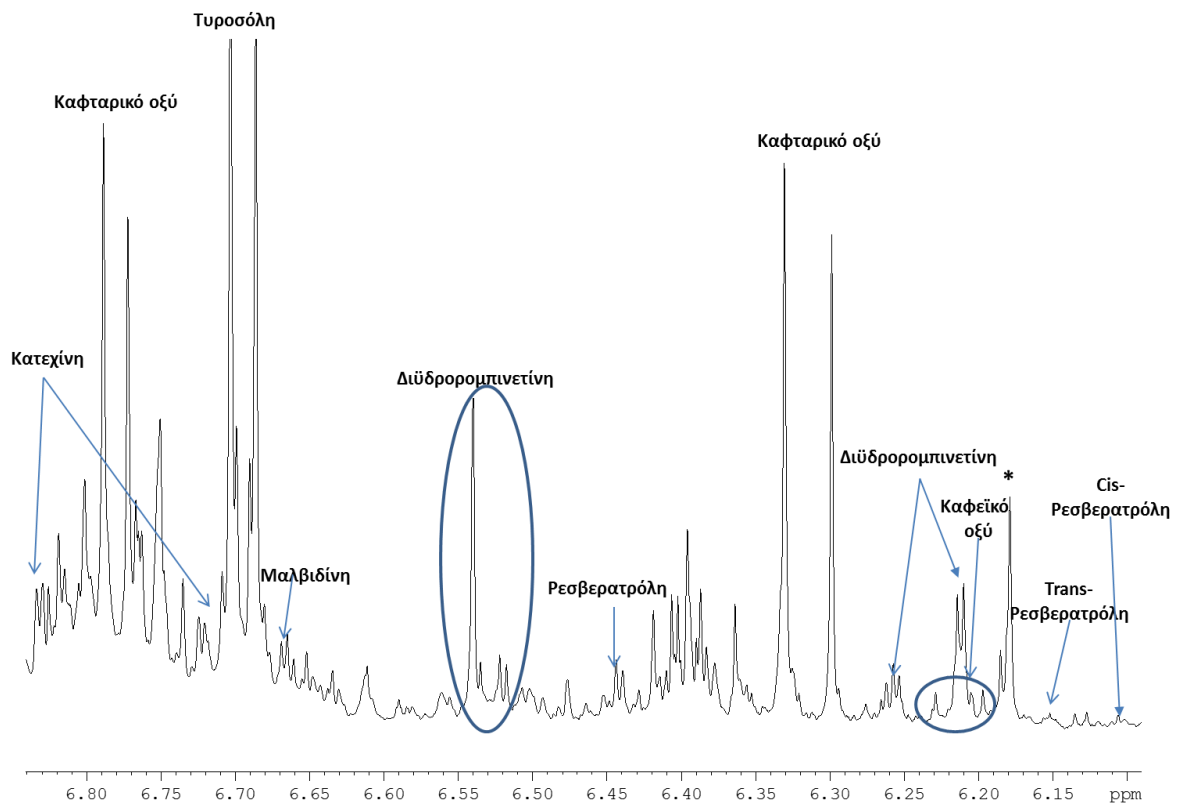


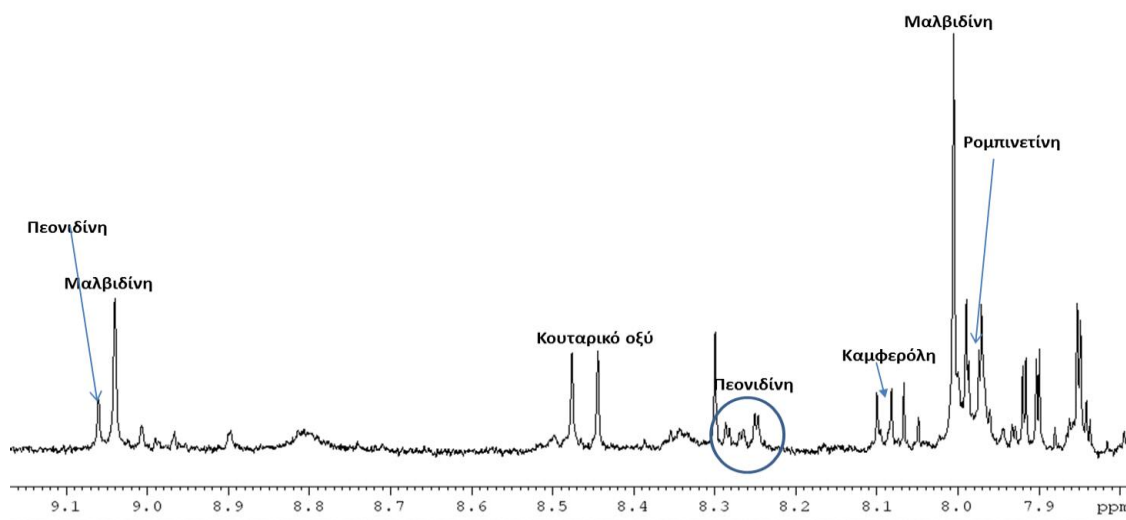
Εικόνα 3.23. Αρωματική περιοχή των φασμάτων ^1H NMR του φαινολικού κλάσματος των δειγμάτων οίνου Μαντηλάρι, Κοτσιφάλι, Δαφνί, Βηλάνα και οι ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν σε διαλύτη δευτεριωμένη μεθανόλη.

Στα δείγματα που είχαν αποθηκευθεί σε βαρέλια ακακίας ταυτοποιήθηκαν επιπλέον οι φαινολικές ενώσεις διϋδρορομπινετίνη και ρομπινετίνη. Έγινε πλήρης ανάθεση των συγκεκριμένων κορυφών στα μονοδιάστατα φάσματα ^1H NMR, με τη βοήθεια της δισδιάστατης φασματοσκοπίας NMR και της λήψης των φασμάτων NMR των πρότυπων ενώσεων. Επιπλέον σε όλα τα δείγματα οίνου που είχαν αποθηκευθεί σε βαρέλια ακακίας εμφανίζεται μία απλή κορυφή στα 6.18 ppm στα φάσματα ^1H NMR, η οποία δεν στάθηκε δυνατό να ταυτοποιηθεί σε ποια φαινολική ένωση αντιστοιχεί. Στα μονοδιάστατα φάσματα ^1H NMR παρουσιάζεται αυξημένη η ένταση των κορυφών του γαλλικού οξέος και του γαλλικού αιθυλεστέρα σε όσα δείγματα οίνου είχαν αποθηκευθεί σε βαρέλια καστανιάς.

Επιπλέον έχουν αναφερθεί διαφορές στις συγκεντρώσεις αυτών των ενώσεων ανάλογα με το κάψιμο του ξύλου των βαρελιών. Στην περίπτωση της ακακίας μεγαλύτερες συγκεντρώσεις της διϋδρορομπινετίνης παρουσιάζονται σε ξύλο ακακίας που δεν είναι καμένο, ενώ όταν είναι καμένο μεγαλύτερες συγκεντρώσεις παρουσιάζει η ρομπινετίνη. Στην περίπτωση της καστανιάς έχει αναφερθεί ότι αυξημένες είναι οι συγκεντρώσεις του γαλλικού οξέος και ελαφρώς αυξημένες του γαλλικού αιθυλεστέρα σε δείγματα οίνου που είχαν αποθηκευθεί σε βαρέλια καστανιάς που το ξύλο τους δεν είναι καμένο⁶⁹. Τα δείγματα οίνου που αναλύθηκαν στην συγκεκριμένη μελέτη είχαν αποθηκευθεί σε μετρίου καψίματος βαρέλια ακακίας και καστανιάς. Στην περίπτωση της ακακίας μεγαλύτερη είναι η ένταση των κορυφών της διϋδρορομπινετίνης συγκριτικά με την ρομπινετίνη, όπως φαίνεται και από τα φάσματα.

Στην εικόνα 3.24 παρουσιάζεται αναλυτικά η αρωματική περιοχή του μονοδιάστατου φάσματος ^1H NMR του φαινολικού κλάσματος του δείγματος οίνου Κοτσιφάλι που είχε αποθηκευθεί σε βαρέλι ακακίας και η ανάθεση των κορυφών των φαινολικών ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν.





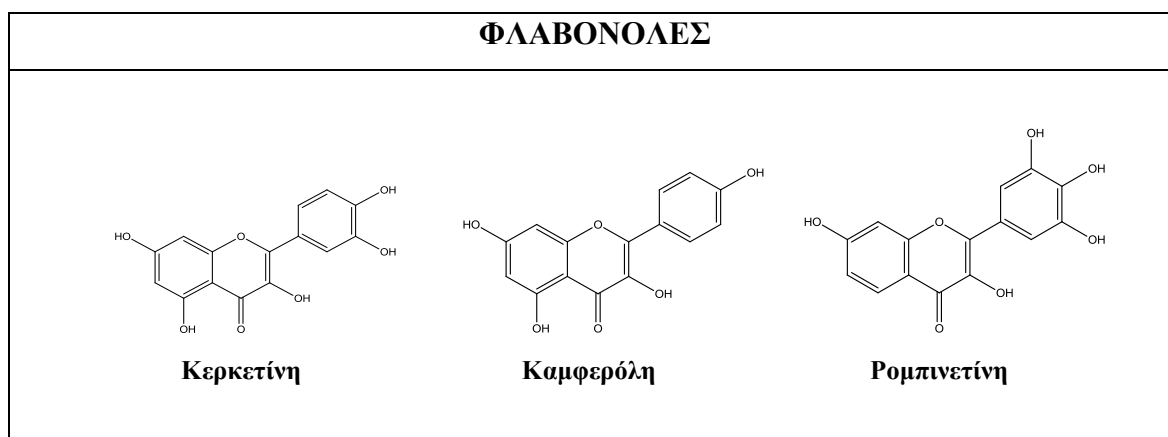
Εικόνα 3.24. Φάσμα ^1H NMR του φαινολικού κλάσματος του δείγματος Κοτσιφάλι σε βαρέλι ακακίας.

Οι φαινολικές ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν στα δείγματα και οι χημικές τους μετατοπίσεις στα φάσματα ^1H NMR με τις αντίστοιχες πολλαπλότητες παρουσιάζονται στον πίνακα 3.5. Στον πίνακα 3.6 παρουσιάζονται οι δομές των χημικών ενώσεων που προσδιορίστηκαν στο φαινολικό κλάσμα του οίνου. Οι ενώσεις που παρουσιάζονται στον πίνακα 3.6 ταυτοποιήθηκαν σε όλα τα δείγματα εκτός από την ρεσβερατρόλη και τις ανθοκυάνες (μαλβιδίνη, πεονιδίνη), οι οποίες ανιχνεύθηκαν μόνο στα δείγματα των ερυθρών ποικιλιών, Κοτσιφάλι και Μαντηλάρι. Η ρεσβερατρόλη είναι μία ένωση που βρίσκεται κυρίως στον φλοιό των σταφυλιών, γι' αυτό οι ερυθροί οίνοι περιέχουν μεγαλύτερες ποσότητες ρεσβερατρόλης. Υπάρχουν και τα δύο ισομερή της ρεσβερατρόλης (trans, cis) στον οίνο, λόγω της φωτοχημικής ισομερείωσης από την trans μορφή στην cis κατά την διάρκεια παραγωγής του οίνου.⁷⁰ Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις απαντάται το trans ισομερές.⁷¹ Η ρεσβερατρόλη αποτελεί μία βιοδραστική ένωση σημαντικού ενδιαφέροντος, καθώς έχει αναφερθεί ότι είναι δραστική στην καταπολέμηση του καρκίνου καθώς και στην αντιμετώπιση καρδιαγγειακών παθήσεων.⁷²

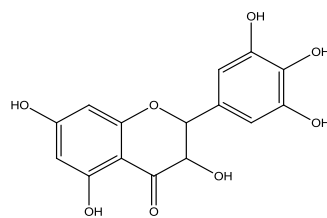
Πίνακας 3.3. Χημικές μετατοπίσεις των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν με τη Φασματοσκοπία NMR στο φαινολικό κλάσμα των οίνων.

Ενώσεις	Χημικές μετατοπίσεις (δ, ppm)
Κερσετίνη	6.18 (d), 6.39 (d), 6.88 (d), 7.63 (dd), 7.73 (d)
Μαλβιδίνη	4.00 (s), 6.66 (d), 6.97(d), 8.00 (s), 9.04 (s)
Πεονιδίνη	4.02 (s), 5.32 (d), 8.24 (d), 8.27 (dd), 9.05 (s)
Διϋδρορομπινετίνη	4.44 (d), 6.25 (d), 6.52 (dd), 6.54 (s), 7.72 (d)
Ρομπινετίνη	7.37 (s), 7.98 (d)
trans-καφταρικό οξύ	6.31 (d), 6.78 (d), 6.97 (dd), 7.06 (d), 7.66 (d)
Τυροσόλη	2.71 (t), 3.68 (t), 6.69 (d), 7.02 (d)
Γαλλικό οξύ	7.05 (s)
2-Φαινυλο-αιθανόλη	2.81 (t), 3.74 (t), 7.19 (dd), 7.26 (t)
Βανιλλικό οξύ	3.89 (s), 6.83 (d), 7.55 (m)
trans-ρεσβερατρόλη	6.15 (t), 6.44 (d), 7.35 (d)
Cis-ρεσβερατρόλη	
Κατεχίνη	2.50 (dd), 2.84 (dd), 3.97 (m), 4.56 (d), 5.85 (d), 5.91 (d), 6.71 (dd), 6.76 (d), 6.83 (d)
Επικατεχίνη	6.75 (d), 6.97 (d)
Καφεϊκό οξύ	6.21 (d), 7.53 (d)
Καμφερόλη	8.09 (d)
trans-κουταρικό οξύ	6.27 (d), 8.45 (d)
Πρωτοκατεχικό οξύ	7.41 (dd), 7.42 (d)
Συριγγικό οξύ	3.88 (s), 7.32 (s)
Γαλλικός αιθυλεστέρας	1.34 (t), 4.26 (q), 7.03 (s)

Πίνακας 3.4. Χημικές ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν στο φαινολικό κλάσμα του οίνου.

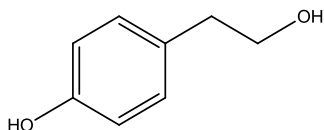


ΦΛΑΒΑΝΟΝΟΛΕΣ

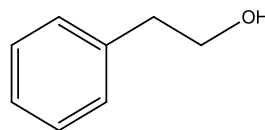


Διϋδρορομπινετίνη

ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΑΛΚΟΟΛΕΣ

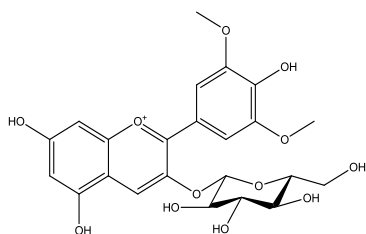


Τυροσόλη

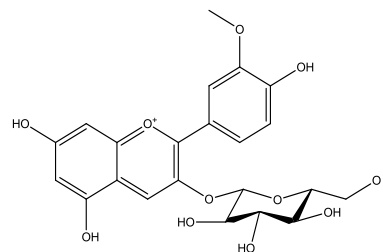


2-Φαινυλο-αιθανόλη

ΑΝΘΟΚΥΑΝΕΣ

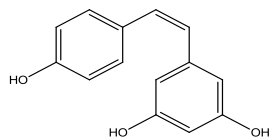


Μαλβιδίνη

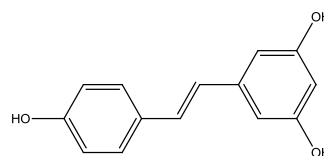


Πεονιδίνη

ΣΤΙΑΒΕΝΙΑ

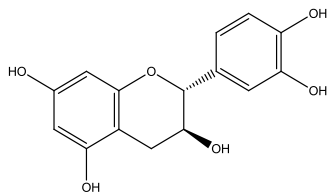


Cis-ρεσβερατρώλη

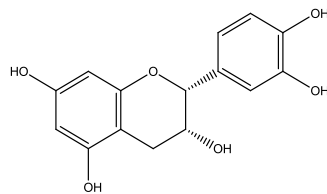


trans-ρεσβερατρώλη

ΦΛΑΒΑΝΟΛΕΣ

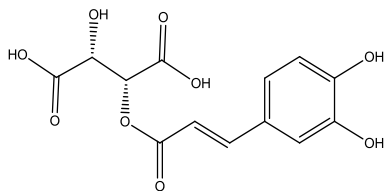


Κατεχίνη

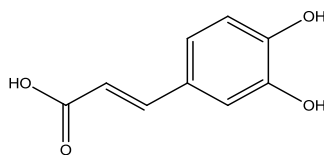


Επικατεχίνη

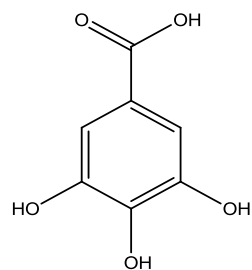
ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΟΞΕΑ-ΕΣΤΕΡΕΣ



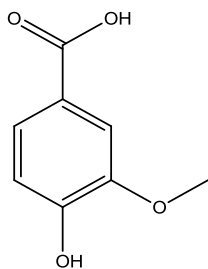
Trans-καφταρικό οξύ



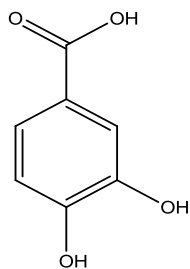
Καφεϊκό οξύ



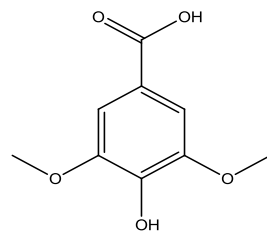
Γαλλικό οξύ



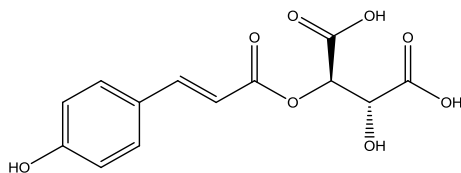
Βανιλλικό οξύ



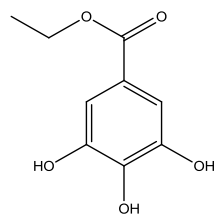
Πρωτοκατεχικό οξύ



Συριγγικό οξύ



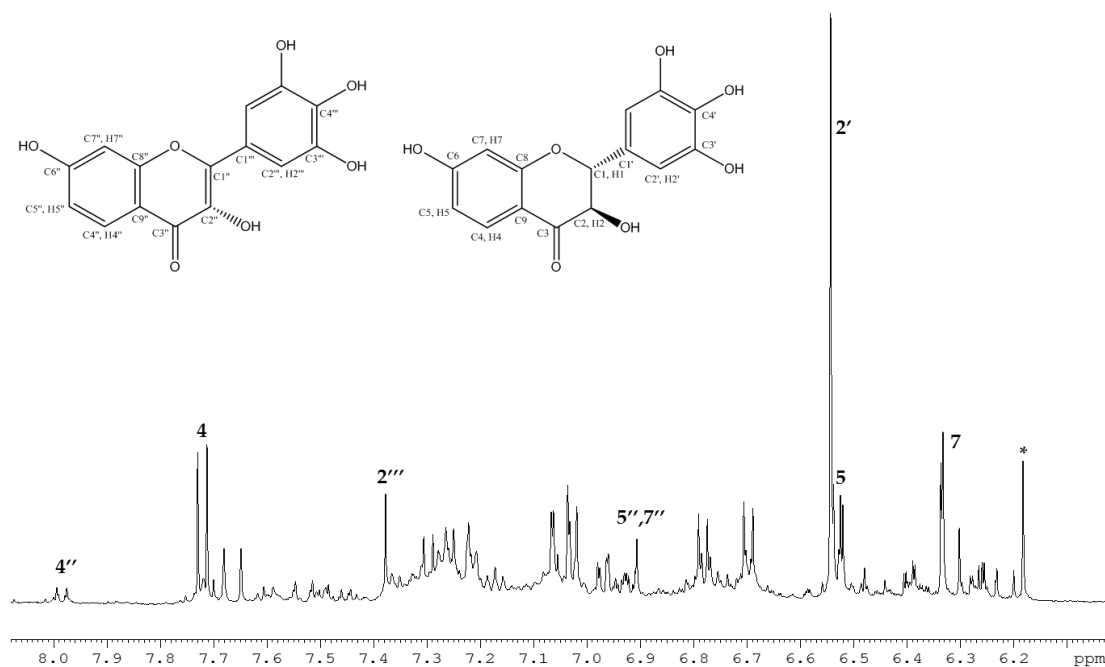
trans-κουταρικό οξύ



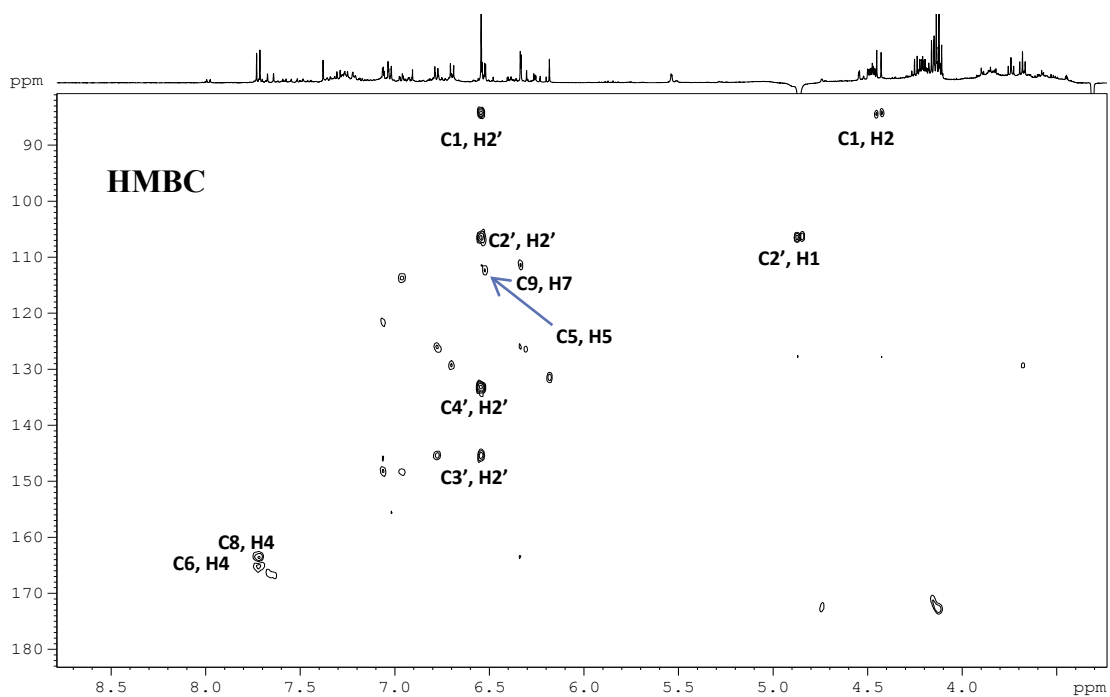
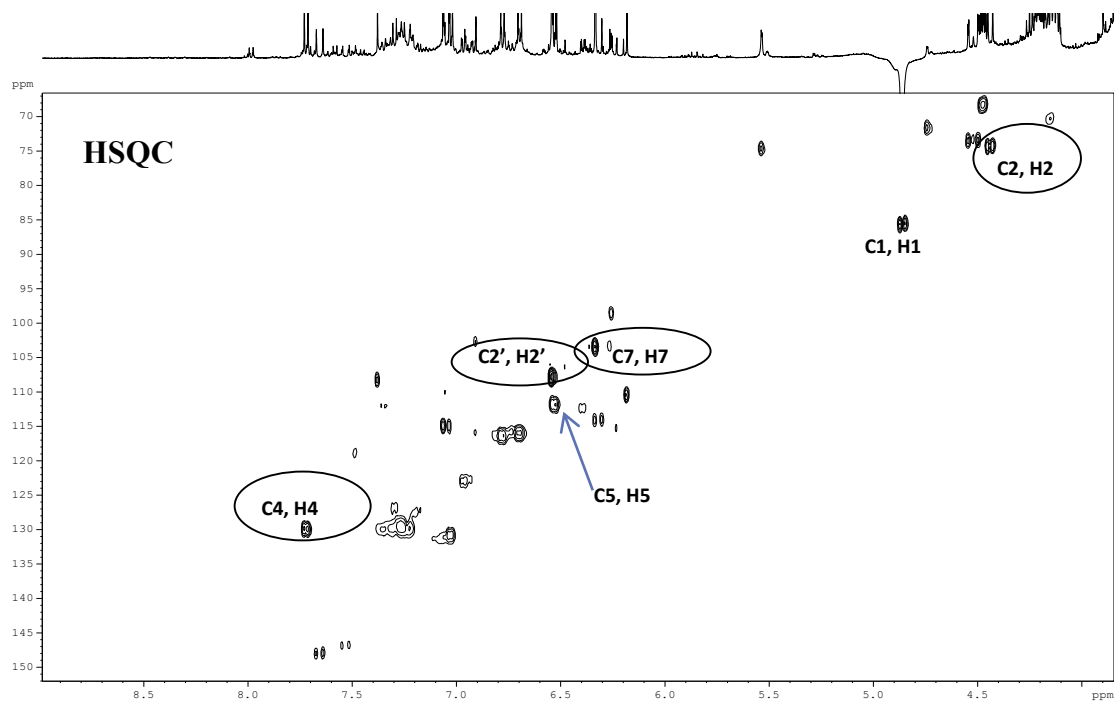
Γαλλικός αιθυλεστέρας

3.2.2 ΑΝΑΘΕΣΗ ΤΩΝ ΚΟΡΥΦΩΝ ΤΗΣ ΔΙΪΔΡΟΜΠΙΝΕΤΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΡΟΜΠΙΝΕΤΙΝΗΣ ΣΤΑ ΦΑΣΜΑΤΑ ^1H NMR

Οι φαινολικές ενώσεις (διϋδρορομπινετίνη, ρομπινετίνη) ταυτοποιήθηκαν μόνο στα δείγματα που είχαν αποθηκευθεί σε βαρέλια ακακίας. Η ανάθεση των κορυφών παρουσιάζεται στο φάσμα ^1H NMR του δείγματος της ποικιλίας Δαφνί στην εικόνα 3.25 και στους πίνακες 3.7 και 3.8 παρουσιάζονται αναλυτικά οι χημικές τους μετατοπίσεις στα φάσματα ^1H NMR και ^{13}C NMR. Η ταυτοποίηση των ενώσεων έγινε με τη χρήση των δισδιάστατων φασμάτων NMR (HSQC, HMBC), όπως παρουσιάζονται στην εικόνα 3.26.



Εικόνα 3.25. Φάσμα ^1H NMR της αρωματικής περιοχής του φαινολικού κλάσματος του δείγματος Δαφνί σε βαρέλι ακακίας.



Εικόνα 3.26. Ανάθεση κορυφών της διϋδρορομπινετίνης στα δισδιάστατα φάσματα HSQC και HMBC της αρωματικής περιοχής του φαινολικού κλάσματος του δείγματος Δαφνί σε βαρέλι ακακίας.

Πίνακας 3.5. Χημικές μετατοπίσεις του ^1H NMR και ^{13}C NMR της διϋδρορομπινετίνης.

	δ_{H} (J)	δ_{C}
1	5.07 (d, 12.04)	86.5
2	4.44 (d, 11.59)	74.1
3		192.5
4	7.76 (d, 8.65)	132.0
5	6.65 (dd, 8.65, 2.22)	114.3
6		166.6
7	6.41 (d, 2.22)	105.6
8		166.7
9		111.6
1'		128.0
2'	6.72(s)	110.9
3'		148.3
4'		135.9

Πίνακας 3.6. Χημικές μετατοπίσεις του ^1H NMR και ^{13}C NMR της ρομπινετίνης.

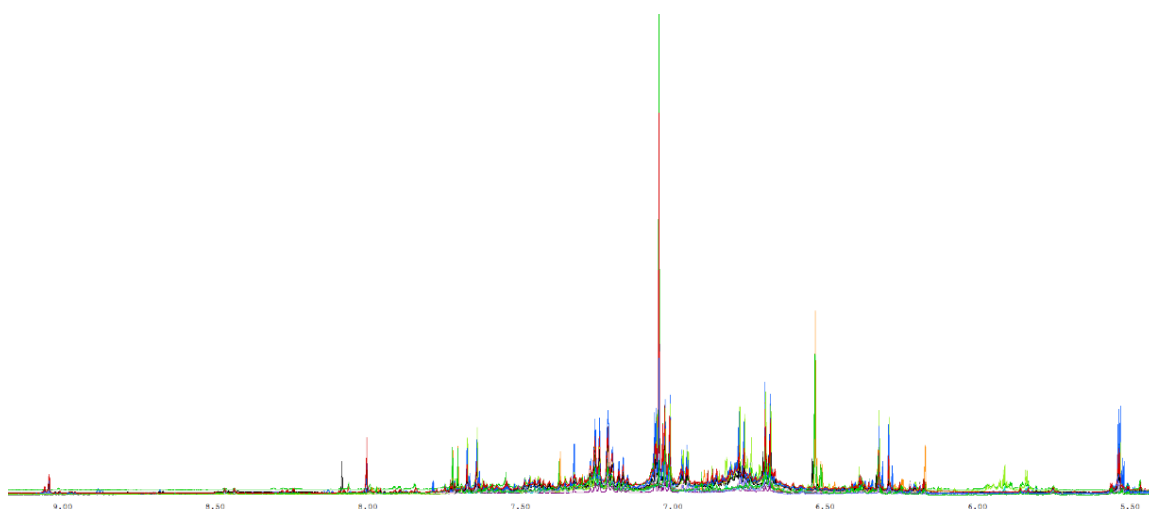
	δ_{H} (J)	δ_{C}
4''	7.98 (d, 9.20)	127.2
5''	6.91 (dd, 9.20, 2.22)	116.1
7''	6.90 (d, 2.22)	102.8
2'''	7.38(s)	108.3
4'''		136.3

3.2.3 ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΙΝΟΥ ΣΕ ΦΑΣΜΑΤΑ ^1H NMR

Για την μεταβολομική ανάλυση των φαινολικών ενώσεων του οίνου χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα AMIX 3.3.14, με τη χρήση του οποίου κάθε φάσμα ^1H NMR χωρίστηκε σε περιοχές των 0.05 ppm (bucketing), των οποίων το εμβαδόν υπολογίστηκε. Τα δεδομένα των υποπεριοχών του φάσματος που υπολογίστηκαν μεταφέρθηκαν στο πρόγραμμα SIMCA προκειμένου να πραγματοποιηθεί η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Για την ανάλυση του φαινολικού κλάσματος των δειγμάτων οίνου χρησιμοποιήθηκε μόνο η αρωματική περιοχή του φάσματος ^1H NMR (5.10-10.00 ppm), που περιέχει σήματα από τις ανθοκυάνες και τις πολυφαινόλες του οίνου. Η περιοχή Hotelling T2, που εμφανίζεται σαν έλλειψη στα διάφορα μοντέλα, δείχνει το 95% του ορίου εμπιστοσύνης, και χρησιμεύει στον εντοπισμό δειγμάτων που απέχουν πολύ από το μοντέλο (outliers). Η ποιότητα των μοντέλων περιγράφεται από τις τιμές R_x^2 και Q^2 . Η τιμή R^2 δείχνει το ποσοστό των διαφοροποιήσεων των μεταβλητών X που εξηγεί το μοντέλο, ενώ η παράμετρος Q^2 αποτελεί μέτρο της προβλεπτικής ικανότητας του μοντέλου. Όταν η τιμή του Q^2 είναι μεγαλύτερη από 0.5 το μοντέλο έχει πολύ καλή προβλεπτική ικανότητα.

3.2.3.1 ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΙΝΟΥ ΤΗΣ ΠΡΩΤΗΣ ΧΡΟΝΙΑΣ ΤΡΥΓΗΤΟΥ (2012)

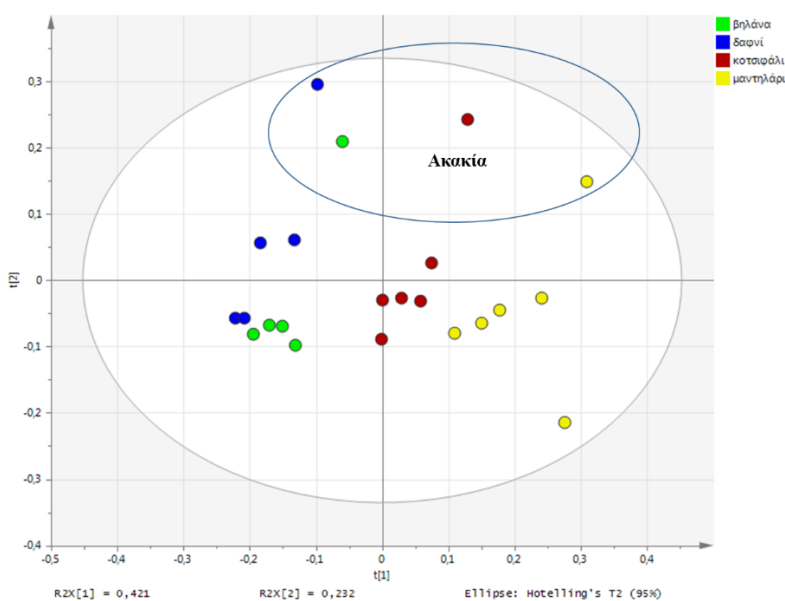
Για την μεταβολομική ανάλυση των πολυφαινολών του οίνου της πρώτης χρονιάς τρυγητού χρησιμοποιήθηκαν μόνο τα δείγματα που είχαν αποθηκευθεί στους περιέκτες για 9 μήνες. Στην εικόνα 3.27 παρουσιάζονται τα φάσματα της αρωματικής περιοχής των δειγμάτων οίνου που χρησιμοποιήθηκαν για την μεταβολομική ανάλυση.



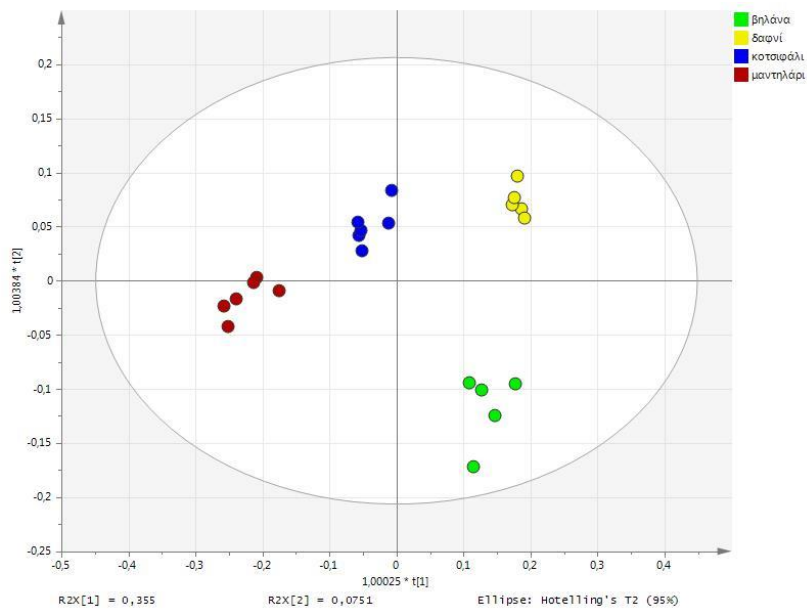
Εικόνα 3.27. Αρωματική περιοχή των δειγμάτων οίνου που είχαν αποθηκευθεί στους περιέκτες για 9 μήνες (Α' τρύγος) με την χρήση του προγράμματος AMIX.

Πραγματοποιήθηκε ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) (Εικόνα 3.28) για τις τέσσερις ποικιλίες (Μαντηλάρι, Κοτσιφάλι, Βηλάνα, Δαφνί). Υπολογίστηκαν τέσσερις κύριοι άξονες, με τους δύο πρώτους να περιγράφουν το 65.3% της συνολικής διασποράς των μεταβλητών X . Ο κύριος άξονας PC1 περιγράφει το 42.1% της διασποράς, ενώ ο δεύτερος κύριος άξονας PC2 περιγράφει το 23.2% της διασποράς. Από το διάγραμμα PCA της εικόνας 3.28 φαίνεται ότι δεν υπάρχει καλή διαφοροποίηση μεταξύ των ποικιλιών, αφού διαφοροποιούνται τα δείγματα που είχαν αποθηκευθεί σε βαρέλια ακακίας, λόγω της ύπαρξης των φαινολικών ενώσεων διϋδρορομπινετίνη και ρομπινετίνη αποκλειστικά σε αυτά. *Η διαφοροποίηση λόγω βαρελιού επομένως «καλύπτει» την διαφοροποίηση λόγω ποικιλίας στο μοντέλο PCS.* Γι' αυτό το λόγο πραγματοποιήθηκε και η ανάλυση ορθογωνικών μερικών ελαχίστων τετραγώνων (OPLS-DA) θέτοντας ως παράμετρο διαφοροποίησης Y την ποικιλία του οίνου. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, με την στατιστική τεχνική OPLS-DA η διασπορά των μεταβλητών X που δεν σχετίζεται με την υπό εξέταση μεταβλητή Y (στη προκειμένη περίπτωση ο

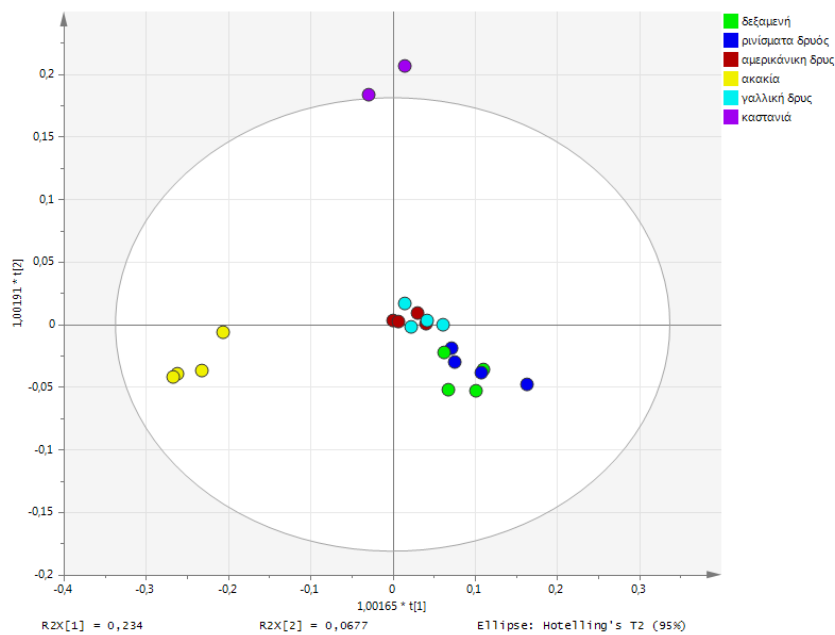
τύπος του βαρελιού) συγκεντρώνεται σε ορθογωνικούς παράγοντες κι έτσι οπτικοποιείται καλύτερα η διασπορά γύρω από την μεταβλητή Y που μελετάται. Στο διάγραμμα OPLS-DA της εικόνας 3.29 υπάρχει καλύτερη διαφοροποίηση μεταξύ των τεσσάρων ποικιλιών, με το μοντέλο OPLS-DA να περιγράφει το 92.1% της συνολικής διασποράς των μεταβλητών με προβλεπτική ικανότητα Q^2 ίση με 0.671. Στην εικόνα 3.30 παρουσιάζεται το αντίστοιχο διάγραμμα OPLS-DA, όπου ο διαχωρισμός έγινε με βάση τον περιέκτη (παραμέτρος Y) στον οποίο είχε αποθηκευθεί προς ωρίμανση το κάθε δείγμα οίνου. Υπάρχει μεγαλύτερη διαφοροποίηση στα δείγματα που έχουν αποθηκευθεί σε βαρέλια καστανιάς και ακακίας, λόγω των αυξημένων συγκεντρώσεων του γαλλικού οξέος και των ενώσεων διϋδρορομπινετίνη/ρομπινετίνη αντίστοιχα. Το μοντέλο OPLS-DA για τους περιέκτες περιγράφει το 89.6% της συνολικής διασποράς των μεταβλητών X.



Εικόνα 3.28. Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) της αρωματικής περιοχής των δειγμάτων οίνου που είχαν αποθηκευθεί στους περιέκτες για 9 μήνες.



Εικόνα 3.29. Διάγραμμα OPLS-DA της αρωματικής περιοχής των δειγμάτων οίνου που είχαν αποθηκευθεί στους περιέκτες για 9 μήνες ως προς την ποικιλία των οίνων.

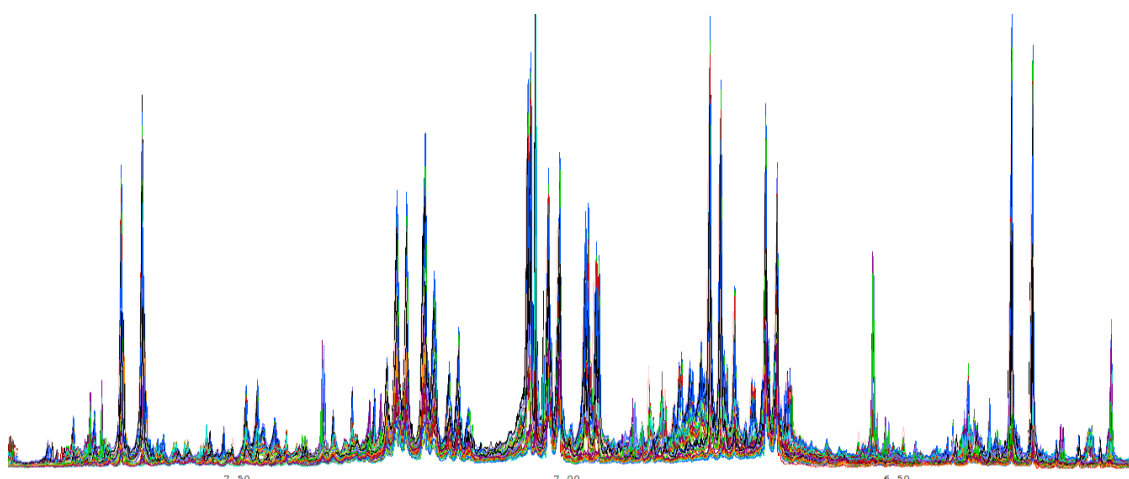


Εικόνα 3.30. Ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (OPLS-DA) της αρωματικής περιοχής των δειγμάτων οίνου που είχαν αποθηκευθεί στους περιέκτες για 9 μήνες με βάση τον τύπο του περιέκτη.

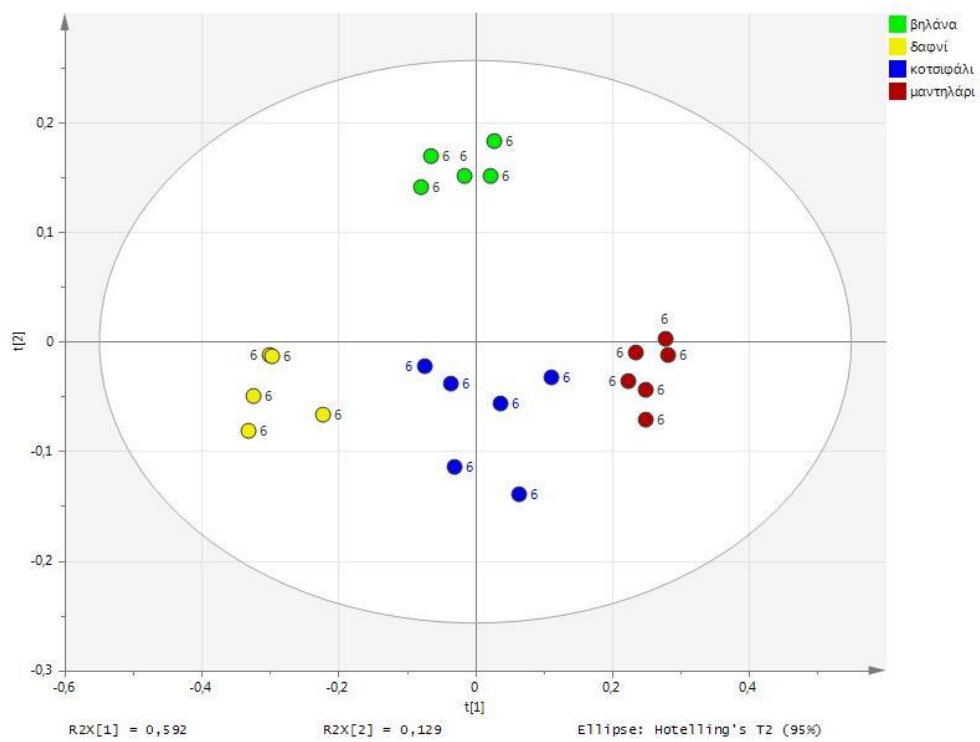
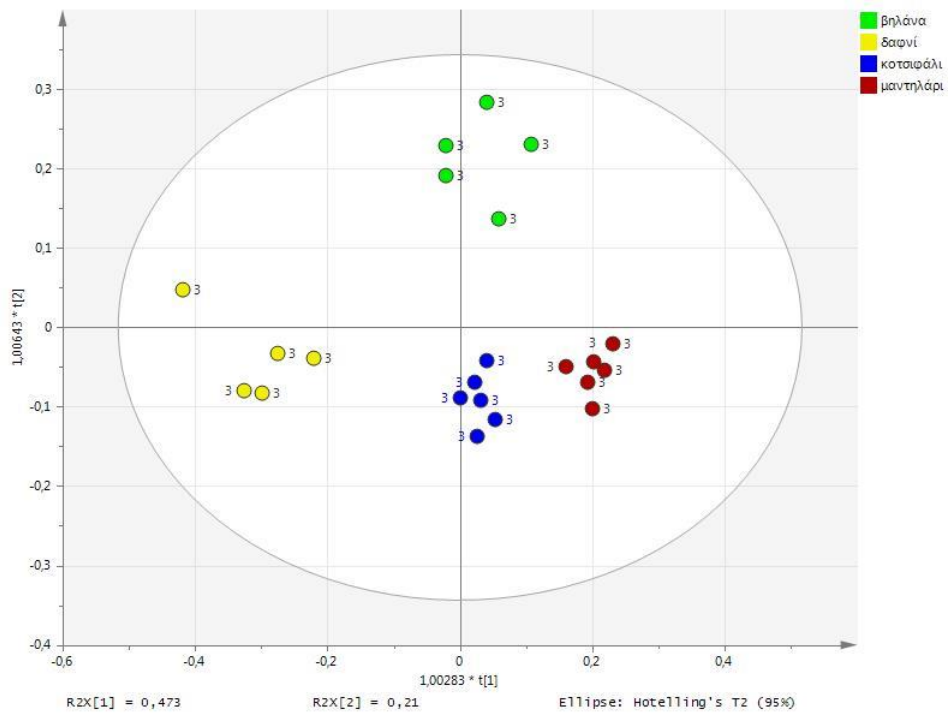
3.2.3.2 ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΙΝΟΥ ΤΗΣ ΔΕΥΤΕΡΗΣ ΧΡΟΝΙΑΣ ΤΡΥΓΗΤΟΥ (2013)

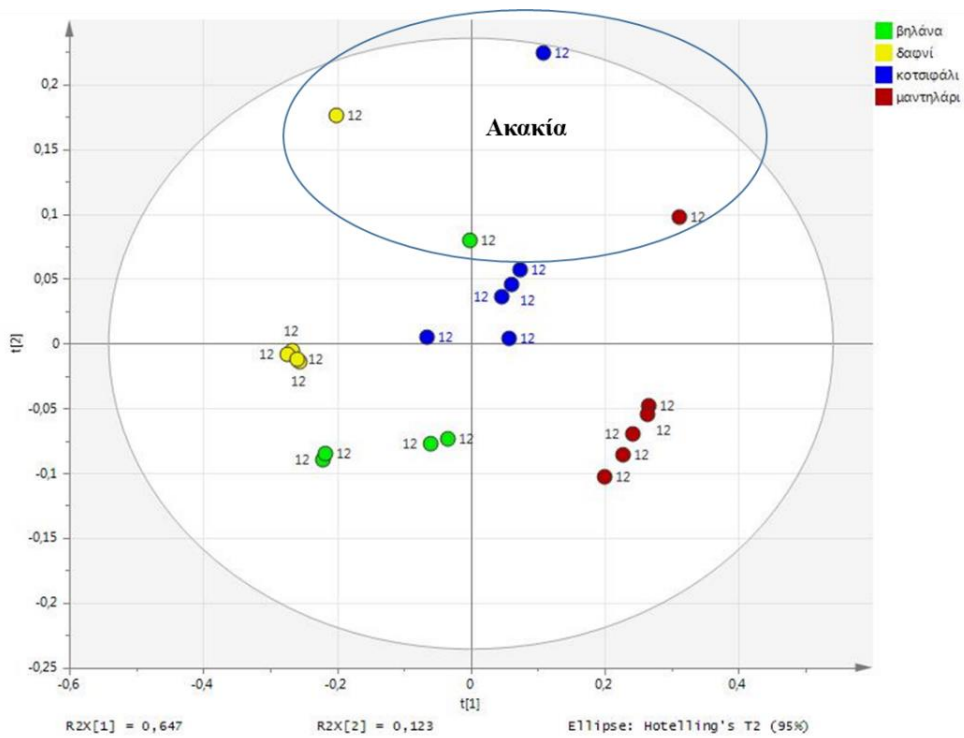
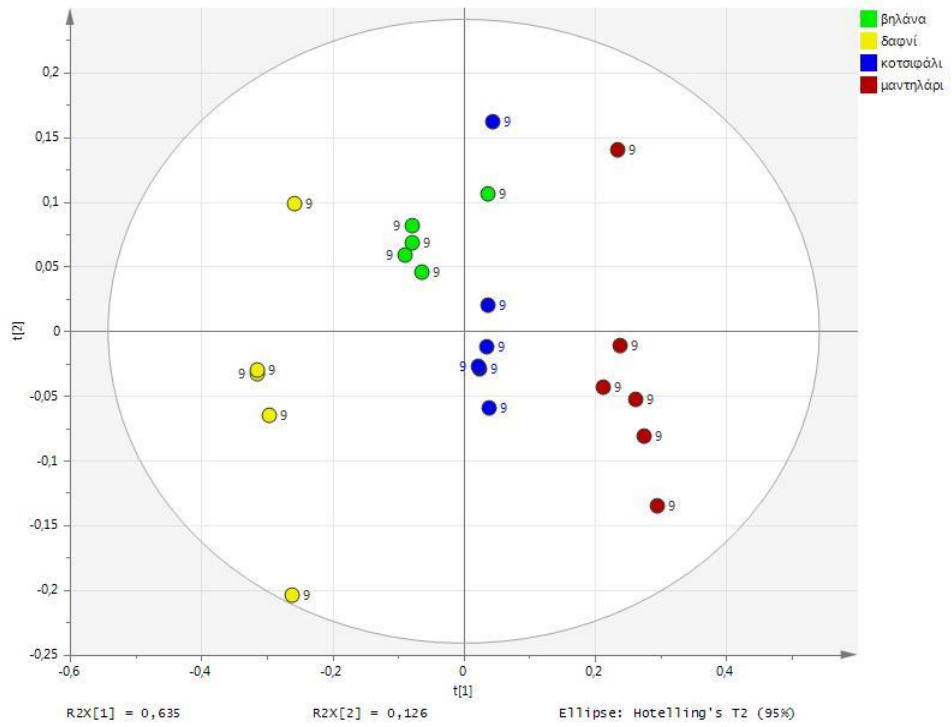
Αναλύθηκαν τα δείγματα της δεύτερης χρονιάς σε χρόνο μηδέν και μετά από 3, 6, 9 και 12 μήνες ωρίμανσης στους περιέκτες. Τα φάσματα μεταφέρθηκαν στο πρόγραμμα AMIX όπου δημιουργήθηκε πίνακας με υποπεριοχές (buckets) των 0.05 ppm για να χρησιμοποιηθούν τα φασματικά δεδομένα για την μεταβολομική ανάλυση. Στην εικόνα 3.31 παρουσιάζονται τα φάσματα της αρωματικής περιοχής των δειγμάτων οίνου του 2^{ου} τρύγου που χρησιμοποιήθηκαν για την μεταβολομική ανάλυση.

Με τη χρήση των φασματικών δεδομένων έγινε η ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) και η ανάλυση ορθογωνικών μερικών ελαχίστων τετραγώνων (OPLS-DA) των οίνων (Μαντηλάρι, Κοτσιφάλι, Βηλάνια και Δαφνί). Στην εικόνα 3.32 παρουσιάζονται τα διαγράμματα PCA για τους 3, 6, 9 και 12 μήνες που αναλύθηκαν τα δείγματα, όπου παρουσιάζονται οι διαφοροποιήσεις μεταξύ των ποικιλιών. Στους πρώτους μήνες ωρίμανσης υπάρχει καλή διαφοροποίηση μεταξύ των ποικιλιών, ενώ όσο παραμένει ο οίνος στους περιέκτες παρατηρείται ότι τα δείγματα της ίδιας ποικιλίας διαφοροποιούνται περισσότερο μεταξύ τους διότι επηρεάζονται από τον τύπο του περιέκτη που είναι αποθηκευμένα. Συγκεκριμένα μετά από 12 μήνες παραμονής των οίνων στους περιέκτες, τα δείγματα που είχαν αποθηκευθεί σε βαρέλια ακακίας διαφοροποιούνται από τα υπόλοιπα δείγματα οίνου της ίδιας ποικιλίας.



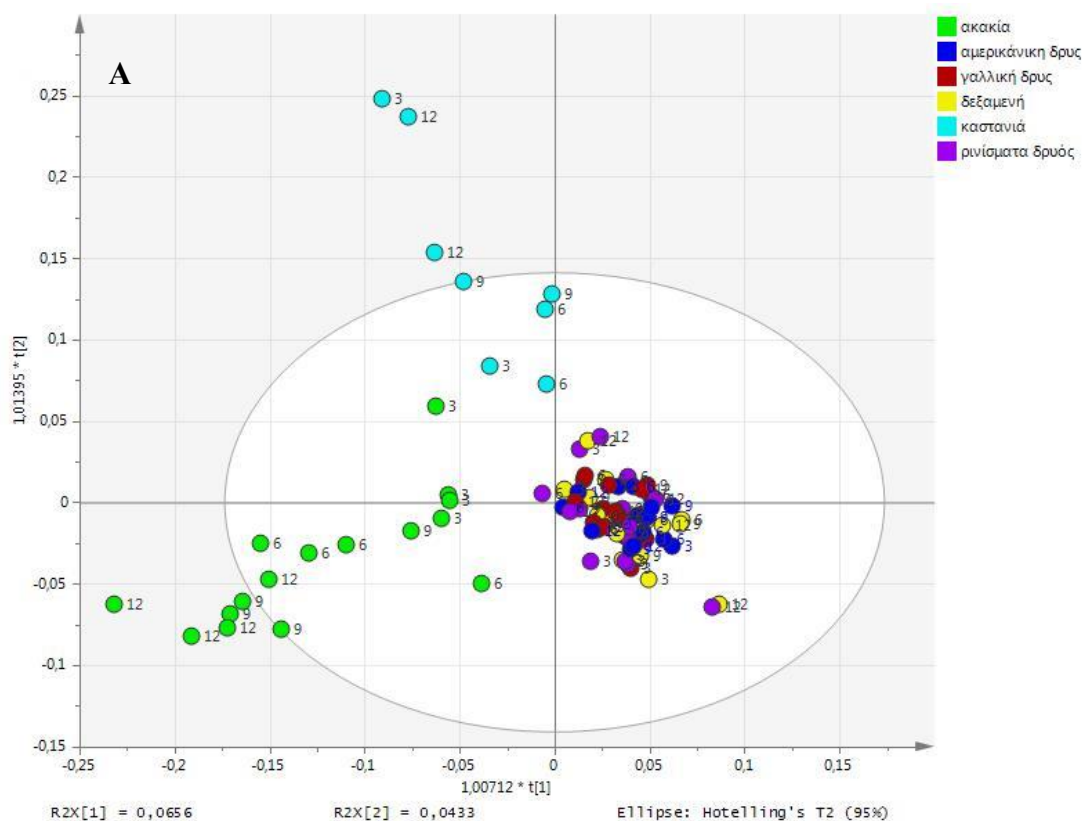
Εικόνα 3.31. Αρωματική περιοχή των φασμάτων ^1H NMR του φαινολικού κλάσματος όλων των δειγμάτων οίνου στα διάφορα βαρέλια σε διαλύτη δευτεριωμένη μεθανόλη με τη χρήση του προγράμματος AMIX.

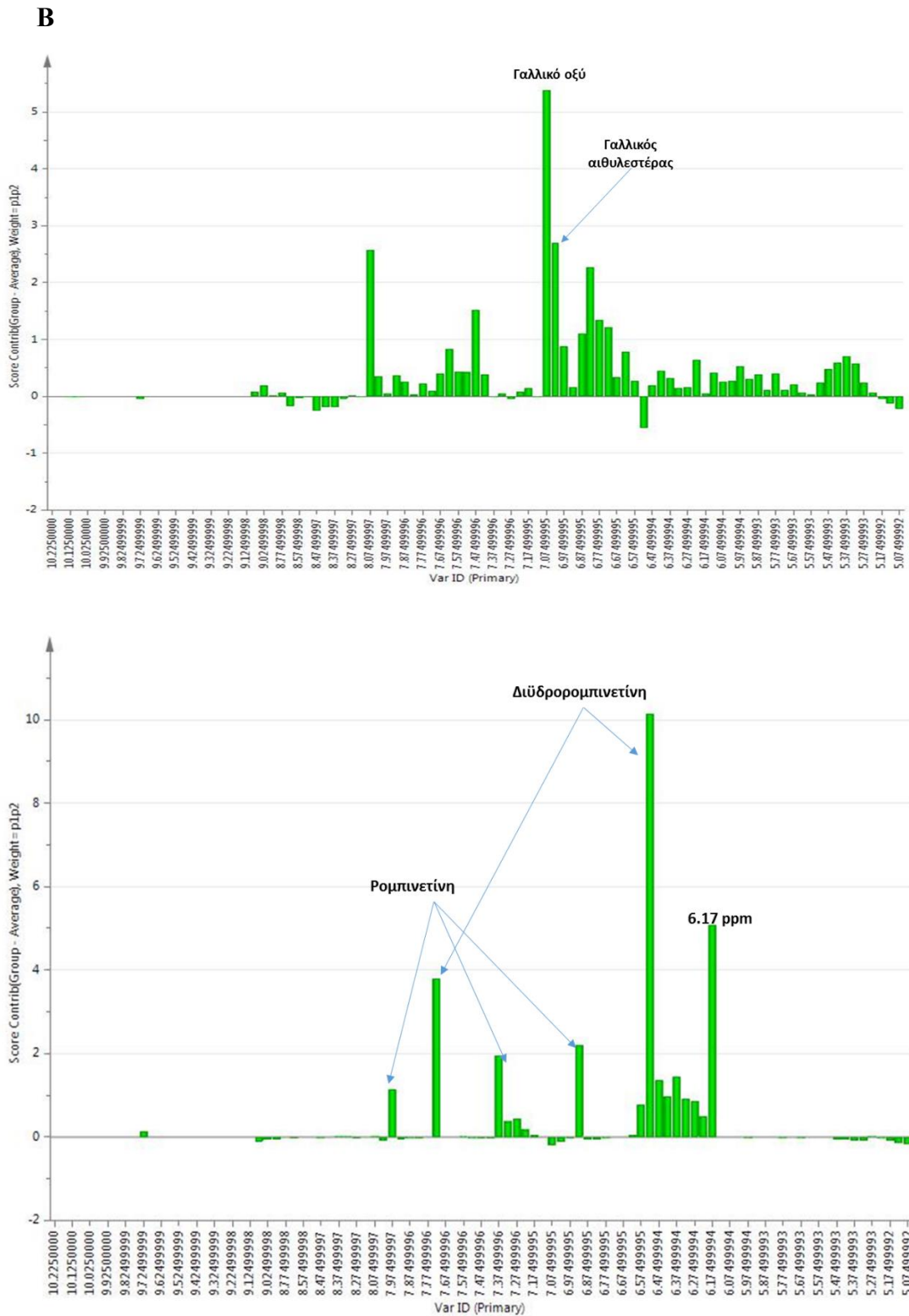




Εικόνα 3.32. Μοντέλο PCA του φαινολικού κλάσματος των ποικιλιών Μαντηλάρι, Κοτσιφάλι, Δαφνί και Βηλόνα μετά από 3, 6, 9 και 12 μήνες ωρίμανσης στους περιέκτες κατά τον Β' τρύγο.

Στην εικόνα 3.33 παρουσιάζεται το διάγραμμα OPLS-DA του φαινολικού προφίλ των οίνων του Β' τρύγου, που επιχειρεί τη διάκριση των διαφόρων τύπων περιεκτών. Όπως φαίνεται, επιτυγχάνεται εξαιρετικός διαχωρισμός των βαρελιών ακακίας και καστανιάς από τους υπόλοιπους περιέκτες που χρησιμοποιήθηκαν κατά τον Β' τρύγο, ιδιαίτερα σε σχέση με το αντίστοιχο μοντέλο OPLS-DA που προέκυψε από το πλήρες μεταβολικό προφίλ των οίνων (Εικόνα 3.18 πάνω). Ο διαχωρισμός αυτός οφείλεται στην ύπαρξη των ενώσεων διϋδρορομπινετίνη και ρομπινετίνη στους οίνους που είχαν αποθηκευθεί σε βαρέλια ακακίας και στις αυξημένες συγκεντρώσεις του γαλλικού οξέος και του γαλλικού αιθυλεστέρα στα δείγματα οίνου που είχαν αποθηκευθεί σε βαρέλια καστανιάς.

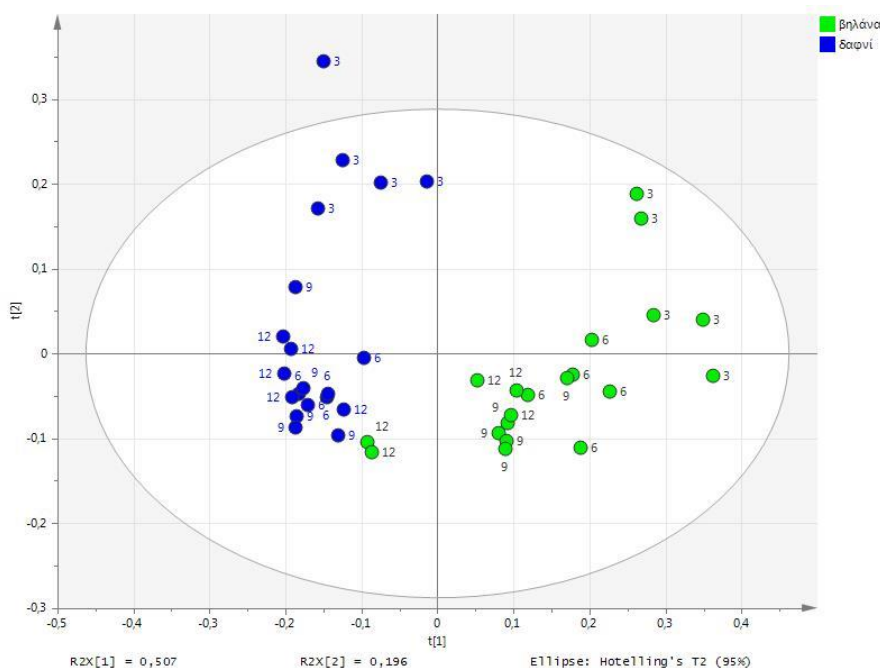


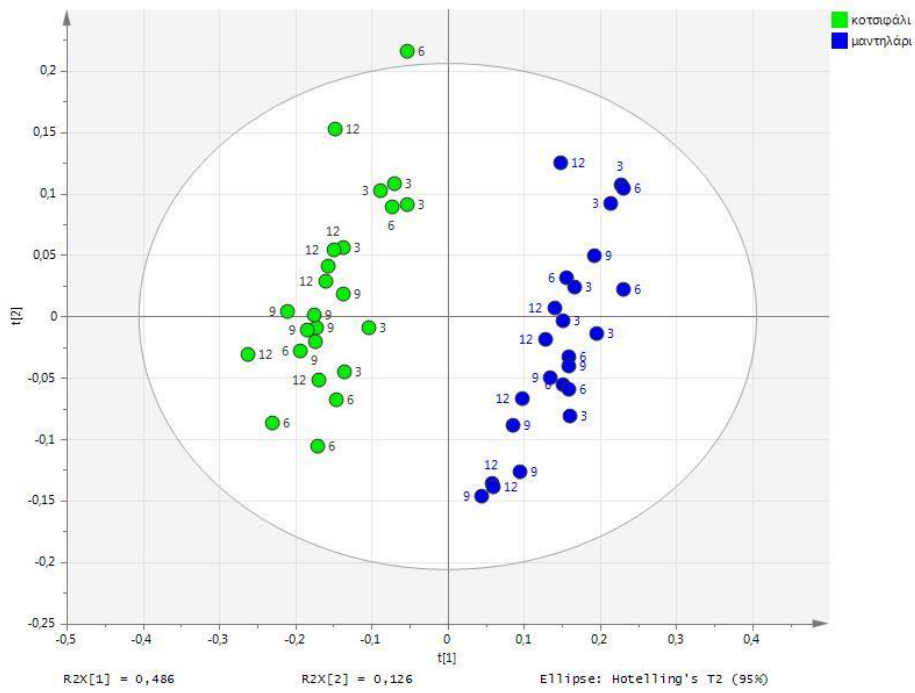
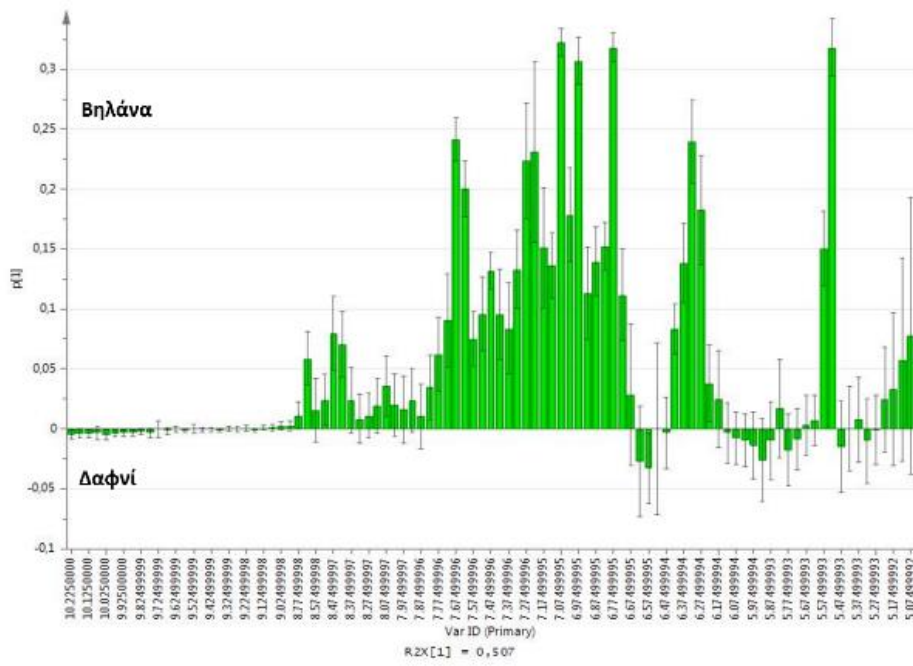


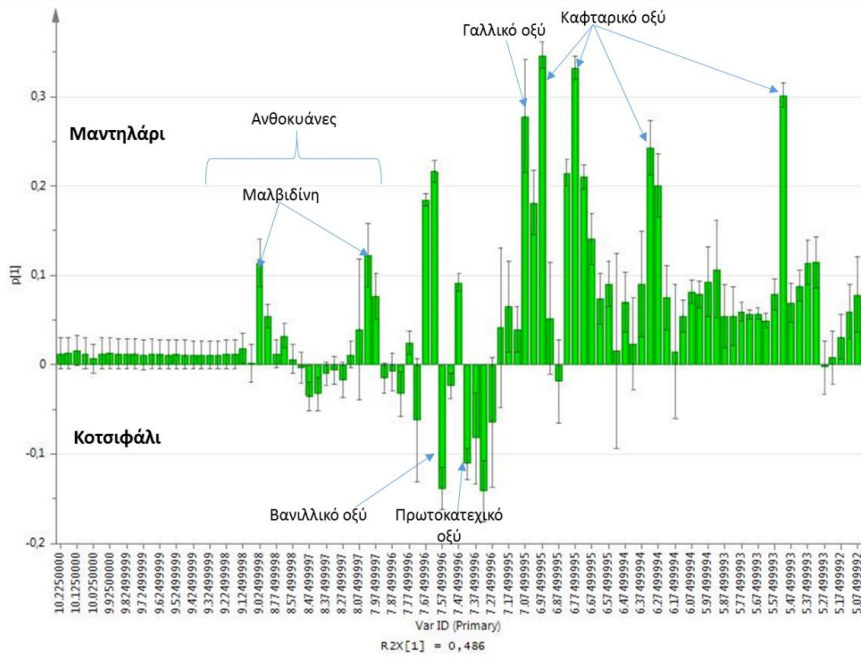
Εικόνα 3.33. Διάγραμμα OPLS-DA των τιμών (A) και των συνεισφορών (B) με βάση το ^1H NMR φαινολικό προφίλ των οίνων σε διαφορετικούς περιέκτες για τον Β' τρύχο. Επισημαίνονται οι περιοχές (φασματικά πρότυπα) που διαφοροποιούν τα βαρέλια καστανιάς (πάνω) και ακακίας (κάτω).

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε η ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) για την διαφοροποίηση ανάμεσα στους λευκούς (Βηλάνα, Δαφνί) και ερυθρούς (Μαντηλάρι, Κοτσιφάλι) οίνους που παρήχθησαν κατά τον Β' τρύγο. Τα διαγράμματα PCA και τα διαγράμματα βαρύτητας μεταβλητών (loadings) παρουσιάζονται στην εικόνα 3.34. Υπάρχει εξαιρετική διαφοροποίηση μεταξύ των δύο λευκών ποικιλιών ως προς τον κύριο άξονα (PC1) ($R^2=96.4\%$) και το μοντέλο έχει άριστη προβλεπτική ικανότητα ($Q^2=86.9\%$). Αντίστοιχα καλά είναι τα αποτελέσματα για τις ερυθρές ποικιλίες, όπου το μοντέλο PCA έχει $R^2=91.2\%$ και $Q^2=68.4\%$.

Τα φασματικά πρότυπα NMR που είναι υπεύθυνα για τον χημειομετρικό διαχωρισμό των ποικιλιών φαίνονται στα διαγράμματα βαρύτητας των μεταβλητών για κάθε τύπο οίνου. Στα δείγματα της ποικιλίας Βηλάνα υπάρχουν περισσότερες πολυφαινόλες συγκριτικά με τα δείγματα της ποικιλίας Δαφνί και αυτό οδηγεί στον επιτυχή διαχωρισμό των λευκών αυτών ποικιλιών. Παρομοίως και η ποικιλία Μαντηλάρι περιέχει γενικά περισσότερες πολυφαινόλες (γαλλικό οξύ, καφταρικό οξύ) και ανθοκυάνες (μαλβιδίνη, πεονιδίνη) απ' την ποικιλία Κοτσιφάλι, η οποία όμως υπερισχύει σε περιεκτικότητα σε βανιλλικό οξύ και πρωτοκατεχικό οξύ. Οι διαφοροποιήσεις αυτές στο φαινολικό προφίλ οδηγούν στον επιτυχή διαχωρισμό των δύο ερυθρών ποικιλιών, Κοτσιφάλι και Μαντηλάρι.







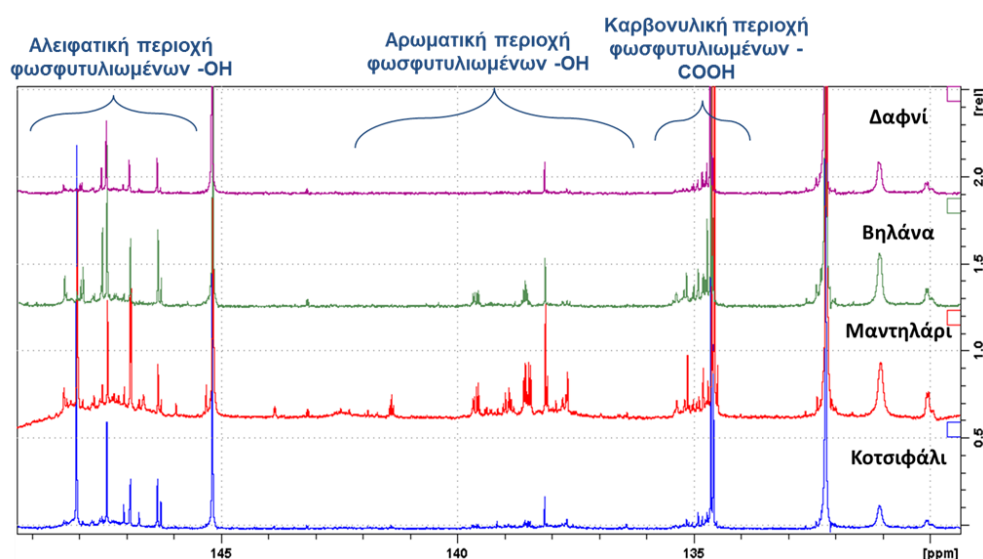
Εικόνα 3.34. PCA των λευκών ποικιλιών (Δαφνί και Βηλάνα) και των ερυθρών ποικιλιών (Μαντηλάρι, Κοτσιφάλι). Επισημαίνονται οι περιοχές (φασματικά πρότυπα) που διαφοροποιούν τις λευκές (πάνω) και ερυθρές (κάτω) ποικιλίες.

3.3 ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΦΑΙΝΟΛΙΚΟΥ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΙΝΟΥ ΜΕ ΤΗΝ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ^{31}P NMR

3.3.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΤΟΥ ΟΙΝΟΥ ΣΤΑ ΦΑΣΜΑΤΑ ^{31}P NMR

Η φασματοσκοπία ^{31}P NMR χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση του φαινολικού κλάσματος των δειγμάτων οίνου της δεύτερης χρονιάς τρυγητού (2013).

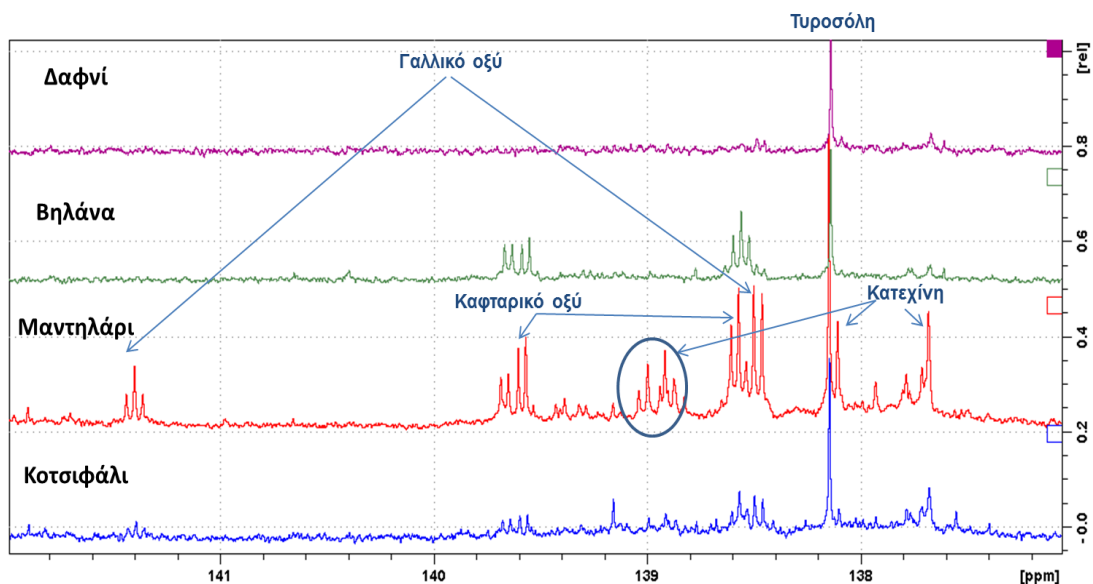
Μετά τη συλλογή του φαινολικού κλάσματος του οίνου με την εκχύλιση στερεάς φάσης και την ανάλυσή του με την Φασματοσκοπία ^1H NMR (Κεφ. 3.2) εξατμίστηκε η δευτεριωμένη μεθανόλη σε περιστροφικό εξατμιστήρα και έπειτα πραγματοποιήθηκε η αντίδραση φωσφιτυλίωσης. Τα φάσματα ^{31}P NMR που ελήφθησαν για τα δείγματα Κοτσιφάλι, Μαντηλάρι, Βηλάνα και Δαφνί σε συμβατικό χρόνο μηδέν ($t=0$) παρουσιάζονται στην εικόνα 3.35.



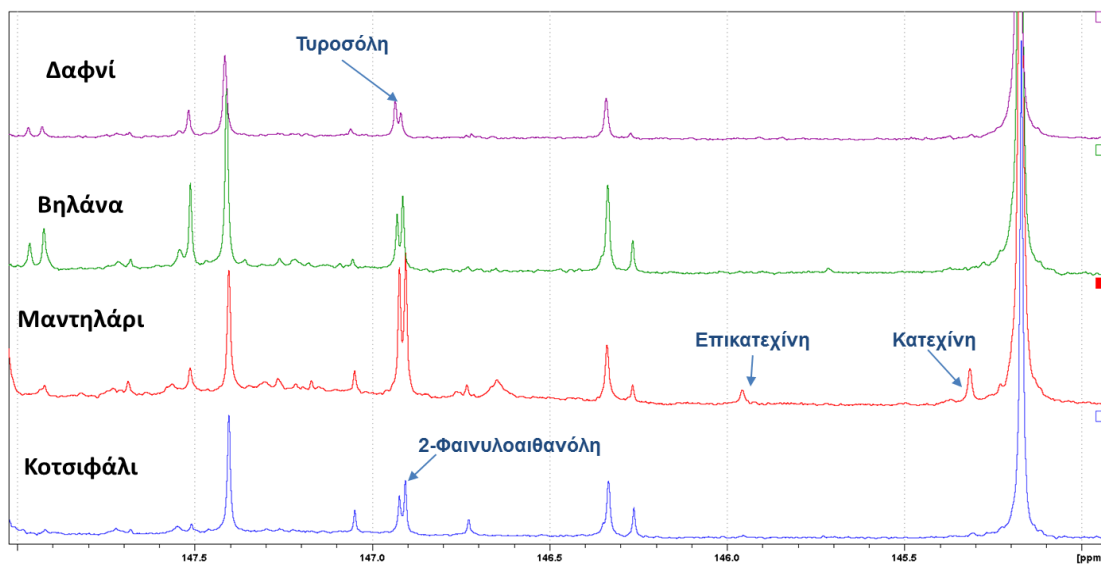
Εικόνα 3.35. Φάσματα ^{31}P NMR των δειγμάτων Κοτσιφάλι, Μαντηλάρι, Βηλάνα, Δαφνί πριν την εισαγωγή τους σε περιέκτες ($t=0$).

Στην περιοχή 136-140 ppm εμφανίζονται οι κορυφές των φωσφιτυλιωμένων φαινολικών υδροξυλίων, ενώ στην περιοχή 145-159 ppm εμφανίζονται οι κορυφές των αλειφατικών φωσφιτυλιωμένων υδροξυλίων. Η περιοχή στην οποία εμφανίζονται οι κορυφές των φωσφιτυλιωμένων καρβοξυλικών ομάδων είναι μεταξύ 134-136 ppm. Στις εικόνες 3.36 και 3.37 παρουσιάζονται τα φάσματα ^{31}P NMR και οι ενώσεις που

ταυτοποιήθηκαν σε κάθε δείγμα οίνου. Οι χημικές μετατοπίσεις ^{31}P NMR των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 3.8.



Εικόνα 3.36. Αρωματική περιοχή φωσφιτυλιωμένων υδροξυλίων των φασμάτων ^{31}P NMR των δειγμάτων Κοτσιφάλι, Μαντηλάρι, Βηλάνα, Δαφνί.



Εικόνα 3.37. Αλειφατική περιοχή φωσφιτυλιωμένων υδροξυλίων των φασμάτων ^{31}P NMR των δειγμάτων Κοτσιφάλι, Μαντηλάρι, Βηλάνα, Δαφνί.

Πίνακας 3.7. Χημικές μετατοπίσεις των ενώσεων του οίνου που ταυτοποιήθηκαν στα φάσματα ³¹P NMR.

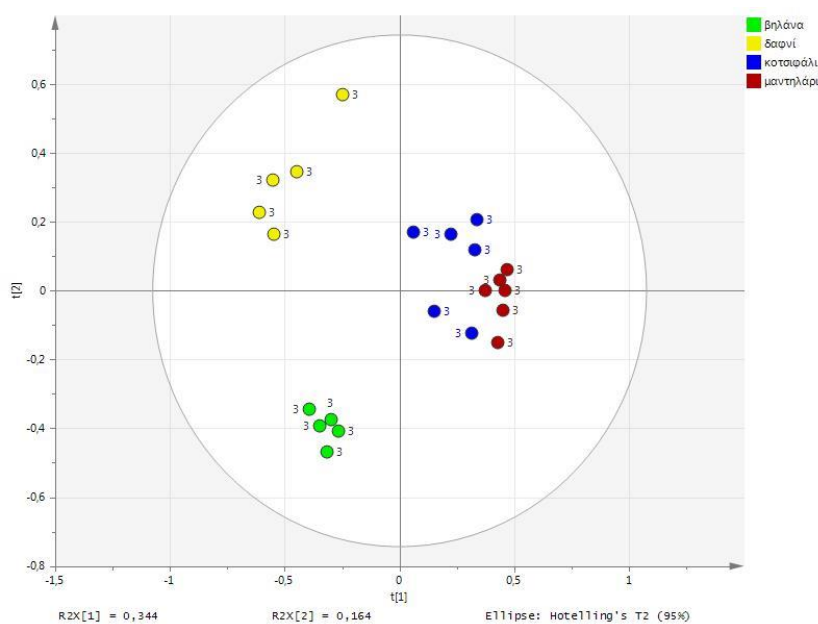
Ένωση	Χημική μετατόπιση (ppm) Παράγωγα Υδροξυλικής ομάδας	Χημική μετατόπιση (ppm) Παράγωγα Καρβοξυλικής ομάδας
Τυροσόλη	146.91(s) 138.13(s)	
Καφταρικό οξύ	139.57(d) 138.57(d)	135.13(s)
2-Φαινυλοαιθανόλη	146.89(s)	
Γαλλικό οξύ	141.38(t) 138.46(d)	134.49(s)
Κατεχίνη	145.30(s) 139.00(d) 138.77(d) 138.09(s) 137.66(s)	
Επικατεχίνη	145.94(s) 139.39(d) 138.83(d) 137.91(s) 137.70(s)	
Διϋδρορομπινετίνη	137.09(s) 142.43(t)	

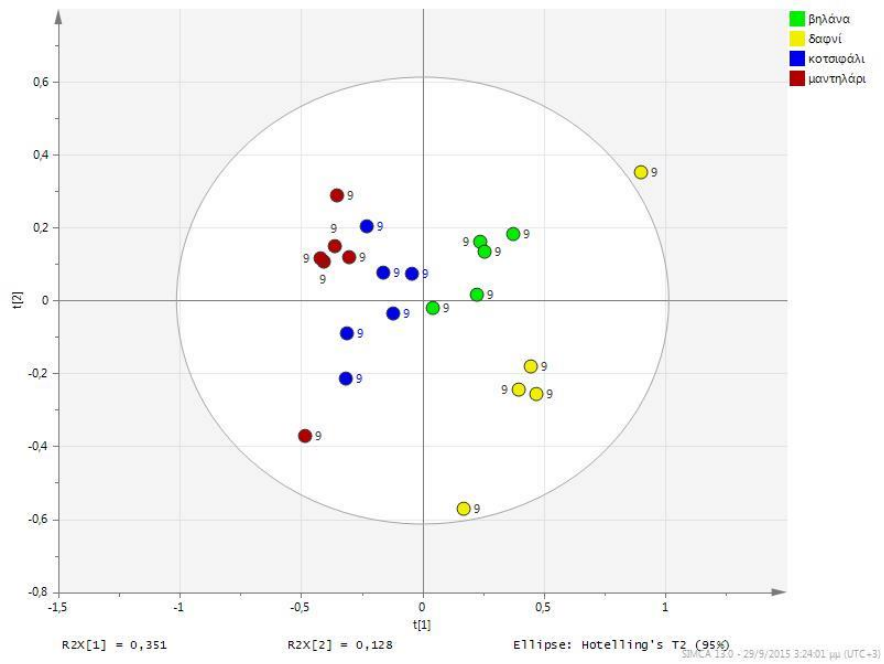
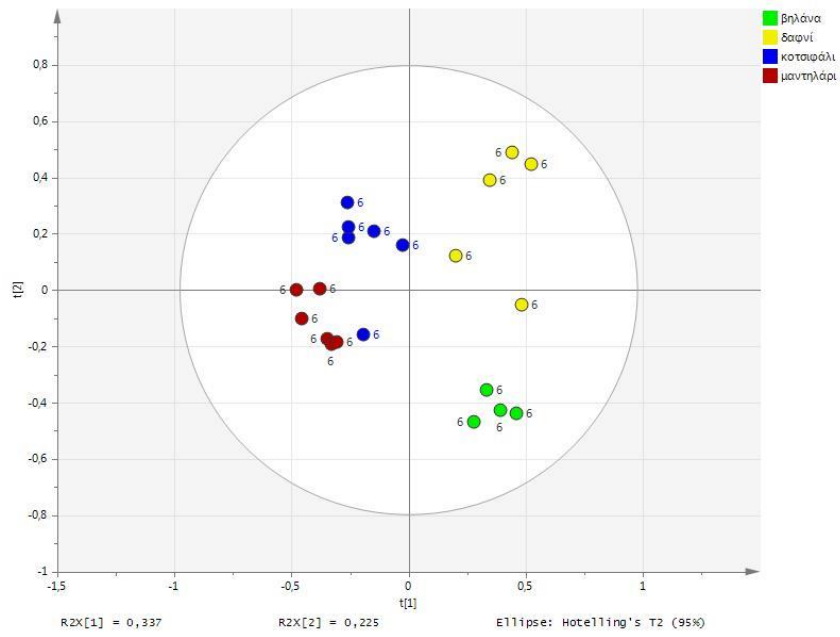
3.3.2 ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΙΝΟΥ ΣΤΑ ΦΑΣΜΑΤΑ ³¹P NMR

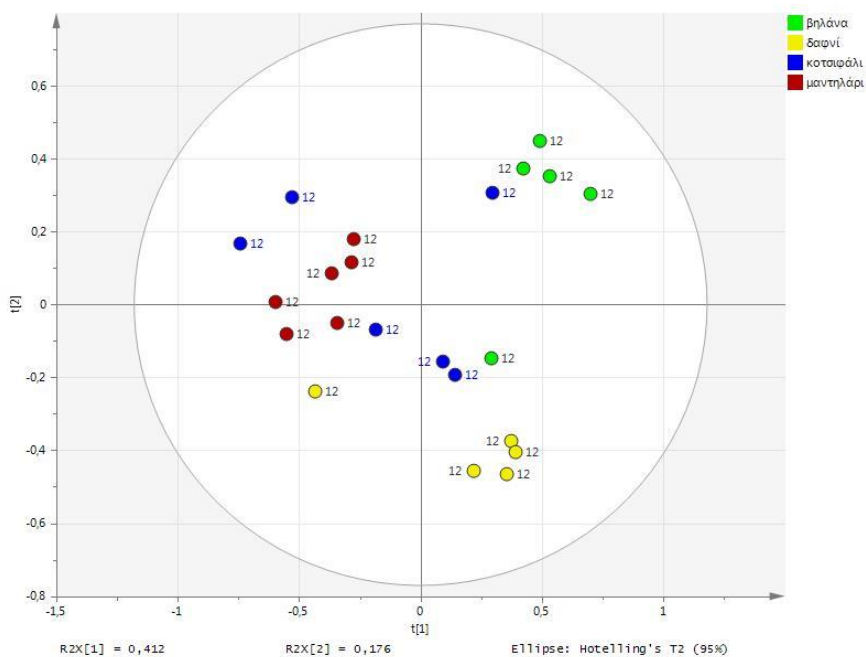
Αναλύθηκαν τα δείγματα της δεύτερης χρονιάς μετά από 3, 6, 9 και 12 μήνες ωρίμανσης στους περιέκτες. Τα φάσματα μεταφέρθηκαν στο πρόγραμμα AMIX όπου δημιουργήθηκε πίνακας με buckets των 0.1 ppm για να χρησιμοποιηθούν τα φασματικά δεδομένα για την μεταβολομική ανάλυση. Η περιοχή του φάσματος ³¹P NMR που χρησιμοποιήθηκε ήταν αυτή μεταξύ 133.0-145.21 ppm και εξαιρέθηκε η περιοχή

145.04-145.21 που αντιστοιχούσε στο εσωτερικό πρότυπο κυκλοεξανόλη που είχε προστεθεί για την ποσοτικοποίηση των φασμάτων.

Τα φασματικά δεδομένα χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) και την ανάλυση διακριτότητας ορθογωνικών μερικών ελαχίστων τετραγώνων OPLS-DA των οίνων (Μαντηλάρι, Κοτσιφάλι, Βηλόνα και Δαφνί). Στην εικόνα 3.38 παρουσιάζονται τα διαγράμματα PCA για τα δείγματα των οίνων που είχαν παραμείνει στους περιέκτες για 3, 6, 9 και 12 μήνες αντίστοιχα. Παρατηρείται καλύτερος διαχωρισμός μεταξύ των τεσσάρων ποικιλιών στους 3 και 6 μήνες της ωρίμανσης των δειγμάτων οίνου και ιδιαίτερα μεταξύ των λευκών ποικιλιών. Τα δείγματα οίνου της ίδιας ποικιλίας διαφοροποιούνται μεταξύ τους περισσότερο στους 9 και 12 μήνες λόγω της μεγαλύτερης συνεισφοράς του περιέκτη.

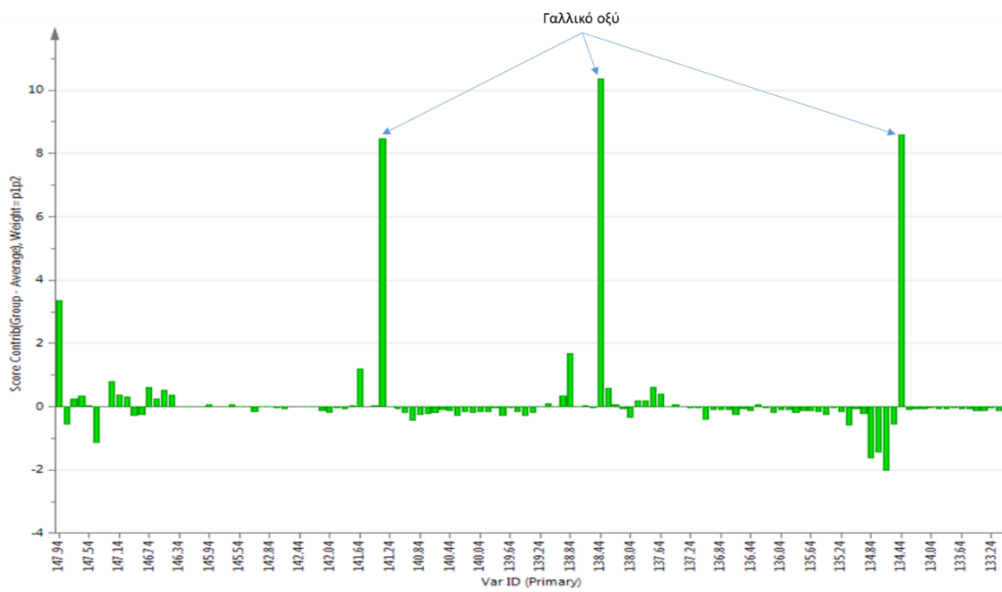
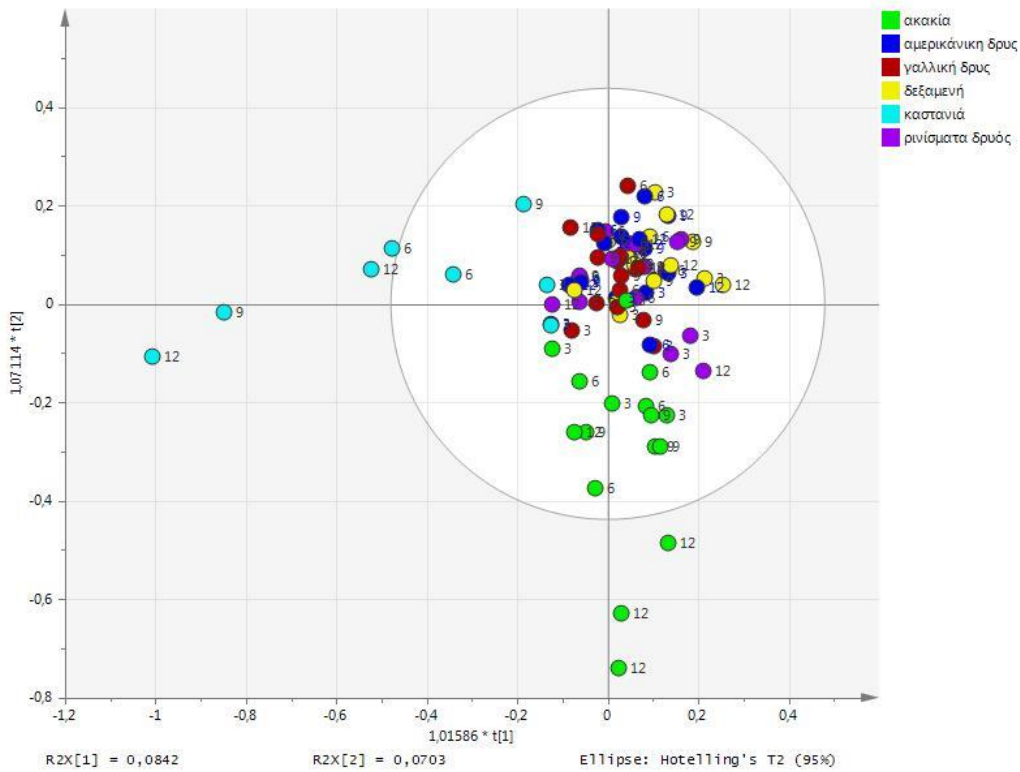






Εικόνα 3.38. Μοντέλο PCA των φασματικών δεδομένων ^{31}P NMR του φαινολικού κλάσματος των ποικιλιών Μαντηλάρι, Κοτσιφάλι, Δαφνί και Βηλάννα μετά από 3, 6, 9 και 12 μήνες ωρίμανσης στους περιέκτες.

Στην εικόνα 3.39 παρουσιάζεται το διάγραμμα OPLS-DA των φασματικών δεδομένων ^{31}P NMR του φαινολικού κλάσματος για όλα τα δείγματα οίνου του Β' τρύγου που είχαν αποθηκευθεί σε διαφορετικούς περιέκτες. Στο διάγραμμα παρουσιάζονται έντονες διαφοροποιήσεις μεταξύ των περιεκτών, κυρίως στα δείγματα που είχαν αποθηκευθεί σε βαρέλια ακακίας και καστανιάς, λόγω της διϋδρορομπινετίνης στους οίνους που είχαν αποθηκευθεί σε βαρέλια ακακίας και του γαλλικού οξέος στα δείγματα οίνου που είχαν αποθηκευθεί σε βαρέλια καστανιάς.



Εικόνα 3.39. OPLS-DA των ποικιλιών Μαντηλάρι, Κοτσιφάλι, Δαφνί και Βηλόνα μετά την ωρίμανση τους σε διαφορετικούς περιέκτες. Επισημαίνονται οι περιοχές (φασματικά πρότυπα) που διαφοροποιούν τα βαρέλια καστανιάς (κάτω).

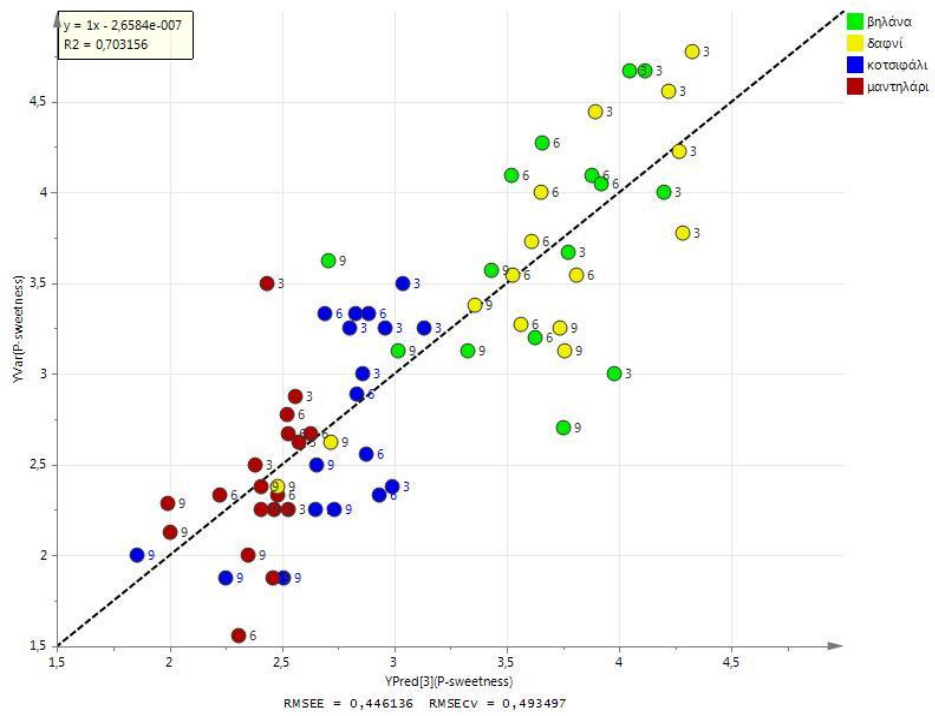
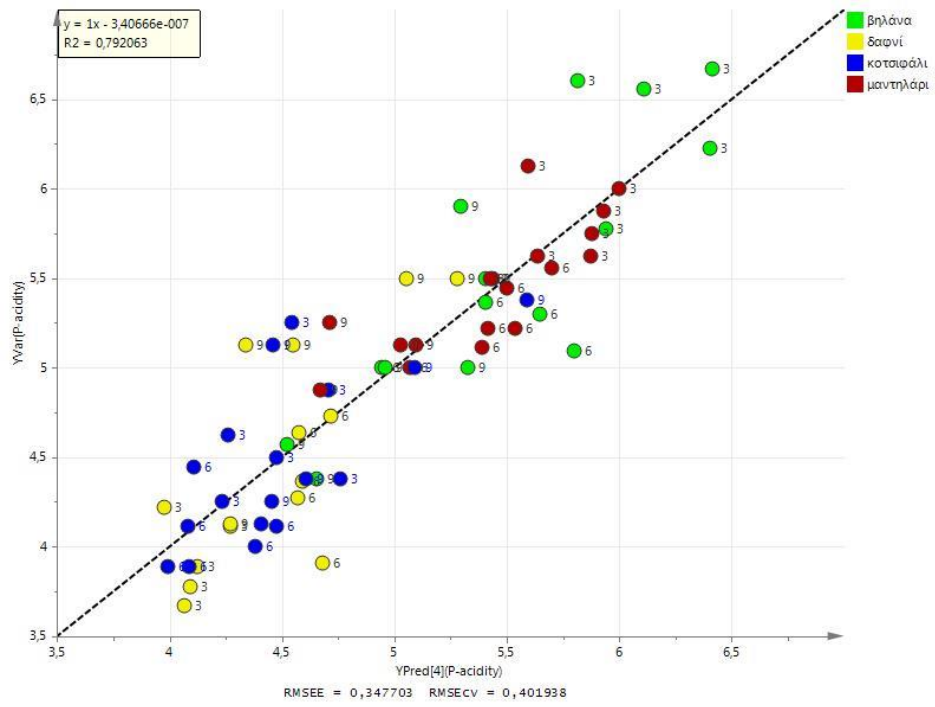
3.4 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΓΕΥΣΤΙΚΩΝ ΔΟΚΙΜΩΝ ΜΕ ΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ NMR

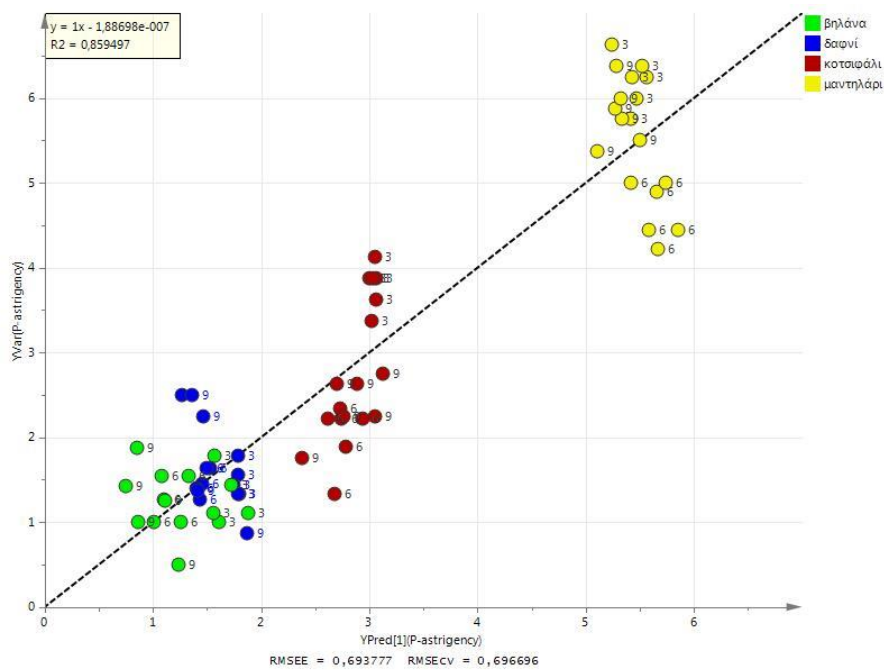
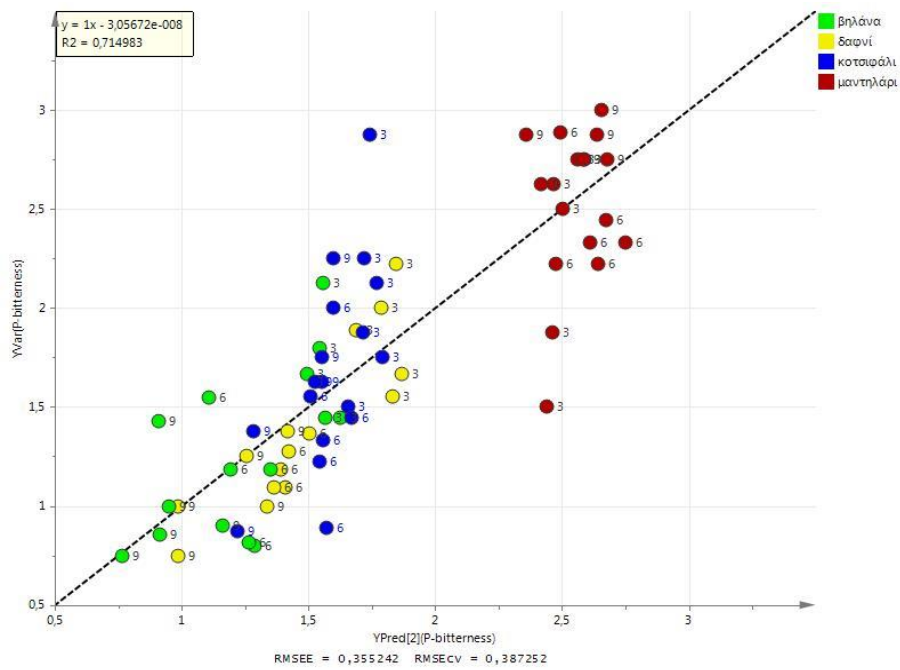
3.4.1 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΓΕΥΣΤΙΚΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΟΙΝΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ NMR ΓΙΑ ΤΟΝ Α ΤΡΥΓΟ

Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των ορθογωνικών μερικών ελαχίστων τετραγώνων (OPLS-Partial Least Square) για να εξεταστεί η συσχέτιση των συγκεντρώσεων των μεταβολιτών που ταυτοποιήθηκαν με την Φασματοσκοπία NMR στους οίνους με τα αποτελέσματα της οργανοληπτικής εξέτασής τους από το πάνελ των επαγγελματιών και να εκτιμηθεί η δυνατότητα του NMR μεταβολικού προφίλ να προβλέψει τις γευστικές ιδιότητες των οίνων. Στο μοντέλο αυτό, οι X-μεταβλητές ήταν οι μεταβολίτες που ταυτοποιήθηκαν με τη Φασματοσκοπία NMR και οι Y-μεταβλητές ήταν τα γευσιγνωστικά αποτελέσματα για το κάθε δείγμα οίνου. Τα γευστικά χαρακτηριστικά του οίνου που αναλύθηκαν ήταν η γλυκύτητα, η οξύτητα, η στυφάδα, και η πικράδα των οίνων όπως αυτές εκτιμήθηκαν από το πάνελ των επαγγελματιών γευσιγνωστών κατά την 9μηνη (Α' τρύγος) ωρίμανση των τεσσάρων διαφορετικών οίνων σε διάφορους περιέκτες.

Από το διάγραμμα βαρύτητας των μεταβλητών, οι ενώσεις που συνεισφέρουν στην οξύτητα του οίνου είναι το τρυγικό οξύ, το μηλικό οξύ, το φουμαρικό οξύ και η ακεταλδεΐδη, ενώ στην γλυκύτητα του οίνου συνεισφέρουν η φρουκτόζη, η ινοσιτόλη, η αλανίνη, η προλίνη και οι α- και β-γλυκόζη. Στην πικράδα και στην στυφάδα συνεισφέρουν οι φαινολικές ενώσεις: καφταρικό οξύ, γαλλικό οξύ, 2-φαινυλοαιθανόλη καθώς και η αλκοόλη 2,3-βουτανοδιόλη.

Με την χρήση των μοντέλων OPLS έγινε σύγκριση των γευσιγνωστικών χαρακτηριστικών του οίνου με τους μεταβολίτες NMR. Τα μοντέλα OPLS των μεταβολιτών NMR (εικόνα 3.40) εμφανίζουν εξαιρετική συσχέτιση με τα γευσιγνωστικά χαρακτηριστικά, σύμφωνα με τους γραμμικούς συντελεστές συσχέτισης.

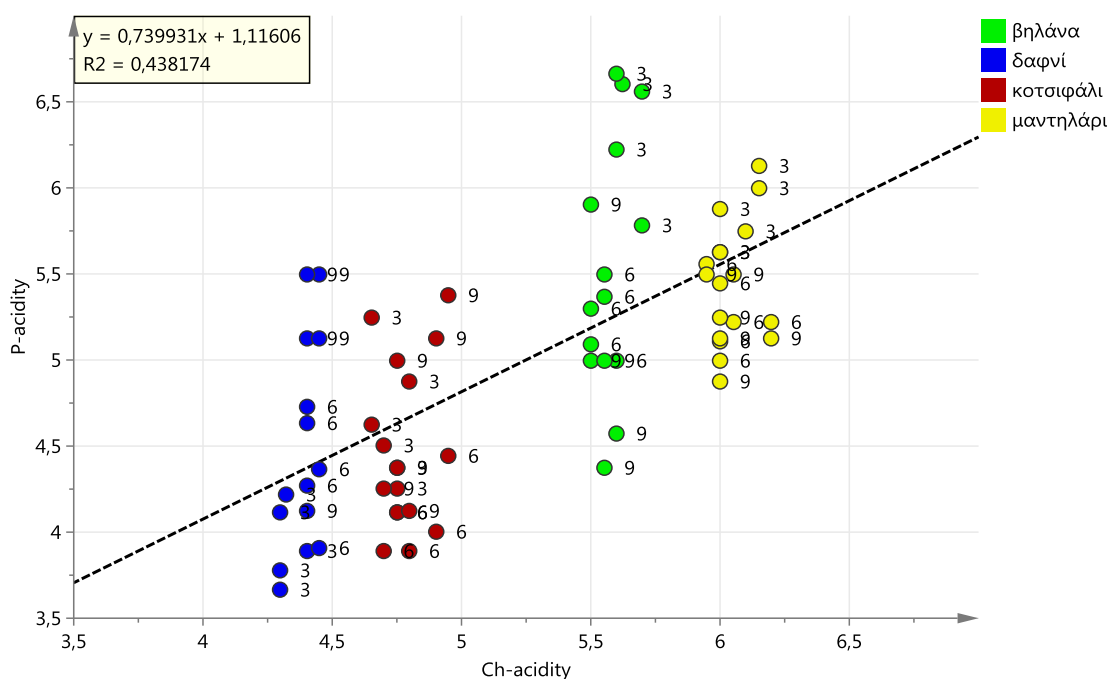




Εικόνα 3.40. Διαγράμματα των γευστικών χαρακτηριστικών (οξύτητα, γλυκύτητα, πικράδα και στυφάδα) των οίνων του Α' τρύγου (άξονας y) και των αντίστοιχων τιμών από μοντέλο OPLS (άξονας x) που βελτιστοποιήθηκε με βάση τους μεταβολίτες NMR.

Στην εικόνα 3.41 παρουσιάζεται η συσχέτιση της γευσιγνωστικής οξύτητας των οίνων με την χημικώς προσδιορισθείσα οξύτητα των οίνων του Α' τρύγου. Η σύγκριση με την οξύτητα όπως προβλέπεται από το μοντέλο OPLS των μεταβολιτών NMR

δείχνει ότι το μοντέλο OPLS των μεταβολιτών NMR (εικόνα 3.41, πάνω) εμφανίζει εξαιρετική συσχέτιση με την γευσιγνωστική οξύτητα ($R^2=0,79$), ενώ η κλασική χημική οξύτητα έχει μικρή συσχέτιση ($R^2=0,44$). Η καλύτερη συσχέτιση για το μοντέλο OPLS πιθανώς οφείλεται στο γεγονός ότι με την φασματοσκοπία NMR υπολογίζεται ξεχωριστά η συγκέντρωση όλων των οργανικών οξέων που συνεισφέρουν στην οξύτητα των οίνων, πέραν του τρυγικού. Τα οργανικά οξέα διαφοροποιούνται ως προς την όξινη γεύση τους και την ικανότητα επίδρασης στην οξύτητα όπως την αντιλαμβάνεται το πάνελ των γευσιγνωστών, κι αυτό επιτρέπει στη φασματοσκοπία NMR, η οποία τα ποσοτικοποιεί ξεχωριστά, να μοντελοποιεί την γευσιγνωστική οξύτητα με πολύ ικανοποιητικότερο τρόπο από τις κλασικές μεθόδους χημικής ανάλυσης.



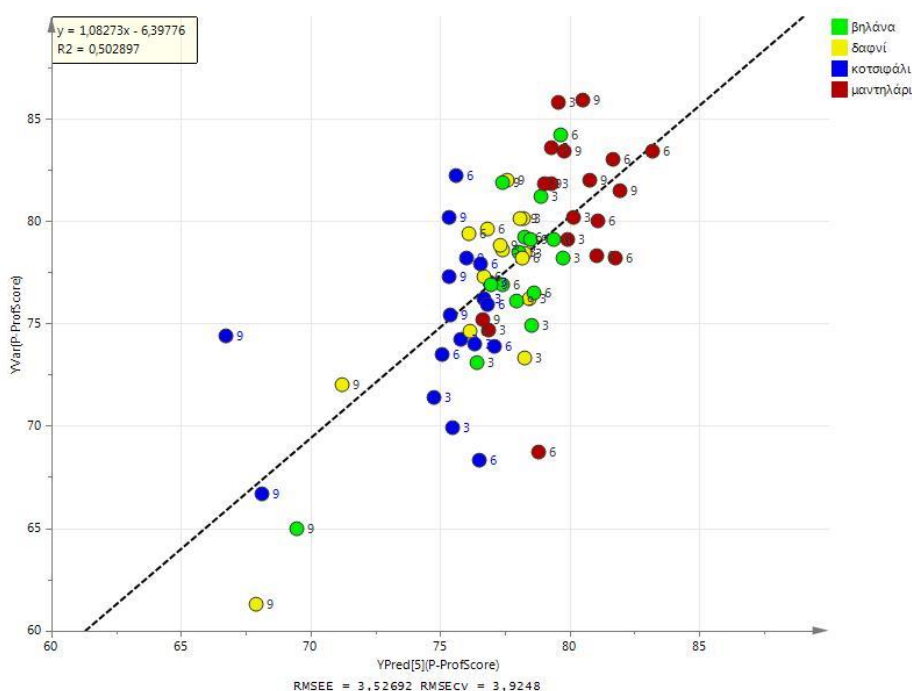
Εικόνα 3.41. Συσχέτιση της γευσιγνωστικής οξύτητας των οίνων με την οξύτητα όπως μετρήθηκε μέσω κλασικής χημικής ανάλυσης.

Για τη διερεύνηση της δυνατότητας να προβλεφθούν οι βέλτιστες συνθήκες ωρίμανσης των οίνων έγινε συσχέτιση της συνολικής βαθμολογίας του κάθε δείγματος οίνου από το πάνελ των γευσιγνωστών με τα μεταβολομικά δεδομένα που μετρήθηκαν με την φασματοσκοπία NMR. Αναζητήθηκαν τα χημικά χαρακτηριστικά του οίνου

(μεταβολίτες) τα οποία συσχετίζονται με υψηλές βαθμολογίες στη γευσιγνωσία, και επομένως βέλτιστες συνθήκες ωρίμανσης.

Στο Σχήμα 3.42 παρουσιάζεται το διάγραμμα OPLS, που δείχνει την συσχέτιση των βαθμών των οίνων του Α' τρύγου όπως προβλέπονται από το μοντέλο OPLS των NMR μεταβολιτών με τους αντίστοιχους συνολικούς βαθμούς του πάνελ των επαγγελματιών γευσιγνωστών.

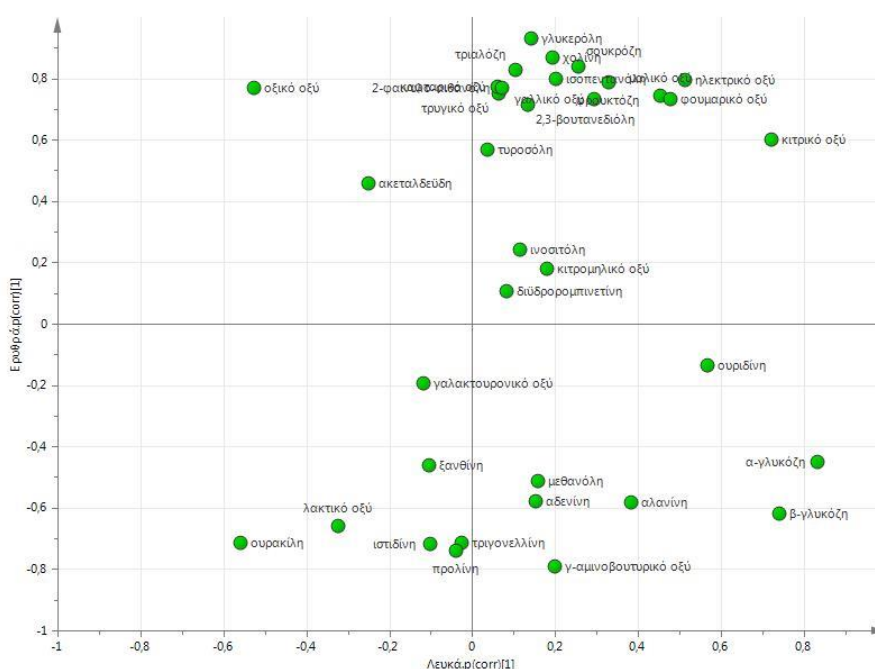
Η συσχέτιση που παρατηρείται είναι αρκετά καλή, αν ληφθεί υπ' όψιν ότι η ανάλυση του οίνου με τη φασματοσκοπία NMR αφορούσε τον ποσοτικό προσδιορισμό μη πτητικών ενώσεων, λόγω του ακολουθούμενου πειραματικού πρωτοκόλλου. Ένα μεγάλο και πολύ σημαντικό μέρος της βαθμολογίας του πάνελ των επαγγελματιών γευσιγνωστών αφορά το αρωματικό προφίλ των οίνων, που επηρεάζεται κυρίως από πολύ πτητικές αρωματικές ενώσεις οι οποίες δεν μπορούν να προσδιοριστούν με το πρωτόκολλο φασματοσκοπίας NMR που χρησιμοποιήθηκε.



Εικόνα 3.42. Διάγραμμα συσχέτισης της προφλεθεισης βαθμολογίας των οίνων του Α' τρύγου με βάση το μοντέλου OPLS των NMR μεταβολιτών με τις πραγματικές βαθμολογίες του πάνελ των επαγγελματιών για τους ίδιους οίνους.

Για την ταυτοποίηση των μεταβολιτών που συνεισφέρουν είτε θετικά είτε αρνητικά στην ποιότητα των οίνων αναπτύχθηκαν ξεχωριστά μοντέλα OPLS για τους λευκούς και τους ερυθρούς οίνους, των οποίων το διάγραμμα SUS-plot παρουσιάζεται στην εικόνα 3.43.

Οι ενώσεις που βρέθηκαν να συνεισφέρουν θετικά στην καλύτερη βαθμολογία τόσο των λευκών και ερυθρών οίνων είναι αρκετές, και βρίσκονται στο άνω δεξιά τεταρτημόριο της εικόνας 3.43, και περιλαμβάνουν τα οργανικά οξέα κιτρικό, ηλεκτρικό, φουμαρικό και μηλικό, καθώς και τα σάκχαρα σουκρόζη και φρουκτόζη, ενώ οι ενώσεις που συνεισφέρουν αρνητικά και για τους λευκούς και για τους ερυθρούς οίνους είναι το λακτικό οξύ και η ουρακίλη. Για τους λευκούς οίνους, πολύ καλή συσχέτιση με υψηλή βαθμολογία από το πάνελ γευστηγνοστών, και επομένως βέλτιστες συνθήκες ωρίμανσης έχουν τα σάκχαρα α- και β-γλυκόζη (τα οποία ωστόσο επηρεάζουν αρνητικά την βαθμολογία των ερυθρών οίνων), η ουριδίνη και το αμινοξύ αλανίνη, ενώ αρνητική συσχέτιση εμφανίζουν το οξικό οξύ και η ακεταλδεύδη.



Εικόνα 3.43 Διάγραμμα SUS (Shared and Unique Structure Plot) που δείχνει την θετική ή αρνητική συσχέτιση των μεταβολιτών NMR με τις βαθμολογίες του πάνελ των επαγγελματιών, ξεχωριστά για τους λευκούς και ερυθρούς οίνους του Α' τρύγου.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία η Φασματοσκοπία NMR εφαρμόστηκε για την ανάλυση της διαδικασίας παλαίωσης του οίνου, και χρησιμοποιήθηκε για τον ποιοτικό και ποσοτικό των οργανικών ενώσεων του οίνου τεσσάρων γηγενών κρητικών ποικιλιών (Δαφνί, Βηλάνα, Κοτσιφάλι, Μαντηλάρι) για δύο συνεχόμενους τρυγητούς. Οι οίνοι αποθηκεύθηκαν σε διαφορετικούς περιέκτες (δεξαμενή, δεξαμενή με ρινίσματα δρυός, αμερικανική δρυς, γαλλική δρυς, ακακία, καστανιά) για διάστημα ενός έτους και αναλύονταν μετά από δειγματοληψία κάθε τρεις μήνες, ενώ εξετάστηκε και η επίδραση της παραμονής των οίνων επί ένα έτος σε φιάλες, μετά την ωρίμανσή τους σε περιέκτες.

Η Φασματοσκοπία NMR χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό πλέον των 40 χημικών ενώσεων που αποτελούν το μη πτητικό μεταβόλωμα (metabolome) των τεσσάρων οίνων που μελετήθηκαν.

Βρέθηκε ότι η χημική σύσταση των οίνων διαφοροποιείται τόσο ανάλογα με τον τύπο όσο και με την ποικιλία των οίνων. Οι φαινολικές ενώσεις 2-φαινυλοαιθανόλη, τυροσόλη και καφταρικό οξύ βρέθηκαν σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στην ποικιλία Μαντηλάρι, ενώ οι ενώσεις τριγονελλίνη και προλίνη βρέθηκαν σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στην ποικιλία Κοτσιφάλι. Οι λευκές ποικιλίες είχαν αυξημένες συγκεντρώσεις στις ενώσεις μηλικό οξύ και κιτρικό οξύ.

Η ανάλυση των μεταβολομικών δεδομένων των οίνων με διάφορες πολυπαραμετρικές στατιστικές μεθόδους ανάλυσης (Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών PCA, Ανάλυση Διακριτότητας Ορθογωνικών Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων OPLS-DA), έδειξε ότι αυτά μπορούν να αποτελέσουν τη βάση για την ανάπτυξη μεταβολομικών μοντέλων NMR τα οποία διακρίνουν τις γηγενείς κρητικές ποικιλίες και κατέχουν ισχυρή προβλεπτική ικανότητα. Η διαφοροποίηση ανάμεσα στις ποικιλίες παραμένει ισχυρή καθ' όλη τη διάρκεια της ωρίμανσης των οίνων σε περιέκτες, παρ' όλο που η χημική σύσταση των οίνων αλλάζει και εξελίσσεται διαφορετικά ανάλογα με τον τύπο του οίνου και τον περιέκτη.

Οι αλλαγές που επιφέρει η ωρίμανση των οίνων στη χημική τους σύσταση μελετήθηκαν επίσης αναλυτικά με τη Φασματοσκοπία NMR, και σε διάφορους περιέκτες. Βρέθηκε ότι οι περισσότεροι μεταβολίτες του οίνου εμφανίζουν θετική συσχέτιση με το χρόνο ωρίμανσης και στους λευκούς και στους ερυθρούς οίνους, με εξαίρεση τις ενώσεις 2,3-βουτανοδιόλη, τριαλόζη και τα οργανικά οξέα κιτρικό,

φουμαρικό και μηλικό που εμφάνισαν αρνητική συσχέτιση. Κάποιες αντίστροφες τάσεις που παρατηρήθηκαν στην ωρίμανση των λευκών και ερυθρών οίνων (αύξηση της α-γλυκόζης και της ισοπεντανόλης με το χρόνο ωρίμανσης στα λευκά κρασιά, αύξηση του κιτρομηλικού οξέος στα ερυθρά) είναι ιδιαίτερα σημαντικές, όπως και αντίστροφες τάσεις που εμφανίζονται σε ποικιλίες ίδιου τύπου, όπως για παράδειγμα η αύξηση της σουκρόζης και της γλυκερόλης με το χρόνο ωρίμανσης στην ερυθρή ποικιλία Μαντηλάρι, ενώ ελαττώνονται στο Κοτσιφάλι. Οι παρατηρήσεις αυτές δείχνουν ότι η ωρίμανση των οίνων σε περιέκτες παρουσιάζει ανομοιογένεια ανάλογα με τον τύπο και την ποικιλία του οίνου, η οποία πρέπει να ληφθεί σοβαρά υπόψη από στατιστικά μοντέλα ποικιλιακής ταυτοποίησης των οίνων με βάση μεταβολομικές NMR και MS προσεγγίσεις. Από την ανάλυση των οίνων ως προς τον χρόνο ωρίμανσης με τη μέθοδο των ορθογωνικών μερικών ελαχίστων τετραγώνων OPLS, βρέθηκε ότι η διαδικασία της ωρίμανσης μπορεί να συσχετισθεί με το εξελισσόμενο NMR μεταβολομικό προφίλ των οίνων. Η εσωτερική επικύρωση (cross validation) των μοντέλων OPLS που αναπτύχθηκαν με βάση τα δεδομένα NMR έδειξε ότι αυτά είναι σε θέση να υπολογίζουν τον χρόνο ωρίμανσης του οίνου με αρκετά καλή ακρίβεια που κυμαίνεται ανάμεσα σε 1 και 2 μήνες.

Ένα σημαντικό εύρημα που προέκυψε από την ανάλυση των ίδιων οίνων για δύο διαδοχικούς τρύγους, είναι ότι το μεταβολομικό NMR προφίλ των οίνων πιθανώς επηρεάζεται τόσο από πεδιοκλιματικούς παράγοντες (ηλιοφάνεια, καιρικές συνθήκες, κλπ.), όσο και από διαφοροποιήσεις στις συνθήκες οινοποίησης. Πολλοί μεταβολίτες έδειξαν αρκετά σημαντική διαφοροποίηση ανάμεσα στον Α' και το Β' τρύγο, ενώ κάποιοι δεν ανιχνεύθηκαν και τις δύο χρονιές. Επιπλέον, είναι σημαντικό ότι κάποιες ενώσεις του οίνου που προέρχονται από το ξύλο των βαρελιών ανιχνεύθηκαν σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις στους οίνους του Β' τρύγου, γεγονός που αποδόθηκε στην εξάντληση των βαρελιών.

Επιπλέον ταυτοποιήθηκε, μόνο στα δείγματα οίνου της ποικιλίας Κοτσιφάλι (δεξαμενή, δεξαμενή με ρινίσματα δρυός, αμερικάνικη δρυς) του Α τρύγου μετά από 12 μήνες ωρίμανσης στους περιέκτες, η ένωση 1,3-προπανοδιόλη, η οποία μπορεί να συντεθεί μέσω γαλακτικών βακτηρίων από την γλυκερόλη.

Η μέθοδος της Ανάλυσης Διακριτότητας Ορθογωνικών Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (OPLS-DA) χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία για την διαφοροποίηση των

οίνων σύμφωνα με τον περιέκτη στον οποίο είχαν διατηρηθεί για ωρίμανση για διάστημα 12 μηνών. Η διάκριση ήταν εξαιρετική για τα δείγματα οίνου που είχαν αποθηκευθεί σε βαρέλια ακακίας, όπου ταυτοποιήθηκαν οι πολυφαινόλες διϋδρορομπινετίνη και ρομπινετίνη, καθώς και για τα δείγματα που είχαν αποθηκευθεί σε βαρέλια καστανιάς, τα οποία είχαν αυξημένες συγκεντρώσεις γαλλικού οξέος και γαλλικού αιθυλεστέρα. Οι συγκεντρώσεις των συγκεκριμένων ενώσεων αυξάνονταν με το χρόνο παραμονής του οίνου στους περιέκτες καθ' όλη τη διάρκεια της ωρίμανσης των οίνων.

Στην παρούσα διατριβή καταδείχθηκε ότι με την μεθοδολογία της εκχύλισης στερεάς φάσης είναι δυνατή η ακριβέστερη και αναλυτικότερη μελέτη του φαινολικού κλάσματος του οίνου με την χρήση της Φασματοσκοπίας ^{31}P NMR και ^1H NMR. Αυτό έγινε δυνατό με την απομόνωση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών ενώσεων, αφού πρώτα είχε γίνει απομάκρυνση των μικρότερων οργανικών ενώσεων του οίνου (αλκοόλες, σάκχαρα, αμινοξέα, οργανικά οξέα). Βρέθηκε ότι τα φάσματα NMR του φαινολικού προφίλ των οίνων μπορούν να χρησιμοποιηθούν απευθείας (metabolic fingerprinting) για την κατάστρωση στατιστικών μοντέλων διάκρισης της ποικιλίας και του τύπου του περιέκτη ωρίμανσης των οίνων. Ιδιαίτερα όσον αφορά την διάκριση μεταξύ των περιεκτών, βρέθηκε ότι η διαφοροποίηση των βαρελιών ακακίας και καστανιάς με βάση το φαινολικό αποτύπωμα ^{31}P NMR και ^1H NMR είναι πολύ καλύτερη από αυτήν που επιτυγχάνεται με βάση το μεταβολικό προφίλ του πλήρους μεταβολώματος των οίνων.

Τέλος, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των ορθογωνικών μερικών ελαχίστων τετραγώνων (OPLS-Partial Least Square) για να εξεταστεί η συσχέτιση των συγκεντρώσεων των μεταβολιτών που ταυτοποιήθηκαν με την Φασματοσκοπία NMR στους οίνους με τα αποτελέσματα της οργανοληπτικής εξέτασής τους από το πάνελ των επαγγελματιών και να εκτιμηθεί η συσχέτιση του NMR μεταβολικού προφίλ με τις γευστικές ιδιότητες των οίνων. Βρέθηκε ότι η συσχέτιση ανάμεσα στην οργανοληπτική οξύτητα των οίνων (πάνελ γευσιγνωστών) και το μεταβολομικό προφίλ των οίνων ήταν εξαιρετική και το αντίστοιχο μοντέλο OPLS είχε πολύ καλή προβλεπτική ικανότητα. Βρέθηκε ότι με την Φασματοσκοπία NMR η μοντελοποίηση της γευσιγνωστικής οξύτητας των οίνων ήταν πολύ πιο ακριβής από τις κλασικές μεθόδους χημικής ανάλυσης. Πολύ καλή συσχέτιση του NMR μεταβολικού προφίλ των οίνων παρατηρήθηκε επίσης με τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της γλυκύτητας, της

πικράδας και της στυφάδας των οίνων, ιδιαίτερα κατά τον Α' τρύγο. Τέλος υπήρξε αρκετά καλή συσχέτιση των βαθμών των οίνων του Α' τρύγου όπως προβλέπονται από το μοντέλο OPLS των μεταβολιτών NMR με τους αντίστοιχους συνολικούς βαθμούς του πάνελ των επαγγελματιών γευσιγνωστών.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1

Πίνακας 1. Συγκεντρώσεις (mg/L) των ενώσεων που ποσοτικοποιήθηκαν με τη Φασματοσκοπία NMR στα δείγματα οίνου του Α' τρύγου (Σεπτέμβριος 2012). Με Δ, Β, Κ, και Μ συμβολίζονται οι ποικιλίες Δαφνί, Βηλόνα, Κοτσιφάλι και Μαντηλάρι αντίστοιχα. Οι αριθμοί στην πρώτη στήλη συμβολίζουν τον τύπο του περιέκτη ως εξής: -1 Inox (μάρτυρας), -2 oinostick γαλλικής δρυός, -3 αμερικάνικη δρυός, -4 ακακία, -5 γαλλική δρυός, -6 καστανιά.

Δείγμα	Ωρίμανση	Ακεταλδεΐδη	Τριγωνελλίνη	Ισσιδίνη	Ουριδίνη	Γαλλικό οξύ	Τυροσόλη	Σουκρόζη	Γαλακτοουρικό οξύ	α-γλυκόζη	Τριαλόζη	Β-γλυκόζη	Τρυγικό οξύ	Φρουκτόζη	Γλυκερόλη	Μεθανόλη	Χολίνη	Κιτρικό οξύ	Μηλικό οξύ	Ηλεκτρικό οξύ
Δ	0	0,00	7,54	5,76	8,55	2,13	5,27	22,89	241,70	30,63	0,00	142,28	765,41	114,73	4763,36	12,78	11,44	124,44	838,08	464,77
Β	0	0,00	9,60	6,21	7,33	0,43	5,89	35,68	159,19	36,03	54,92	101,83	1385,30	83,19	5340,07	11,51	15,60	141,97	1367,15	567,73
Κ	0	0,00	8,91	13,18	1,22	11,06	18,09	66,60	252,38	14,73	34,33	25,78	683,27	0,00	5634,30	18,00	8,07	162,47	0,00	551,36
Μ	0	0,00	6,86	2,15	3,66	22,12	27,42	53,58	226,17	16,21	100,73	0,00	1099,39	26,57	7024,63	11,16	23,84	204,39	507,04	948,43
Δ-1	3	0,00	12,34	9,99	17,09	1,98	9,35	32,24	360,13	68,46	0,00	242,32	1178,93	134,92	7012,42	20,35	19,04	141,33	1331,51	677,32
Δ-2	3	0,00	10,97	9,12	18,32	2,08	9,54	32,25	356,25	79,27	0,00	243,22	853,62	141,96	6702,77	20,40	18,17	155,80	1356,99	646,64
Δ-3	3	0,00	11,66	8,67	13,43	2,36	8,35	33,58	363,04	75,67	0,00	228,80	680,27	142,40	6757,56	19,86	18,11	115,61	1354,98	571,27
Δ-4	3	0,00	10,97	9,88	13,43	2,09	8,29	30,95	365,95	75,67	0,00	211,69	1244,22	143,06	6776,21	19,81	18,40	97,77	1324,81	657,85
Δ-5	3	0,00	12,34	9,75	17,09	3,19	9,09	33,23	382,45	82,87	0,00	231,51	682,52	142,88	7071,59	21,20	18,46	89,80	1412,64	688,97
Β-1	3	0,00	11,66	16,12	46,40	0,43	6,55	38,64	205,79	81,07	42,33	124,31	2413,77	99,50	6744,44	13,40	21,76	201,47	1709,65	707,71
Β-2	3	1,76	11,66	18,35	56,17	0,85	5,21	41,72	214,52	55,85	47,45	67,56	2641,53	85,45	6771,15	14,36	22,05	217,45	1765,97	732,63
Β-3	3	0,44	9,60	18,47	68,38	1,28	6,65	43,51	198,99	84,68	50,47	131,52	1855,45	118,15	6270,18	14,69	20,43	152,55	1584,27	663,60
Β-4	3	0,66	11,66	14,69	40,29	0,43	6,69	43,42	225,20	72,06	51,46	104,49	1853,95	63,67	6384,37	11,69	19,97	150,31	1647,30	674,37
Β-5	3	0,44	12,34	20,46	79,37	1,70	7,72	54,57	220,35	91,88	57,17	150,43	2050,19	138,96	7010,81	13,40	22,92	174,79	1713,67	722,75
Κ-1	3	0,00	17,14	13,85	2,44	12,76	22,87	79,06	376,63	30,63	42,64	59,45	1175,56	50,92	7150,56	23,82	11,86	212,95	0,00	1111,08
Κ-2	3	0,00	17,83	13,31	3,66	12,33	23,04	78,61	390,22	27,02	42,03	48,64	1160,17	52,10	7108,20	24,14	11,86	210,81	0,00	1094,60
Κ-3	3	0,00	17,14	14,51	3,66	14,89	25,67	90,27	402,84	36,03	35,35	53,15	1234,84	62,67	7873,00	27,34	13,72	228,02	0,00	1161,86
Κ-4	3	0,00	17,83	15,03	3,66	17,01	26,63	88,74	365,95	36,03	34,46	54,95	1214,58	49,43	7718,98	26,33	13,77	210,64	0,00	1021,88
Κ-5	3	0,00	17,83	13,93	2,44	14,89	23,50	82,30	404,78	30,63	30,20	47,74	1130,16	59,95	7506,03	25,69	12,44	222,84	0,00	1128,82
Κ-6	3	0,00	17,14	13,72	2,44	49,33	25,77	81,55	386,34	36,03	27,80	63,96	1229,59	60,32	7819,13	26,54	12,79	231,90	0,00	1101,68
Μ-1	3	3,96	9,60	1,06	3,66	37,43	26,82	76,61	241,70	3,60	129,51	0,00	1888,09	48,16	7783,45	12,76	25,52	208,35	549,10	1352,13
Μ-2	3	2,42	9,60	1,50	2,44	58,69	37,58	98,89	300,92	9,01	132,58	0,00	2080,96	62,79	8688,92	14,36	28,70	236,34	591,34	1403,76
Μ-3	3	1,32	6,17	1,48	1,22	38,70	26,58	117,47	165,02	7,21	128,92	0,00	1945,50	59,69	8158,71	13,51	26,91	214,32	561,17	1378,98
Μ-4	3	1,10	8,91	1,71	2,44	59,97	31,11	113,54	267,91	7,21	126,04	0,00	2009,29	55,62	8449,03	12,28	26,91	202,19	559,16	1399,33
Μ-5	3	1,32	8,23	1,43	2,44	41,25	26,62	106,71	253,35	9,01	123,63	0,00	1993,53	63,24	7877,15	13,24	26,16	207,92	544,41	1308,77
Μ-6	3	1,54	9,60	1,58	2,44	66,35	32,93	115,44	255,29	5,40	128,94	0,00	1975,90	59,32	7976,38	11,80	26,33	210,23	559,83	1336,65
Δ-1	6	0,00	13,03	10,35	15,87	1,70	8,91	23,57	313,53	90,08	0,00	242,32	1774,03	168,05	6253,60	18,10	19,16	114,95	1466,27	645,31
Δ-2	6	0,00	11,66	10,55	14,65	2,13	8,79	22,10	305,77	91,88	0,00	254,03	1829,56	177,25	6243,70	18,69	19,45	122,70	1533,32	689,12
Δ-3	6	0,00	10,97	8,83	12,21	2,55	8,10	22,40	288,30	86,48	0,00	243,22	1829,94	168,19	5843,34	17,30	17,01	118,74	1474,99	604,16
Δ-4	6	0,00	10,97	9,36	12,21	2,13	8,56	21,08	309,65	93,68	0,00	265,74	1906,86	167,13	6357,43	19,06	19,50	134,80	1476,33	650,92
Δ-5	6	0,00	10,97	9,40	13,43	2,55	8,25	21,05	300,92	77,47	0,00	271,14	1378,17	162,18	5985,62	20,51	18,40	119,26	1491,75	616,99

B-1	6	0,00	10,97	12,63	43,96	0,85	6,56	39,03	157,25	84,68	34,58	218,80	2167,63	112,82	5746,42	12,71	21,12	173,63	1609,08	693,99
B-2	6	0,44	11,66	13,80	58,61	1,28	6,92	44,32	161,14	86,48	36,88	182,78	2180,01	128,93	6104,19	15,59	22,05	171,79	1678,14	726,73
B-3	6	0,22	11,66	16,29	74,48	2,13	7,30	38,04	170,84	104,49	34,84	266,52	2150,37	169,56	6265,80	15,43	23,50	200,48	0,00	735,29
B-4	6	0,44	13,03	17,81	43,96	1,70	8,33	36,49	194,14	102,69	37,05	259,32	2523,34	148,43	6756,87	17,57	24,02	203,58	1538,01	798,57
B-5	6	0,22	12,34	16,40	74,48	2,55	7,26	36,36	165,02	109,90	37,30	236,81	2133,49	129,90	6462,42	17,36	23,21	198,35	1287,26	704,46
K-1	6	0,00	17,14	15,03	4,88	13,61	25,21	58,67	370,81	48,64	17,53	80,17	1502,37	58,54	7119,94	25,15	12,96	204,95	0,00	1036,33
K-2	6	0,00	19,20	16,01	4,88	17,86	29,68	69,85	395,07	57,65	18,28	96,39	1653,58	60,26	7952,20	27,93	15,57	231,93	0,00	1128,38
K-3	6	0,00	17,14	14,64	3,66	16,16	25,75	82,15	344,60	41,44	16,56	69,36	1652,83	70,07	7296,06	26,70	14,01	211,13	0,00	1046,07
K-4	6	0,00	19,20	16,23	4,88	19,56	27,61	83,81	391,19	54,05	17,43	108,10	1542,14	57,83	7734,87	27,71	15,86	227,24	0,00	1123,36
K-5	6	0,00	19,20	16,02	3,66	21,69	28,35	85,19	411,57	57,65	15,15	99,09	1586,79	78,65	8062,48	29,10	15,57	244,18	0,00	1160,53
K-6	6	0,00	19,20	15,53	3,66	54,01	28,78	84,15	399,93	52,25	24,40	99,99	1579,29	64,54	7931,25	26,86	14,93	239,74	0,00	1133,54
M-1	6	1,98	9,60	1,31	3,66	53,16	32,15	106,50	290,24	7,21	95,07	0,00	2479,81	46,98	8392,85	14,52	28,53	194,23	506,19	1389,30
M-2	6	1,54	9,60	2,01	1,22	68,47	35,42	117,23	340,71	25,22	119,34	0,00	2423,15	79,77	9268,40	13,72	30,56	224,81	642,29	1421,02
M-3	6	0,88	10,97	1,70	1,22	59,12	32,10	113,18	328,09	18,02	129,57	0,00	2491,82	85,12	9153,52	14,86	30,27	212,71	623,52	1376,62
M-4	6	0,66	10,08	2,67	3,66	71,88	36,14	120,80	329,07	14,41	108,91	0,00	2338,36	53,56	9037,25	15,14	28,99	201,68	638,94	1326,17
M-5	6	0,66	9,60	2,31	2,44	85,91	41,25	141,56	340,71	19,82	121,18	0,00	2580,37	95,37	9419,20	17,47	31,19	231,60	693,25	1500,81
M-6	6	0,66	8,23	1,44	3,66	108,88	36,30	119,89	313,53	10,81	113,17	0,00	2305,71	76,73	8678,10	14,28	28,94	211,05	593,35	1289,15
Δ-1	9	0,66	10,97	16,53	1,22	2,13	8,70	10,05	322,27	23,42	0,00	31,53	1405,94	149,55	6165,89	17,94	18,98	0,00	0,00	442,50
Δ-2	9	0,22	11,66	14,22	0,00	2,55	8,31	17,88	331,01	57,65	0,00	177,46	1316,26	151,41	6565,10	20,08	19,10	40,81	0,00	586,61
Δ-3	9	0,22	11,66	17,89	13,43	4,25	9,04	17,17	336,83	115,30	0,00	286,45	1362,79	219,91	6531,71	19,97	19,16	139,97	1548,74	596,05
Δ-4	9	0,66	10,97	12,20	19,54	2,98	8,29	13,85	301,89	93,68	0,00	232,41	1446,84	167,89	6148,16	17,41	19,85	119,60	1454,21	599,44
Δ-5	9	0,22	11,66	12,44	13,43	5,95	9,48	16,21	337,80	108,10	0,00	274,74	1428,83	212,48	6639,46	23,44	20,02	137,09	1560,14	637,94
B-1	9	0,00	12,34	20,63	48,84	0,85	7,31	39,45	184,43	118,91	14,39	269,34	2030,68	149,86	6427,65	13,35	24,54	177,09	1774,01	740,75
B-2	9	1,54	12,34	21,55	19,54	1,70	7,07	33,38	190,26	70,26	9,04	164,85	2149,25	132,61	5997,59	13,46	21,88	162,56	0,00	717,88
B-3	9	0,44	10,97	20,78	76,92	5,10	6,76	22,06	198,99	167,55	11,54	420,67	1983,02	160,73	6197,20	14,10	26,16	180,82	0,00	704,90
B-4	9	1,10	12,34	15,47	53,72	2,98	8,39	27,85	181,52	118,91	8,84	249,52	2037,43	145,11	6314,38	13,67	25,06	185,23	0,00	746,06
B-5	9	0,44	11,66	21,01	75,70	6,38	7,07	32,27	175,70	117,10	12,84	314,38	2080,21	180,32	6523,89	15,38	24,25	188,73	0,00	740,60
K-1	9	0,00	14,40	14,98	2,44	11,91	23,22	57,11	288,30	11,62	0,00	6,20	1385,68	25,74	5746,19	21,15	11,86	0,00	0,00	941,79
K-2	9	0,44	19,20	14,16	0,00	16,59	28,23	69,46	405,75	12,92	0,00	15,37	1470,85	23,91	5689,55	16,61	8,80	0,00	0,00	1107,72
K-3	9	0,00	17,83	14,40	4,88	19,99	27,85	63,90	374,69	17,00	16,88	25,28	1373,67	77,66	7637,25	27,18	15,22	210,98	0,00	1092,97
K-4	9	0,00	18,51	15,86	6,11	19,56	26,24	71,89	380,51	17,70	26,31	28,02	1351,91	58,70	7368,81	27,34	16,20	217,80	0,00	1035,60
K-5	9	0,00	17,14	14,78	4,88	22,12	27,55	60,55	381,48	16,52	21,65	21,07	1398,44	83,55	7338,65	28,52	15,34	208,67	0,00	1045,04
K-6	9	0,00	15,77	13,47	4,88	102,92	27,79	54,30	337,80	16,35	19,79	22,00	1378,55	54,97	6705,76	23,82	14,58	186,89	0,00	988,40
M-1	9	1,10	9,60	0,88	2,44	57,42	33,22	124,44	324,21	7,21	87,15	0,00	2385,26	60,83	7862,87	15,03	27,78	105,18	48,27	1282,66
M-2	9	0,66	8,91	1,99	3,66	56,99	25,66	100,68	361,10	7,21	67,29	0,00	2491,82	64,69	8146,97	15,26	28,88	208,68	586,64	1353,90
M-3	9	0,22	8,91	1,61	1,22	58,27	25,38	124,87	386,34	3,60	73,58	0,00	2479,06	84,36	8990,52	17,79	31,31	191,46	202,48	1364,96
M-4	9	0,00	8,91	1,79	1,22	62,52	34,39	119,22	368,86	1,80	74,39	0,00	1996,53	62,10	8633,21	13,58	28,42	192,97	392,88	1292,40
M-5	9	0,22	8,91	1,65	1,22	39,55	27,35	118,95	359,16	5,40	71,78	0,00	2322,22	82,85	8470,44	17,07	29,69	159,77	168,95	1297,26
M-6	9	0,66	8,23	1,82	2,44	149,71	28,47	107,02	360,13	1,80	68,69	0,00	2405,14	94,27	8527,07	15,57	30,15	229,51	570,55	1375,73

Δείγμα	Ωρίμανση	Οξικό οξύ	Αλανίνη	Λακτικό οξύ	2,3-Βουτανεδιόλη	Ισοπεντανόλη	Διυδρορομπενετίνη	Καρταρικό οξύ	Θουρακίλη	2-Φαινόλο-αθανόλη	Προλίνη	Κυτιδίνη	Ινοσιτόλη	Κιτρομηλικό οξύ	Φουμαρικό οξύ	Ρομπενετίνη
Δ	0	16,05	15,72	108,55	174,16	8,56	0,00	0,00	0,87	10,14	290,64	4,61	204,33	23,92	0,57	0,00
B	0	15,84	10,34	37,98	137,43	13,14	0,00	27,32	1,72	14,78	265,08	6,31	260,14	34,67	0,62	0,00
K	0	27,96	12,35	326,60	165,37	19,30	0,00	20,65	1,35	25,65	471,21	0,00	240,51	13,18	0,00	0,00
M	0	22,22	3,74	61,16	233,79	36,71	0,00	82,02	1,01	59,74	0,00	0,00	236,76	18,12	0,62	0,00
Δ-1	3	26,72	7,73	190,86	387,08	10,09	0,00	0,00	1,43	20,52	426,54	8,04	346,03	42,32	0,86	0,00
Δ-2	3	31,53	11,10	185,23	349,56	10,63	0,00	0,00	1,35	22,36	413,10	7,57	348,13	37,29	0,84	0,00
Δ-3	3	30,03	11,07	181,18	386,79	11,39	0,00	0,00	1,21	21,50	415,51	7,45	360,19	41,39	0,85	0,00
Δ-4	3	25,72	10,70	170,47	300,38	10,85	25,10	0,00	1,37	21,01	430,63	8,11	354,12	35,35	0,62	0,00
Δ-5	3	28,12	10,83	166,28	370,69	10,52	0,00	0,00	1,30	21,38	446,64	7,50	374,05	37,71	0,87	0,00
B-1	3	22,22	20,46	65,18	262,30	14,39	0,00	33,24	1,26	26,63	343,03	28,16	423,60	35,42	0,68	0,00
B-2	3	25,33	23,62	70,10	271,06	14,35	0,00	39,02	0,88	31,40	344,35	38,64	445,41	37,55	0,58	0,00
B-3	3	28,23	25,97	72,54	243,56	13,95	0,00	23,54	1,03	24,68	310,28	38,79	411,66	41,78	0,79	0,00
B-4	3	23,75	19,64	60,80	207,80	13,66	22,06	24,45	1,05	24,55	322,09	28,75	315,78	41,68	0,61	0,00
B-5	3	35,57	29,33	86,31	281,61	16,13	0,00	31,36	1,14	29,07	335,74	56,06	332,92	46,51	0,94	0,00
K-1	3	34,69	15,05	396,23	277,25	21,64	0,00	37,46	1,57	31,52	600,70	0,00	259,65	19,95	0,00	0,00
K-2	3	33,88	12,60	380,88	197,36	23,42	0,00	38,86	1,63	27,85	603,59	0,00	281,21	18,62	0,00	0,00
K-3	3	45,21	17,63	455,49	297,23	21,78	0,00	45,15	2,05	32,13	639,44	0,00	373,62	20,42	0,00	0,00
K-4	3	42,82	18,51	470,79	267,98	26,34	22,80	37,31	1,95	35,32	635,72	0,00	285,83	19,99	0,00	0,00
K-5	3	38,80	16,83	430,32	256,49	20,04	0,00	40,77	1,46	31,76	620,09	0,00	280,34	17,70	0,00	0,00
K-6	3	37,57	16,72	418,26	218,04	23,56	0,00	43,04	1,71	30,05	612,44	0,00	370,90	18,52	0,00	0,00
M-1	3	35,96	1,89	54,27	277,92	28,85	0,00	86,42	0,72	49,60	0,00	0,00	273,76	14,21	0,94	0,00
M-2	3	52,22	2,80	74,35	324,19	33,26	0,00	86,38	0,95	57,90	0,00	0,00	292,92	16,72	1,29	0,00
M-3	3	67,90	3,58	67,85	273,92	36,51	0,00	89,21	0,98	57,29	0,00	0,00	266,31	15,67	1,23	0,00
M-4	3	63,79	3,65	69,82	337,99	32,34	22,82	71,50	0,97	59,00	0,00	0,00	271,27	15,96	0,96	0,00
M-5	3	60,84	3,71	66,77	274,78	38,69	0,00	86,94	0,81	55,58	0,00	0,00	258,82	15,53	1,15	0,00
M-6	3	52,69	3,48	70,61	293,33	32,34	0,00	83,17	0,72	52,77	0,00	0,00	267,39	15,84	1,23	0,00
Δ-1	6	33,23	14,55	149,53	219,74	9,19	0,00	0,00	1,59	15,51	379,35	9,64	266,81	39,61	0,59	0,00
Δ-2	6	21,62	16,33	141,09	197,14	15,61	0,00	0,00	2,15	17,71	385,69	9,98	303,81	36,85	0,69	0,00
Δ-3	6	18,62	15,15	139,95	196,31	11,64	0,00	0,00	1,61	18,57	369,57	8,74	294,33	32,16	0,68	0,00
Δ-4	6	20,42	16,93	161,82	232,21	11,61	49,40	0,00	1,77	20,52	395,47	9,07	317,04	35,34	0,45	7,17
Δ-5	6	19,92	15,15	133,74	231,08	10,09	0,00	0,00	0,90	15,76	381,08	10,00	293,22	32,28	0,69	0,00
B-1	6	15,87	21,05	49,41	146,67	13,96	0,00	38,68	1,82	21,50	297,46	26,69	403,98	43,10	0,66	0,00
B-2	6	22,32	24,20	58,54	209,30	13,74	0,00	38,36	1,52	24,31	295,95	37,12	436,92	40,57	0,74	0,00
B-3	6	22,32	27,87	511,62	197,96	16,38	0,00	24,42	1,93	28,83	315,74	52,50	405,80	31,13	0,18	0,00
B-4	6	21,33	25,46	171,06	151,93	11,76	41,80	27,36	1,65	24,31	339,14	29,77	483,99	46,58	0,46	0,00
B-5	6	25,71	31,15	210,50	209,08	15,92	0,00	27,87	1,59	30,17	328,24	53,58	443,61	40,52	0,63	0,00
K-1	6	33,25	15,07	439,33	207,20	18,13	0,00	40,02	1,94	26,14	565,25	0,00	347,41	18,38	0,00	0,00
K-2	6	37,67	17,18	466,73	235,44	19,56	0,00	42,92	2,25	28,46	625,74	0,00	403,21	20,73	0,00	0,00
K-3	6	34,14	17,79	437,38	170,70	21,03	0,00	39,54	2,31	27,73	582,07	0,00	381,93	19,73	0,00	0,00
K-4	6	37,58	18,61	511,38	221,02	18,16	43,40	42,18	2,55	27,69	613,69	0,00	397,34	20,60	0,00	0,00
K-5	6	38,29	19,70	519,52	209,75	17,98	0,00	43,40	2,09	30,54	644,65	0,00	322,26	20,04	0,00	0,00
K-6	6	39,18	17,60	455,73	226,88	19,58	0,00	42,35	1,88	30,78	629,07	0,00	400,57	18,69	0,00	0,00
M-1	6	39,20	2,55	89,40	254,66	32,55	0,00	98,52	0,98	57,42	0,00	0,00	294,58	22,21	1,12	0,00
M-2	6	44,11	3,26	76,20	281,17	28,41	0,00	95,06	0,46	61,57	0,00	0,00	299,26	18,29	1,25	0,00
M-3	6	82,12	4,11	81,25	317,30	38,06	0,00	93,15	0,60	61,94	0,00	0,00	311,65	18,17	1,32	0,00

M-4	6	90,92	4,70	85,17	226,88	36,15	46,40	74,39	1,01	57,90	0,00	0,00	285,19	16,28	1,30	0,00
M-5	6	72,18	4,61	82,74	361,31	34,08	0,00	97,17	0,99	66,21	0,00	0,00	320,44	19,47	1,32	0,00
M-6	6	84,46	4,15	85,38	294,84	37,27	0,00	82,29	0,74	57,42	0,00	0,00	304,27	19,00	1,54	0,00
Δ-1	9	86,17	10,60	580,08	178,06	10,77	0,00	0,00	5,28	17,35	397,56	7,31	5,03	337,96	0,00	0,00
Δ-2	9	25,52	12,87	654,67	185,50	12,40	0,00	0,00	6,34	16,49	370,30	8,60	5,91	352,47	0,00	0,00
Δ-3	9	24,32	20,28	140,12	178,06	11,81	0,00	0,00	0,86	15,64	396,46	8,58	4,73	338,20	0,71	0,00
Δ-4	9	22,62	17,41	147,15	188,20	15,92	66,17	0,00	1,70	14,42	364,40	9,52	5,10	284,97	0,22	13,59
Δ-5	9	27,72	19,68	158,79	216,81	14,82	0,00	0,00	1,09	16,49	397,87	7,40	4,66	324,27	0,68	0,00
B-1	9	21,51	26,02	61,28	165,15	14,23	0,00	37,55	2,15	24,31	330,84	23,80	7,48	458,54	0,59	0,00
B-2	9	20,12	21,91	508,43	151,70	15,83	0,00	34,82	16,74	28,10	305,17	35,57	6,04	359,97	0,00	0,00
B-3	9	29,01	30,69	494,79	196,99	18,07	0,00	25,01	3,99	26,39	311,39	50,94	5,71	375,12	0,00	0,00
B-4	9	21,70	22,59	505,91	170,48	17,60	75,30	18,91	4,95	18,08	309,80	28,49	5,92	398,13	0,00	9,53
B-5	9	26,21	31,70	575,14	189,48	16,14	0,00	26,41	4,18	26,51	319,28	47,41	5,69	399,45	0,00	0,00
K-1	9	32,83	14,73	483,29	162,89	15,00	0,00	32,47	3,35	24,55	467,89	0,00	5,60	320,91	0,00	0,00
K-2	9	45,59	8,34	617,55	190,60	20,41	0,00	43,54	3,10	33,59	467,20	0,00	6,65	98,14	0,00	0,00
K-3	9	40,40	20,20	465,16	185,35	22,73	0,00	33,79	2,15	25,90	596,37	0,00	6,61	311,92	0,00	0,00
K-4	9	35,61	20,57	468,05	181,22	20,63	63,10	33,49	1,96	32,39	586,39	0,00	6,92	323,40	0,00	0,00
K-5	9	35,78	20,06	441,41	171,68	20,72	0,00	37,61	2,20	25,78	583,81	0,00	6,76	365,79	0,00	0,00
K-6	9	39,28	16,88	410,23	170,33	23,80	0,00	32,88	1,74	28,34	528,21	0,00	5,58	356,93	0,00	0,00
M-1	9	46,44	2,90	314,70	275,17	26,62	0,00	101,76	1,13	54,73	0,00	0,00	6,42	311,99	0,00	0,00
M-2	9	39,53	3,86	65,50	245,13	27,78	0,00	85,62	0,64	53,38	0,00	0,00	4,85	288,60	1,29	0,00
M-3	9	60,93	5,12	240,51	346,96	29,20	0,00	93,94	1,36	57,29	0,00	0,00	5,51	340,34	0,41	0,00
M-4	9	57,42	4,48	167,68	302,43	32,85	64,70	82,17	1,18	44,50	0,00	0,00	4,72	280,27	0,69	0,00
M-5	9	70,54	4,48	226,19	259,25	40,37	0,00	88,57	1,55	53,51	0,00	0,00	5,98	308,78	0,44	0,00
M-6	9	62,97	5,03	84,89	274,34	30,18	0,00	93,41	0,73	49,96	0,00	0,00	4,79	333,33	1,59	0,00

Πίνακας 2. Συγκεντρώσεις (mg/L) των ενώσεων που ποσοτικοποιήθηκαν με τη Φασματοσκοπία NMR στα δείγματα οίνου του Β' τρύγου (Σεπτέμβριος 2013).

Με Δ, Β, Κ, και Μ συμβολίζονται οι ποικιλίες Δαφνί, Βηλάνα, Κοτσιφάλι και Μαντηλάρι αντίστοιχα. Οι αριθμοί στην πρώτη στήλη συμβολίζουν τον τύπο του περιέκτη ως εξής: -1 Inox (μάρτυρας), -2 oinostick γαλλικής δρύος, -3 αμερικάνικη δρύς, -4 ακακία, -5 γαλλική δρύς, -6 καστανιά.

Δείγμα	Ωρίμανση	Ακεταλδεΐδη	Τριγωνελλίνη	Ιστιδίνη	Ουριδίνη	Γαλλικό οξύ	Τυροσόλη	Σουκράζη	Γαλακτοουρικό οξύ	α-γλυκόζη	Τριαλόζη	β-γλυκόζη	Τρυγικό οξύ	Φρουκτόζη	Γλυκερόλη	Μεθανόλη	Χολίνη	Κιτρικό οξύ	Μηλικό οξύ	Ηλεκτρικό οξύ
Δ	0	0,28	12,14	2,14	6,68	1,40	13,87	53,52	111,33	35,28	32,24	38,73	1281,60	37,26	5678,68	5,93	13,29	104,86	1400,18	806,42
Β	0	0,31	11,19	4,64	10,81	0,34	13,58	20,44	223,74	44,43	116,61	15,59	2405,75	605,79	6863,71	7,32	23,08	188,62	2127,45	854,35
Κ	0	0,00	16,40	3,87	3,87	5,68	19,47	76,75	192,83	47,00	19,39	71,51	1558,11	107,71	9283,63	26,84	21,24	0,00	0,00	1222,02
Μ	0	0,19	8,72	1,48	0,00	16,92	35,75	31,47	271,49	8,93	265,58	13,64	1649,99	94,47	7416,50	8,87	22,72	161,38	0,00	1198,87
Δ-1	3	1,05	12,59	2,71	7,32	1,41	13,87	71,89	113,45	37,03	10,81	43,20	1326,23	49,89	5608,02	6,41	12,91	110,87	1486,87	753,70
Δ-2	3	1,34	11,92	6,27	6,11	1,38	14,81	71,75	126,37	14,64	8,20	5,84	1087,06	32,15	5597,44	5,94	13,30	120,42	1294,97	762,65
Δ-3	3	0,98	12,27	3,27	7,83	1,48	14,69	72,79	115,26	34,37	11,13	69,57	1251,38	63,24	5784,31	6,66	14,14	115,44	1565,11	771,76
Δ-4	3	0,28	12,29	3,10	8,07	1,31	14,38	79,74	105,44	43,38	11,72	44,23	1382,58	58,99	6002,57	7,19	14,01	120,91	1534,78	806,28
Δ-5	3	0,65	12,45	3,30	8,03	1,65	14,46	72,27	134,42	37,52	11,83	82,25	1169,14	72,70	5923,68	6,64	14,30	118,97	1473,82	770,48
Β-1	3	0,77	11,51	6,42	17,79	1,22	21,68	49,76	227,74	86,78	22,44	108,08	1645,91	182,72	7219,53	4,58	28,41	162,70	2093,42	985,51
Β-2	3	0,66	11,37	5,37	17,82	1,00	20,79	54,05	220,32	83,11	22,11	123,68	1525,09	179,42	7160,46	4,57	28,06	160,37	2038,71	990,47
Β-3	3	0,35	12,42	5,19	17,98	1,02	19,97	54,76	225,98	83,75	22,16	119,28	1623,22	188,78	7261,26	4,25	28,66	160,19	2081,48	1009,96
Β-4	3	0,34	12,01	6,11	20,12	1,02	20,71	48,40	230,68	82,52	23,36	125,72	1618,08	195,39	7461,32	4,49	29,44	168,74	2138,69	1015,06
Β-5	3	0,37	11,80	5,13	19,06	1,27	21,28	48,57	228,44	84,41	22,35	127,73	1635,81	186,70	7507,48	4,78	28,48	166,46	2141,86	1008,23
Κ-1	3	0,00	15,61	3,74	4,22	6,83	20,75	52,13	240,96	63,44	0,00	165,47	1626,46	97,79	9126,77	24,43	22,00	0,00	0,00	1208,74
Κ-2	3	0,62	16,62	3,50	4,74	6,67	21,18	69,51	237,83	28,14	0,00	43,32	1568,00	50,69	8805,47	24,30	21,54	0,00	0,00	1181,98
Κ-3	3	0,00	15,61	3,16	4,56	6,61	21,30	73,84	225,80	73,09	0,00	169,65	1403,00	104,49	8796,18	25,92	21,81	0,00	0,00	1179,57
Κ-4	3	0,29	15,82	3,07	4,03	7,00	20,58	67,38	220,18	24,40	0,00	44,72	1361,61	80,73	8517,52	24,00	21,16	0,00	0,00	1184,98
Κ-5	3	0,17	15,68	2,91	4,71	7,37	21,16	62,83	238,42	55,51	0,00	154,92	1536,29	95,07	8900,32	24,79	22,77	0,00	0,00	1200,49
Κ-6	3	0,43	18,11	2,58	4,66	14,84	23,34	70,79	240,89	26,42	0,00	60,85	1449,97	59,31	8989,02	25,80	23,88	0,00	0,00	1184,93
Μ-1	3	0,70	8,34	1,33	1,50	14,95	36,58	25,38	262,31	18,86	201,79	18,08	1941,26	103,96	7266,62	15,07	23,56	174,04	0,00	1113,42
Μ-2	3	1,03	7,96	1,21	1,59	16,86	35,39	26,64	256,76	6,88	168,86	17,01	1932,96	69,82	7227,53	15,10	23,52	174,10	0,00	1192,74
Μ-3	3	0,88	8,66	1,44	1,15	15,22	34,60	23,71	263,09	14,22	195,17	16,47	2018,90	85,47	7536,06	14,78	24,90	177,10	0,00	1234,61
Μ-4	3	0,80	8,63	1,12	1,06	15,41	30,88	24,84	251,79	6,61	204,76	12,42	1936,43	69,01	7001,81	13,68	22,25	163,28	0,00	1185,91
Μ-5	3	0,77	8,14	1,52	1,32	19,99	34,99	25,76	257,65	8,91	199,26	18,87	1957,65	93,59	7456,70	15,54	23,87	175,27	0,00	1222,54
Μ-6	3	0,40	8,44	1,69	1,38	23,94	37,31	27,46	271,95	18,31	202,04	13,65	2031,09	100,17	7434,28	14,60	24,81	174,45	0,00	1209,33
Δ-1	6	0,95	12,18	2,80	5,34	1,75	14,39	48,33	111,42	13,56	0,00	0,00	1459,52	33,09	5220,11	5,95	13,50	70,37	666,52	691,36
Δ-2	6	0,35	12,19	6,05	1,01	2,19	14,49	51,43	122,69	22,06	0,00	0,00	1556,73	50,28	5660,46	6,28	13,79	53,14	181,45	734,39
Δ-3	6	0,57	12,20	4,21	1,27	2,00	14,97	49,00	143,39	16,88	0,00	0,00	1340,12	57,52	6178,69	6,32	13,94	119,57	235,48	788,94
Δ-4	6	0,77	13,24	4,26	8,34	1,36	15,64	54,80	146,88	51,45	0,00	55,63	1463,63	76,73	6440,82	7,02	14,14	107,29	1533,74	825,84
Δ-5	6	0,57	12,43	4,40	0,67	2,47	14,13	41,72	133,20	32,54	0,00	67,97	1385,43	83,74	5966,78	5,90	13,73	108,70	217,91	727,16
Β-1	6	0,92	12,42	4,98	3,38	2,13	23,22	57,94	219,64	62,72	8,73	99,24	1784,09	233,60	7234,16	4,92	31,33	184,91	465,97	967,20
Β-2	6	0,36	11,87	4,70	18,68	1,49	21,11	49,39	227,27	61,22	8,67	124,26	1676,78	228,79	7106,88	4,80	29,85	164,01	2125,09	1010,18
Β-3	6	0,40	11,80	4,92	20,22	1,48	20,58	44,78	238,01	94,70	11,39	178,35	1778,94	272,77	7179,41	4,74	30,03	166,00	2111,77	997,17
Β-4	6	0,39	12,03	5,09	19,24	2,16	21,94	44,04	219,58	97,90	9,84	185,41	1761,18	277,29	7130,79	4,66	29,80	156,84	2099,06	988,73
Β-5	6	0,35	12,91	4,52	22,54	1,57	19,74	43,92	226,81	83,45	9,25	192,06	1833,26	251,44	7131,98	4,32	29,31	157,98	2013,05	998,79
Κ-1	6	0,27	15,94	3,19	4,36	6,82	21,75	60,39	237,14	77,31	0,00	184,89	1593,29	99,36	8620,78	23,70	23,19	0,00	0,00	1132,30
Κ-2	6	0,25	16,05	3,14	5,05	7,04	23,14	69,54	230,70	18,10	0,00	0,00	1540,79	55,85	8934,77	25,43	22,85	0,00	0,00	1184,57
Κ-3	6	0,00	16,67	3,33	4,41	8,30	22,21	69,87	224,92	79,54	0,00	199,35	1471,42	113,92	9190,51	26,37	22,38	0,00	0,00	1182,94
Κ-4	6	0,19	17,47	2,98	4,40	8,70	22,03	67,38	223,88	17,47	0,00	0,00	1493,50	83,65	9286,26	26,12	24,08	0,00	0,00	1236,13
Κ-5	6	0,23	16,56	3,45	4,82	8,68	21,07	71,78	239,89	60,44	0,00	174,16	1456,03	98,08	9154,42	25,62	24,21	0,00	0,00	1196,64
Κ-6	6	0,33	18,89	2,66	5,75	25,11	22,92	71,96	231,19	16,34	0,00	0,00	1556,48	57,89	9628,97	26,25	26,02	0,00	0,00	1264,82

M-1	6	0,35	9,01	1,86	1,54	13,17	35,89	22,43	264,39	22,97	171,73	67,86	1954,86	109,40	7642,65	13,85	23,17	169,31	0,00	1227,83
M-2	6	0,38	8,11	1,54	1,39	14,66	35,67	24,52	267,24	5,29	78,25	0,00	1803,72	72,66	7054,93	13,85	22,07	161,34	0,00	1179,28
M-3	6	0,20	9,32	1,82	1,85	12,79	41,59	28,68	286,27	14,34	105,64	0,00	1976,36	110,79	7862,47	15,74	24,63	183,71	0,00	1245,61
M-4	6	0,28	7,99	1,50	1,75	17,86	37,45	24,86	241,23	7,33	104,12	8,79	1821,70	78,34	7264,13	14,09	23,60	168,93	0,00	1195,15
M-5	6	0,26	8,32	1,72	1,22	19,88	42,26	21,01	262,67	12,26	105,01	12,11	1830,03	102,79	7737,76	15,65	23,88	190,62	0,00	1215,56
M-6	6	0,35	8,50	1,72	1,53	32,20	40,48	25,29	251,79	11,02	127,29	0,00	1843,34	98,62	7434,63	13,93	23,96	185,19	0,00	1214,68
Δ-1	9	0,61	12,46	7,28	1,08	1,25	12,90	24,44	130,80	5,51	0,00	0,00	1101,39	12,03	5465,00	4,99	12,64	0,00	251,74	752,55
Δ-2	9	0,32	12,10	7,82	1,31	1,18	11,60	44,96	121,78	4,29	0,00	0,00	1041,38	39,00	5379,59	4,43	12,17	52,88	212,86	709,52
Δ-3	9	0,34	13,41	9,15	1,29	2,47	13,91	50,67	144,27	12,27	0,00	0,00	1718,98	54,39	6079,61	5,10	14,84	51,68	231,49	766,08
Δ-4	9	0,15	13,00	8,23	7,87	1,45	12,98	48,52	131,17	11,43	0,00	0,00	1024,21	54,46	5871,83	4,89	13,87	50,44	221,90	746,01
Δ-5	9	0,29	12,56	8,75	1,49	2,91	13,40	46,80	130,61	9,98	0,00	0,00	1063,01	46,01	5862,38	5,41	14,11	58,17	207,59	732,18
B-1	9	0,37	11,55	5,52	1,11	1,70	21,09	43,40	246,03	32,22	4,20	53,32	1819,73	147,76	7028,23	4,08	30,41	51,88	107,08	943,21
B-2	9	0,34	11,89	4,80	11,07	1,74	19,57	46,54	255,63	57,03	3,99	114,78	1915,84	211,59	7350,70	4,00	30,48	142,06	1094,51	973,47
B-3	9	0,29	12,92	5,16	2,34	2,46	18,90	52,95	248,25	94,62	14,76	225,37	1840,61	235,81	7575,83	4,54	29,60	102,06	211,56	999,65
B-4	9	0,21	14,74	6,74	22,56	2,92	21,71	45,19	274,56	100,85	3,98	170,04	1868,49	277,45	7942,01	4,43	31,08	141,50	2056,23	1066,51
B-5	9	0,18	12,87	4,82	2,37	2,68	18,55	52,99	248,09	74,17	10,13	141,18	1834,36	258,08	7510,14	4,05	30,71	82,43	208,19	1008,31
K-1	9	0,20	16,94	3,87	6,29	6,16	18,73	64,39	253,12	21,15	0,00	76,35	1583,36	71,39	8481,72	20,93	23,55	0,00	0,00	1130,35
K-2	9	0,11	17,34	3,67	4,98	6,15	19,02	76,17	234,22	11,62	0,00	0,00	1415,99	34,00	8538,57	22,46	22,80	0,00	0,00	1148,01
K-3	9	0,00	17,51	3,39	4,58	8,08	19,71	67,28	279,77	29,60	0,00	180,85	1460,80	96,73	9113,23	21,79	21,68	0,00	0,00	1209,55
K-4	9	0,16	16,84	4,34	4,75	8,65	18,88	72,09	279,43	12,90	0,00	0,00	1538,38	70,21	9320,71	21,52	22,88	0,00	0,00	1221,12
K-5	9	0,23	16,46	4,36	6,05	9,67	20,65	67,61	276,38	15,82	0,00	0,00	1809,54	65,06	9415,25	24,50	25,17	0,00	0,00	1236,42
K-6	9	0,27	15,81	3,40	5,24	34,18	21,44	61,25	274,52	15,31	0,00	0,00	1601,69	55,56	8834,16	23,02	24,79	0,00	0,00	1158,53
M-1	9	0,38	8,55	2,00	1,38	16,86	31,82	27,11	275,30	7,83	68,62	0,00	1914,41	81,26	7121,74	9,46	22,72	165,74	0,00	1126,08
M-2	9	0,36	8,75	2,25	2,05	17,58	36,34	26,81	286,61	9,09	49,03	0,00	1962,22	102,42	7669,41	11,09	24,60	190,67	0,00	1217,43
M-3	9	0,28	8,57	1,95	1,71	19,76	38,29	24,53	290,10	11,08	65,90	0,00	1947,19	114,12	7790,30	11,09	24,43	190,21	0,00	1231,93
M-4	9	0,30	10,22	2,16	2,35	14,28	38,25	20,73	288,82	10,33	62,75	0,00	1834,64	103,98	7860,80	9,49	24,08	186,38	0,00	1224,66
M-5	9	0,39	8,73	2,40	2,03	16,52	40,44	20,62	300,72	9,10	70,70	0,00	1763,31	111,97	8108,47	11,76	24,88	208,13	0,00	1284,68
M-6	9	0,40	8,24	2,21	2,03	40,77	38,71	17,73	290,59	6,46	63,05	0,00	1859,28	96,14	8041,66	9,75	24,66	199,34	0,00	1238,03
Δ-1	12	1,22	12,96	8,42	4,71	1,40	16,74	10,53	140,58	0,00	0,00	0,00	882,94	14,96	5824,97	6,11	13,24	0,00	177,16	794,40
Δ-2	12	0,50	12,45	8,66	2,47	1,61	15,77	48,62	130,45	9,92	0,00	0,00	950,22	12,40	5866,40	6,16	12,99	65,22	234,82	782,91
Δ-3	12	0,49	13,03	8,89	1,23	2,97	15,82	48,49	142,95	10,60	0,00	0,00	940,44	56,05	6276,60	6,19	14,83	41,23	223,75	752,56
Δ-4	12	0,19	12,70	8,58	1,36	1,89	14,82	49,19	143,27	11,37	0,00	0,00	1046,73	51,81	6279,68	5,58	14,79	51,48	223,24	781,97
Δ-5	12	0,29	12,73	8,81	1,06	3,55	15,77	47,78	140,22	13,21	0,00	0,00	889,00	53,81	6213,14	6,65	14,82	41,79	205,18	785,84
B-1	12	6,85	12,84	9,57	1,34	1,93	25,37	43,71	293,47	10,27	4,13	51,27	1230,37	98,43	7716,19	5,21	32,67	62,11	137,88	1054,04
B-2	12	0,38	12,48	9,37	2,63	2,01	22,34	46,35	295,81	25,93	5,15	78,70	1244,88	204,07	7912,96	5,08	30,26	99,02	154,39	1050,03
B-3	12	2,20	12,68	9,65	2,03	2,62	22,35	46,69	290,11	88,66	7,75	171,89	1166,15	290,23	7841,39	5,42	30,10	106,15	240,47	1014,80
B-4	12	1,06	13,78	10,43	7,04	2,97	21,52	48,12	314,02	72,80	6,39	166,39	1424,30	263,62	8476,09	4,18	30,95	181,39	0,00	1097,51
B-5	12	1,36	11,21	7,59	1,96	2,99	19,93	46,05	244,74	62,14	6,72	143,10	1143,37	223,99	6972,04	4,31	27,36	70,41	137,65	908,45
K-1	12	5,83	16,87	4,41	8,16	7,14	24,52	67,66	281,79	44,29	0,00	125,52	1646,41	104,40	9110,47	23,58	24,91	0,00	0,00	1262,40
K-2	12	0,38	17,12	5,15	6,14	7,47	23,88	73,78	304,33	14,06	0,00	0,00	1616,08	58,71	9313,86	26,46	24,15	0,00	0,00	1244,02
K-3	12	0,33	17,53	4,72	5,79	9,34	23,27	70,18	308,22	16,01	0,00	0,00	1537,49	59,03	9653,12	26,55	22,94	0,00	0,00	1261,81
K-4	12	0,34	18,12	5,00	5,55	9,62	21,28	74,19	312,21	15,02	0,00	0,00	1537,81	41,86	9328,79	26,57	24,07	0,00	0,00	1228,93
K-5	12	0,36	18,99	5,35	7,68	10,41	22,97	61,16	313,75	12,69	0,00	0,00	1588,28	32,67	9790,46	26,45	27,41	0,00	0,00	1281,46
K-6	12	0,37	17,85	4,44	6,72	49,03	23,05	62,89	329,11	12,68	0,00	0,00	1744,29	38,34	9553,87	26,75	28,21	0,00	0,00	1235,06
M-1	12	0,24	8,74	2,06	2,22	12,24	27,97	11,33	293,07	3,52	0,00	0,00	1534,73	70,65	7425,54	14,94	22,81	168,77	0,00	1191,88
M-2	12	0,30	7,88	1,76	1,95	16,31	28,43	13,21	285,66	4,78	0,00	0,00	1444,34	73,90	7119,03	12,22	22,04	157,24	0,00	1166,44
M-3	12	0,21	8,82	2,59	1,62	20,52	33,93	13,67	318,40	3,99	23,95	0,00	1428,13	88,12	8154,79	14,84	25,26	175,21	0,00	1238,85
M-4	12	0,25	8,62	2,17	1,49	20,16	32,20	14,29	299,28	4,34	21,29	0,00	1401,34	89,52	7716,72	13,08	23,74	163,42	0,00	1223,48
M-5	12	0,27	8,21	2,16	1,37	17,86	28,60	10,51	290,51	2,38	30,44	0,00	1378,85	86,06	7784,60	13,26	23,24	171,73	0,00	1245,77
M-6	12	0,53	8,15	1,82	1,69	40,64	29,62	8,66	294,40	1,83	0,00	0,00	1520,62	84,25	7823,69	12,54	23,28	175,15	0,00	1220,81

Δείγμα	Ωρίμανση	Οξύ οξύ	Αλανίνη	Λακτικό οξύ	2,3-Βουτανεδιόλη	Ισοπεντανόλη	Λιθόρομοπινετίνη	Καφαρικό οξύ	Ουρακίλη	2-Φαινόλο-αιθανόλη	Προλίνη	Κυτιδίνη	Ινοσιτόλη	Κιτρομηλικό οξύ	Φουμαρικό οξύ	Ρομπινετίνη
Δ	0	15,35	7,36	43,86	137,43	12,84	0,00	6,10	4,80	14,48	359,43	0,00	255,87	12,25	1,34	0
B	0	14,88	11,64	51,28	208,55	10,07	0,00	94,44	1,49	17,14	252,25	4,11	391,70	12,43	1,01	0
K	0	38,01	13,01	520,62	448,48	13,43	0,00	63,84	7,34	22,08	743,44	0,00	352,80	17,45	0,00	0
M	0	25,99	6,54	389,11	226,51	18,73	0,00	141,89	1,54	55,71	122,87	0,00	340,41	19,95	0,00	0
Δ-1	3	15,34	7,93	44,02	123,78	14,18	0,00	14,15	2,64	13,57	341,78	0,00	263,83	16,32	1,94	0
Δ-2	3	13,90	7,00	115,99	137,30	14,46	0,00	17,72	4,93	14,21	326,98	0,00	274,60	9,88	1,08	0
Δ-3	3	14,47	9,48	54,32	114,54	15,72	0,00	15,76	2,48	13,70	351,43	0,00	289,73	17,15	1,95	0
Δ-4	3	15,95	9,16	47,39	119,55	13,12	4,65	16,68	2,87	14,11	367,76	0,00	286,48	17,22	1,76	0
Δ-5	3	15,61	9,38	88,73	143,67	16,24	0,00	14,97	2,86	14,26	356,49	0,00	295,65	17,30	1,71	0
B-1	3	25,29	15,42	54,78	207,91	14,55	0,00	74,65	2,67	28,20	277,79	6,29	334,49	22,19	1,41	0
B-2	3	24,54	15,05	55,75	183,05	12,51	0,00	76,56	3,40	27,02	276,23	6,77	330,86	21,27	1,57	0
B-3	3	21,22	15,53	57,65	131,42	11,50	0,00	81,22	3,15	24,63	279,60	7,16	332,20	22,06	1,56	0
B-4	3	21,53	15,79	53,03	120,43	13,10	5,95	97,42	3,26	26,85	281,75	6,97	335,44	22,29	1,38	0
B-5	3	23,57	16,31	68,99	143,50	12,60	0,00	85,49	2,88	27,32	290,32	7,50	344,15	22,88	1,53	0
K-1	3	34,18	12,37	482,23	408,21	11,88	0,00	55,59	4,04	19,45	712,23	0,00	316,31	24,19	0,00	0
K-2	3	29,66	10,79	452,26	325,45	12,24	0,00	55,39	3,96	16,77	672,43	0,00	340,62	20,38	0,00	0
K-3	3	30,46	12,44	456,81	280,62	15,61	0,00	53,80	5,84	22,18	654,75	0,00	332,84	20,79	0,00	0
K-4	3	28,32	9,61	436,39	330,93	10,01	6,85	53,18	5,96	15,84	656,40	0,00	335,93	18,56	0,00	0
K-5	3	31,94	12,23	472,29	406,46	9,16	0,00	55,76	1,29	17,06	702,42	0,00	359,98	24,46	0,00	0
K-6	3	28,07	11,70	436,99	283,85	10,47	0,00	52,89	3,84	19,93	681,10	0,00	384,90	21,61	0,00	0
M-1	3	17,63	5,27	343,10	259,82	20,25	0,00	138,83	1,62	37,92	118,77	0,00	307,16	22,93	0,22	0
M-2	3	20,74	5,26	333,90	246,97	22,47	0,00	138,58	1,45	40,78	111,30	0,00	263,58	21,99	0,24	0
M-3	3	21,90	4,93	319,10	237,89	27,63	0,00	141,54	1,93	51,16	115,10	0,00	250,31	21,74	0,19	0
M-4	3	17,93	3,66	298,16	204,82	20,13	4,73	126,78	0,86	49,62	102,19	0,00	321,89	18,62	0,23	0
M-5	3	21,45	5,60	336,82	242,14	22,25	0,00	138,68	1,86	50,14	115,68	0,00	261,55	22,85	0,20	0
M-6	3	17,89	4,88	319,77	222,96	18,35	0,00	146,14	1,79	47,95	116,97	0,00	347,67	23,09	0,21	0
Δ-1	6	12,95	7,52	234,45	69,41	12,68	0,00	8,85	5,86	11,10	328,85	0,00	257,36	8,66	0,35	0
Δ-2	6	13,52	6,89	435,44	87,98	17,68	0,00	9,21	6,67	10,49	334,81	0,00	274,85	9,35	0,00	0
Δ-3	6	21,88	8,84	577,97	84,93	13,84	0,00	7,42	10,12	12,35	367,37	0,00	261,94	9,73	0,00	0
Δ-4	6	21,47	10,05	62,76	190,89	11,24	11,85	8,28	3,11	14,21	413,91	0,00	257,08	16,64	1,67	0
Δ-5	6	15,62	7,53	498,90	111,37	10,11	0,00	8,83	9,76	10,89	340,15	0,00	243,71	8,05	0,00	0
B-1	6	13,61	12,29	548,77	106,50	14,82	0,00	94,17	9,46	23,37	250,54	7,96	443,99	15,69	0,00	0
B-2	6	15,13	14,77	39,73	114,52	13,57	0,00	86,69	3,98	23,32	255,51	6,54	476,96	10,63	1,58	0
B-3	6	14,93	15,45	43,90	105,87	13,64	0,00	76,35	3,71	20,70	254,37	6,13	482,89	9,93	1,54	0
B-4	6	16,86	14,89	46,73	149,72	12,29	12,76	99,01	3,96	25,30	251,52	7,07	472,02	10,24	1,24	0
B-5	6	15,23	14,53	57,73	142,76	13,46	0,00	86,78	6,88	23,44	250,98	7,59	456,64	8,10	1,43	0
K-1	6	26,06	11,12	401,55	245,77	12,63	0,00	56,02	4,26	17,48	661,12	0,00	320,46	20,28	0,00	0
K-2	6	28,41	11,23	436,75	242,96	12,51	0,00	57,66	6,22	16,88	675,74	0,00	370,97	21,77	0,00	0
K-3	6	28,72	12,79	439,85	239,77	11,62	0,00	56,43	6,00	19,85	708,97	0,00	341,82	20,76	0,00	0
K-4	6	26,08	10,53	407,20	179,77	9,48	16,45	54,03	8,72	17,13	686,03	0,00	333,11	17,26	0,00	0
K-5	6	24,46	11,57	391,67	190,00	8,93	0,00	53,98	4,49	17,36	690,45	0,00	328,27	18,41	0,00	0
K-6	6	28,20	11,89	399,73	191,70	9,02	0,00	57,06	3,62	16,60	706,34	0,00	353,90	25,48	0,00	0
M-1	6	26,01	4,99	331,44	168,04	23,13	0,00	145,81	1,86	47,38	128,54	0,00	328,58	21,12	0,00	0
M-2	6	26,45	5,74	314,21	191,25	25,11	0,00	132,96	1,73	43,61	119,20	0,00	301,27	21,07	0,00	0
M-3	6	32,76	7,25	363,04	224,18	25,32	0,00	147,17	2,14	49,43	132,39	0,00	269,90	24,28	0,00	0
M-4	6	29,85	6,61	327,67	194,02	24,92	15,55	125,51	2,02	46,73	120,17	0,00	245,47	21,53	0,00	0
M-5	6	31,34	6,58	384,42	239,57	21,25	0,00	131,06	2,37	48,35	130,99	0,00	279,80	24,74	0,00	0
M-6	6	21,67	5,49	266,25	147,68	21,31	0,00	139,11	1,75	46,81	119,42	0,00	307,06	22,36	0,00	0
Δ-1	9	13,70	3,38	300,90	125,98	7,32	0,00	7,43	9,05	9,62	338,94	0,00	265,30	9,34	0,00	0

Δ-2	9	11,35	4,59	249,67	98,55	8,50	0,00	6,48	8,79	12,97	333,30	0,00	237,94	9,80	0,00	0
Δ-3	9	15,15	7,02	517,02	114,52	9,63	0,00	6,49	5,35	10,26	380,10	0,00	284,71	18,24	0,00	0
Δ-4	9	14,95	6,53	376,98	113,08	11,97	28,17	6,97	8,25	11,05	360,64	0,00	258,98	8,41	0,00	5,74
Δ-5	9	14,58	6,63	392,84	76,08	11,55	0,00	5,40	8,22	10,64	353,24	0,00	272,28	13,28	0,00	0
B-1	9	13,12	11,52	645,25	110,52	8,64	0,00	85,61	13,83	16,53	245,87	8,35	415,69	9,10	0,00	0
B-2	9	12,08	11,27	375,45	96,56	10,43	0,00	84,84	8,21	18,54	256,68	7,45	440,22	9,43	0,23	0
B-3	9	14,19	13,60	587,12	103,59	11,27	0,00	95,31	11,67	14,27	260,97	14,63	457,42	15,96	0,00	0
B-4	9	17,50	16,00	65,01	143,95	12,54	24,52	123,05	7,49	20,32	276,35	8,62	480,58	18,16	1,06	7,39
B-5	9	13,35	11,68	625,44	149,87	9,13	0,00	95,42	12,77	18,79	255,21	9,48	445,28	14,70	0,00	0
K-1	9	22,38	9,85	337,27	209,65	10,54	0,00	56,06	4,13	13,06	654,13	0,00	342,63	23,61	0,00	0
K-2	9	22,24	9,86	308,64	160,49	11,20	0,00	48,42	6,36	14,54	646,29	0,00	348,08	18,12	0,00	0
K-3	9	24,61	10,73	384,85	296,53	8,17	0,00	54,79	5,02	14,67	715,24	0,00	333,71	17,49	0,00	0
K-4	9	24,08	9,76	399,57	316,89	7,83	26,73	53,24	6,38	14,86	696,54	0,00	345,59	17,23	0,00	0
K-5	9	28,23	13,19	448,61	343,29	7,93	0,00	57,90	3,40	16,36	728,71	0,00	395,29	16,98	0,00	0
K-6	9	28,16	12,28	407,48	280,86	11,38	0,00	54,20	4,34	16,26	664,18	0,00	377,51	18,68	0,00	0
M-1	9	17,66	6,77	307,85	195,27	19,83	0,00	134,55	1,40	36,26	125,33	0,00	241,75	22,46	0,00	0
M-2	9	18,57	7,20	338,79	211,54	22,91	0,00	123,12	1,75	39,56	129,26	0,00	257,24	24,42	0,00	0
M-3	9	18,37	7,50	333,03	199,10	18,55	0,00	127,86	1,98	36,47	134,19	0,00	270,06	25,22	0,00	0
M-4	9	19,30	7,92	349,10	205,54	17,65	29,24	120,67	2,12	31,91	138,22	0,00	271,02	25,27	0,00	0
M-5	9	18,00	7,94	348,59	203,66	16,58	0,00	120,79	1,88	34,47	138,09	0,00	288,49	26,11	0,00	0
M-6	9	19,64	6,79	333,18	195,16	23,48	0,00	127,47	1,92	34,36	132,05	0,00	278,69	26,35	0,00	0
Δ-1	12	20,01	6,21	403,95	143,57	5,28	0,00	6,42	7,98	12,97	349,06	0,00	293,02	15,44	0,00	0
Δ-2	12	16,27	6,79	461,63	130,70	12,85	0,00	7,33	8,59	14,34	334,72	0,00	260,35	13,77	0,00	0
Δ-3	12	19,50	7,32	462,84	178,87	13,62	0,00	8,43	10,43	12,95	372,07	0,00	282,50	15,83	0,00	0
Δ-4	12	19,14	8,31	484,42	288,88	13,82	33,94	7,68	8,78	14,29	380,91	0,00	286,28	9,94	0,00	6,47
Δ-5	12	19,77	8,96	530,07	210,18	9,81	0,00	5,74	8,74	12,04	362,98	0,00	276,56	13,72	0,00	0
B-1	12	51,40	15,47	921,52	234,36	30,74	0,00	92,30	14,49	32,73	272,02	9,23	475,76	10,51	0,00	0
B-2	12	64,99	15,67	987,13	280,37	38,44	0,00	92,05	13,57	33,89	289,70	7,15	436,11	10,12	0,00	0
B-3	12	79,16	16,08	906,94	241,37	38,19	0,00	76,08	13,42	33,36	292,29	8,64	436,85	10,08	0,00	0
B-4	12	33,58	14,04	938,39	272,97	18,28	40,83	88,57	11,54	28,65	278,93	5,12	461,71	9,84	0,00	10,68
B-5	12	27,66	12,35	679,12	159,04	21,66	0,00	70,04	11,85	25,64	240,65	7,49	382,87	8,23	0,00	0
K-1	12	31,92	13,74	496,40	385,55	10,54	0,00	58,94	4,80	17,62	716,89	0,00	379,88	19,59	0,00	0
K-2	12	34,56	13,61	515,76	399,14	9,83	0,00	55,84	5,73	17,93	739,04	0,00	380,52	20,13	0,00	0
K-3	12	33,90	14,31	495,99	391,76	9,77	0,00	56,99	4,61	18,82	752,71	0,00	338,32	19,27	0,00	0
K-4	12	34,86	13,11	487,07	390,04	9,61	32,63	54,30	4,70	18,02	725,45	0,00	335,98	19,13	0,00	0
K-5	12	33,79	15,34	499,28	426,19	9,28	0,00	46,16	2,25	20,05	760,52	0,00	423,01	22,55	0,00	0
K-6	12	34,95	14,31	441,20	332,33	12,02	0,00	57,46	4,00	20,48	725,72	0,00	422,30	22,35	0,00	0
M-1	12	50,29	7,68	304,35	213,22	36,74	0,00	140,11	1,59	45,45	127,79	0,00	267,70	21,62	0,00	0
M-2	12	40,80	6,87	311,73	192,77	35,88	0,00	133,78	1,34	46,31	114,94	0,00	243,88	20,11	0,00	0
M-3	12	52,23	9,04	374,43	221,85	39,36	0,00	139,76	1,93	49,91	142,02	0,00	298,70	24,65	0,00	0
M-4	12	46,79	8,23	353,17	204,16	36,08	30,06	114,46	1,86	44,40	136,28	0,00	295,56	22,15	0,00	0
M-5	12	41,42	7,67	343,98	232,25	32,19	0,00	135,40	1,54	46,18	135,07	0,00	275,62	22,57	0,00	0
M-6	12	92,58	6,84	318,39	209,09	42,44	0,00	143,70	1,14	44,15	128,78	0,00	280,90	22,33	0,00	0

Πίνακας 3. Συγκεντρώσεις (mg/L) των ενώσεων που ποσοτικοποιήθηκαν με τη Φασματοσκοπία NMR στα δείγματα οίνου του Β' τρύγου (Σεπτέμβριος 2013) μετά την παραμονή τους στους περιέκτες για 3 ή 6 μήνες και την επιπλέον δωδεκάμηνη παραμονή τους σε φιάλες. Με Δ, Β, Κ, και Μ συμβολίζονται οι ποικιλίες Δαφνί, Βηλάνα, Κοτσιφάλι και Μαντηλάρι αντίστοιχα. Οι αριθμοί στην πρώτη στήλη συμβολίζουν τον τύπο του περιέκτη ως εξής: -1 Inox (μάρτυρας), -2 οινόπνευμα γαλλικής δρύος, -3 αμερικάνικη δρύος, -4 ακακία, -5 γαλλική δρύος, -6 κασταλιά.

	Ωρίμανση σε βαρέλι	Ωρίμανση σε φιάλη	ακεταλδεΐδη	τριγωνελλίνη	ιστιδίνη	ουριδίνη	2-φαινυλοαιθανόλη	γαλλικό οξύ	τυροσόλη	φουμαρικό οξύ	Λιθόρο ρομπινετίνη	καφταρικό οξύ	κυτιδίνη	ουρακίλη	σουκρόζη	γαλακτουρονικό οξύ	α-γλυκόζη	τρυγικό οξύ
Δ1	3,00	12,00	1,13	12,40	4,65	8,20	14,36	1,33	16,19	4,18	0,00	5,73	0,00	3,15	80,67	123,59	26,47	1409,58
Δ2	3,00	12,00	0,39	12,96	7,75	1,31	11,96	2,15	15,77	0,00	0,00	5,65	0,00	6,22	48,73	141,01	18,75	1297,40
Δ3	3,00	12,00	0,66	13,56	5,63	1,20	12,92	1,97	16,62	0,00	0,00	8,00	0,00	9,31	52,24	134,28	33,62	1573,71
Δ4	3,00	12,00	0,91	12,93	4,82	9,18	13,73	1,48	16,46	3,22	4,57	8,76	0,00	2,98	61,73	129,84	32,97	1637,58
Δ5	3,00	12,00	0,77	13,78	9,42	2,42	13,09	2,10	15,86	0,00	0,00	7,59	0,00	9,64	52,45	132,92	39,42	1565,80
Β1	3,00	12,00	0,29	11,67	8,83	5,69	30,60	1,84	22,64	0,00	0,00	81,10	7,60	11,42	43,37	257,01	14,53	1504,27
Β2	3,00	12,00	0,35	11,33	7,66	7,70	30,02	2,07	22,56	0,00	0,00	80,35	7,28	10,44	43,46	249,96	17,50	1461,26
Β3	3,00	12,00	0,41	12,39	7,17	11,48	30,86	2,60	24,01	0,00	0,00	86,97	8,08	9,36	43,89	258,75	116,71	1355,33
Β4	3,00	12,00	0,76	12,59	8,54	20,83	31,81	1,42	23,13	2,68	5,26	95,76	6,90	3,42	41,82	222,14	114,34	1525,10
Β5	3,00	12,00	0,42	12,62	7,45	11,97	30,66	2,27	22,25	0,00	0,00	88,83	9,82	8,53	46,73	269,48	86,52	1653,33
Κ1	3,00	12,00	0,45	17,11	9,53	5,18	27,67	7,69	23,03	0,00	0,00	56,14	0,00	1,79	59,41	292,68	73,48	1594,65
Κ2	3,00	12,00	0,86	15,70	9,21	4,27	21,36	5,84	23,38	0,00	0,00	45,54	0,00	4,96	63,00	267,54	33,84	1534,15
Κ3	3,00	12,00	0,13	17,33	10,92	5,79	23,50	8,24	23,66	0,00	0,00	58,55	0,00	4,25	64,76	292,38	101,31	1376,07
Κ4	3,00	12,00	0,81	17,50	10,26	5,85	23,90	6,78	25,08	0,00	6,95	71,38	0,00	4,31	68,42	288,71	51,04	1324,99
Κ5	3,00	12,00	0,48	17,54	10,81	5,39	21,74	8,21	22,96	0,00	0,00	53,73	0,00	1,29	56,22	288,49	16,73	1607,64
Κ6	3,00	12,00	0,50	17,87	10,59	5,05	25,85	16,21	25,07	0,00	0,00	55,77	0,00	1,42	54,41	294,32	15,05	1456,55
Μ1	3,00	12,00	0,22	8,37	1,27	2,13	48,90	14,59	32,26	0,23	0,00	148,54	0,00	2,12	15,99	316,25	4,35	1756,32
Μ2	3,00	12,00	0,21	8,77	2,24	1,38	50,21	19,30	33,36	0,27	0,00	144,07	0,00	2,12	15,08	298,28	5,75	1699,50
Μ3	3,00	12,00	0,21	9,17	2,36	2,39	53,37	19,32	36,29	0,27	0,00	151,03	0,00	1,77	13,99	324,83	5,39	1639,11
Μ4	3,00	12,00	0,21	9,24	1,02	1,22	52,82	19,70	31,04	0,27	5,90	125,76	0,00	2,01	15,14	309,77	4,60	1590,73

M5	3,00	12,00	0,08	8,64	1,77	1,46	54,04	19,65	35,26	0,26	0,00	151,10	0,00	1,87	13,80	306,82	6,30	1665,60
M6	3,00	12,00	0,33	9,04	3,00	1,33	56,03	26,03	30,76	0,26	0,00	148,86	0,00	1,70	14,39	313,50	5,89	1698,06
A1	6,00	12,00	0,52	12,29	3,73	3,24	10,39	1,74	15,02	0,00	0,00	6,85	0,00	5,97	50,50	120,45	16,62	1474,11
A2	6,00	12,00	0,26	12,03	7,37	1,30	10,12	2,10	14,96	0,00	0,00	7,65	0,00	6,96	49,61	116,94	19,97	1353,67
A3	6,00	12,00	0,39	13,93	5,08	1,74	10,59	2,75	16,68	0,00	0,00	6,02	0,00	7,52	53,30	140,49	13,92	1764,87
A4	6,00	12,00	0,18	14,04	5,34	4,37	11,77	2,09	16,49	0,00	18,85	7,55	0,00	8,43	56,52	131,18	56,93	1503,87
A5	6,00	12,00	0,29	16,44	6,05	1,87	12,13	3,47	18,51	0,00	0,00	7,98	0,00	11,70	62,30	141,79	14,08	1741,32
B1	6,00	12,00	0,46	11,79	6,05	5,93	20,33	2,03	22,34	0,00	0,00	73,66	9,00	11,14	48,33	222,16		1628,04
B2	6,00	12,00	0,43	11,75	6,01	8,34	21,40	1,91	19,14	0,00	0,00	80,78	9,74	7,30	48,69	226,93	24,18	1703,73
B3	6,00	12,00	0,37	11,48	5,73	11,47	22,70	2,63	21,75	0,00	0,00	90,94	8,44	10,39	49,29	229,94	78,88	1543,77
B4	6,00	12,00	0,25	12,85	6,81	19,21	26,58	2,81	23,09	0,00	13,26	87,09	6,04	3,71	43,50	215,32	69,57	1742,02
B5	6,00	12,00	0,34	13,01	6,14	18,65	24,59	2,92	25,80	1,33	0,00	104,35	9,15	10,14	54,09	218,15	15,10	1669,07
K1	6,00	12,00	0,31	17,27	4,12	5,44	17,65	6,99	22,48	0,00	0,00	51,78	0,00	4,87	62,56	257,39	38,47	1501,62
K2	6,00	12,00	0,17	17,64	4,00	5,87	19,01	7,58	25,19	0,00	0,00	55,68	0,00	4,69	70,31	263,81	17,60	1556,30
K3 (6,00	12,00	0,00	17,02	3,76	5,25	20,81	9,16	23,57	0,00	0,00	56,67	0,00	7,30	72,95	255,19	100,41	1482,25
K4	6,00	12,00	0,13	17,56	3,53	5,00	18,76	8,49	23,14	0,00	14,96	49,23	0,00	5,45	68,87	261,00	27,39	1471,09
K5	6,00	12,00	0,21	17,05	3,84	5,79	19,30	9,07	22,98	0,00	0,00	58,41	0,00	4,69	63,62	267,59	16,43	1783,08
K6	6,00	12,00	0,36	17,53	3,32	5,12	17,78	28,02	23,30	0,00	0,00	59,06	0,00	3,93	67,67	289,99	25,22	1662,17
M1	6,00	12,00	0,26	9,27	2,01	3,24	47,25	16,39	36,24	0,00	0,00	148,49	0,00	1,61	14,14	304,62	5,18	1902,36
M2	6,00	12,00	0,26	8,53	1,12	2,84	45,24	17,63	33,56	0,00	0,00	148,00	0,00	1,51	14,69	294,72	5,54	1847,27
M3	6,00	12,00	0,24	9,94	1,94	2,90	47,14	17,08	30,44	0,00	0,00	134,46	0,00	1,96	14,90	286,24	4,32	1843,48
M4	6,00	12,00	0,17	9,40	2,38	1,89	45,85	19,39	39,81	0,00	19,77	118,70	0,00	2,24	16,03	298,14	4,28	2013,41
M5	6,00	12,00	0,25	9,62	1,66	1,16	47,83	19,54	33,29	0,00	0,00	148,05	0,00	2,00	15,32	302,00	3,93	2005,39
M6	6,00	12,00	0,23	10,49	2,21	1,82	43,57	30,36	36,20	0,00	0,00	127,40	0,00	1,75	14,23	303,08	3,44	2024,95

	Ωρίμανση σε βαρέλι	Ωρίμανση σε φιάλη	ινοσιτόλη	φρουκτόζη	γλυκερόλη	μεθανόλη	χολίνη	κιτρικό οξύ	μηλικό οξύ	ηλεκτρικό οξύ	προλίνη	οξικό οξύ	αλανίνη	κιτρομηλικό οξύ	γαλακτικό οξύ	ισοπεντανόλη	β-γλυκόζη
A1	3	12	258,60	60,35	6241,81	6,52	14,00	114,49	1545,42	772,00	374,19	18,51	9,50	16,77	53,05	17,77	27,47
A2	3	12	271,84	56,14	6383,19	6,00	14,23	28,77	126,11	807,32	371,54	18,35	6,25	16,72	612,65	8,25	0,00
A3	3	12	286,92	99,42	6895,64	6,62	15,76	64,78	239,35	838,87	390,73	19,45	9,13	13,84	646,62	11,48	61,99
A4	3	12	265,37	69,28	6410,76	7,17	14,60	123,10	1559,52	798,16	391,17	18,37	10,62	17,07	59,87	11,06	16,59
A5	3	12	268,22	99,99	6748,64	6,29	15,53	86,76	147,24	764,71	378,05	18,23	8,49	14,09	595,28	13,48	53,91
B1	3	12	432,06	38,92	7495,54	4,72	29,73	162,34	0,00	990,88	265,61	45,43	17,02	9,73	886,98	26,87	0,00
B2	3	12	434,96	51,90	7425,09	4,90	29,49	157,72	0,00	987,57	266,77	41,66	16,25	9,92	878,72	27,59	0,00
B3	3	12	464,16	227,49	8074,54	5,11	31,58	181,06	0,00	959,90	279,91	37,49	16,45	11,02	799,93	26,17	230,15
B4	3	12	366,41	214,77	7675,56	5,23	30,25	152,51	2063,64	959,31	310,06	39,67	17,48	19,76	59,26	27,29	192,71
B5	3	12	464,20	266,38	8197,09	4,42	31,38	192,15	0,00	1058,71	274,42	40,33	14,47	10,19	792,50	24,25	179,12
K1	3	12	321,98	140,05	9438,63	22,10	22,99	0,00	0,00	1234,80	737,65	46,15	13,45	24,20	562,80	20,44	123,36
K2	3	12	318,16	81,90	8885,84	23,64	21,38	0,00	0,00	1156,50	677,19	37,13	12,50	20,15	551,44	19,44	62,87
K3	3	12	335,52	117,11	9479,41	25,34	22,50	0,00	0,00	1243,22	745,49	44,29	14,10	20,70	534,39	21,20	155,27
K4	3	12	335,31	122,61	9496,97	25,11	22,72	0,00	0,00	1215,26	721,54	48,56	12,26	20,63	584,89	19,92	87,36
K5	3	12	333,08	106,05	9457,80	24,47	23,84	0,00	0,00	1237,18	735,18	38,43	13,91	24,17	543,57	15,93	0,00
K6	3	12	357,76	34,12	9855,00	25,77	24,31	0,00	0,00	1259,34	741,69	49,78	14,50	24,97	585,52	17,15	0,00
M1	3	12	285,80	88,44	8313,93	13,76	24,46	177,84	0,00	1252,36	143,70	39,01	9,23	24,67	427,59	23,76	0,00
M2	3	12	266,03	82,80	7773,77	13,25	23,31	166,78	0,00	1175,61	143,07	45,84	8,55	22,38	406,63	26,03	0,00
M3	3	12	297,21	86,76	8317,60	14,07	24,82	175,97	0,00	1246,59	151,08	49,96	9,35	25,11	425,39	26,90	0,00
M4	3	12	275,44	74,82	7970,72	13,52	24,09	167,60	0,00	1193,94	146,76	55,61	8,91	22,86	419,93	29,11	0,00
M5	3	12	290,11	87,17	8224,98	13,92	24,48	176,66	0,00	1243,63	150,06	57,61	9,10	24,44	426,20	27,59	0,00
M6	3	12	299,84	81,61	8408,23	14,21	24,97	184,20	0,00	1273,42	155,39	65,76	9,53	24,07	444,25	34,20	0,00
Δ1	6	12	278,72	29,96	5663,10	6,10	13,69	0,00	160,91	696,10	343,55	14,86	7,48	18,74	390,87	9,01	0,00

A2	6	12	265,53	43,00	5637,39	6,05	13,40	50,38	205,39	714,92	334,93	13,48	6,38	17,50	387,30	8,24	0,00
A3	6	12	318,29	42,37	6693,73	6,85	16,30	123,31	219,94	794,97	386,06	14,80	9,67	19,01	432,15	7,40	0,00
A4	6	12	308,47	51,39	6785,42	6,61	16,03	144,30	286,32	802,75	386,91	14,52	8,35	10,45	386,01	8,48	116,03
A5	6	12	360,58	20,66	7726,14	7,70	18,34	133,52	257,98	986,76	471,92	17,11	10,02	12,85	388,46	7,68	0,00
B1	6	12	404,95	0,00	7040,05	4,26	29,24	173,46	0,00	864,86	241,84	17,39	12,88	14,82	613,20	12,88	0,00
B2	6	12	373,27	108,85	7386,80	3,78	28,35	146,03	0,00	964,05	245,01	16,07	11,31	15,71	601,24	10,38	0,00
B3	6	12	429,10	240,46	7540,52	4,74	30,74	180,56	0,00	929,95	258,67	20,34	14,10	14,56	699,17	11,29	174,54
B4	6	12	502,80	187,37	7664,33	5,12	31,59	159,79	2102,52	920,39	276,66	18,70	17,35	10,33	50,95	13,63	129,66
B5	6	12	527,67	47,48	8065,57	5,21	33,35	185,45	1330,25	1031,36	327,31	24,66	18,75	12,15	374,84	11,45	0,00
K1	6	12	334,80	92,77	8966,77	24,70	24,19	0,00	0,00	1139,03	684,05	27,63	11,70	20,21	396,89	10,26	57,27
K2	6	12	354,33	17,31	9429,62	26,30	24,11	0,00	0,00	1204,65	703,44	34,24	12,84	22,07	465,32	14,46	0,00
K3 (6	12	344,57	137,25	9342,14	25,82	23,27	0,00	0,00	1217,13	715,17	34,10	13,21	20,54	450,79	15,02	199,30
K4	6	12	369,61	77,99	9135,85	24,99	23,07	0,00	0,00	1187,24	675,96	32,37	12,66	19,04	474,91	14,24	37,76
K5	6	12	335,76	37,61	9324,52	25,27	25,03	0,00	0,00	1199,60	694,59	30,91	13,53	23,68	458,98	12,74	0,00
K6	6	12	408,73	75,05	9685,24	25,87	26,20	0,00	0,00	1223,37	731,90	34,45	14,36	20,82	458,30	8,53	0,00
M1	6	12	266,24	99,23	7914,06	15,66	24,54	191,06	0,00	1214,21	138,58	22,15	7,40	25,89	363,50	25,44	0,00
M2	6	12	268,85	99,40	7711,34	15,56	24,16	189,57	0,00	1219,43	134,60	24,79	8,00	25,26	361,73	22,56	0,00
M3	6	12	256,58	99,66	7707,95	14,81	24,09	183,45	0,00	1213,27	129,38	33,60	3,61	23,28	351,60	33,75	0,00
M4	6	12	266,41	96,37	7957,50	15,40	24,62	182,91	0,00	1234,49	190,88	21,19	8,57	25,77	363,07	21,28	0,00
M5	6	12	275,79	81,53	8100,64	13,70	24,99	180,53	0,00	1244,36	138,17	37,55	8,44	24,35	179,62	37,06	0,00
M6	6	12	262,19	72,63	8189,34	13,83	24,97	193,19	0,00	1315,84	137,51	19,33	6,58	24,20	345,83	28,38	0,00

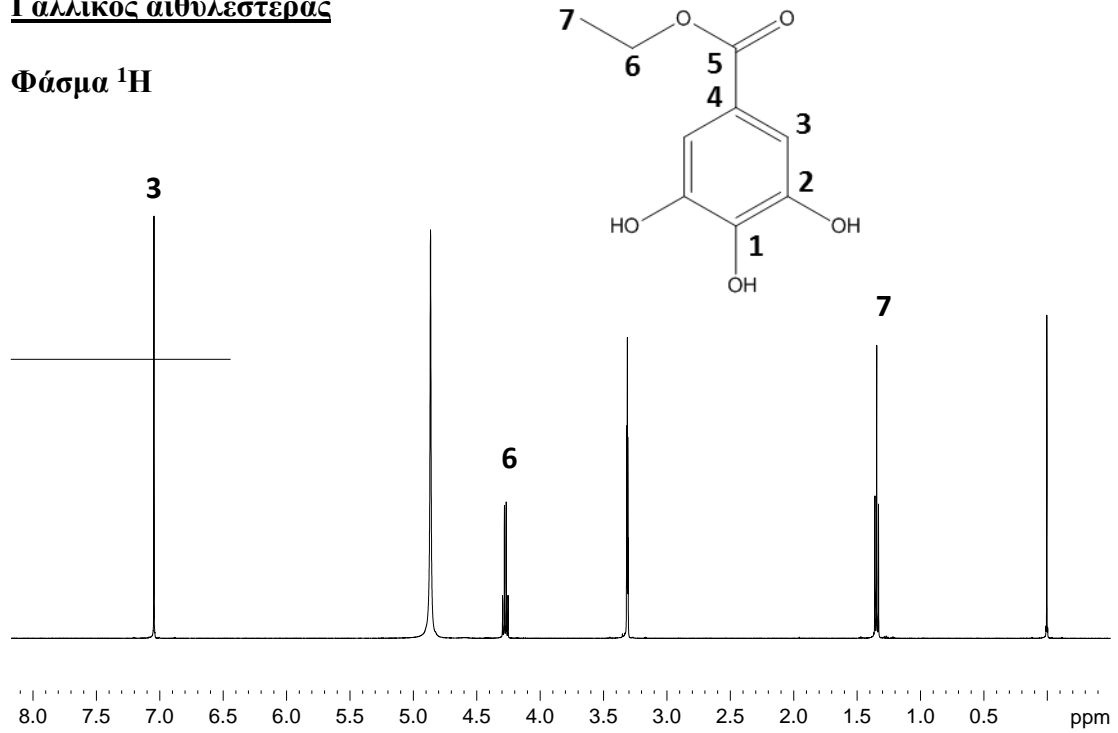
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2

ΦΑΣΜΑΤΑ NMR

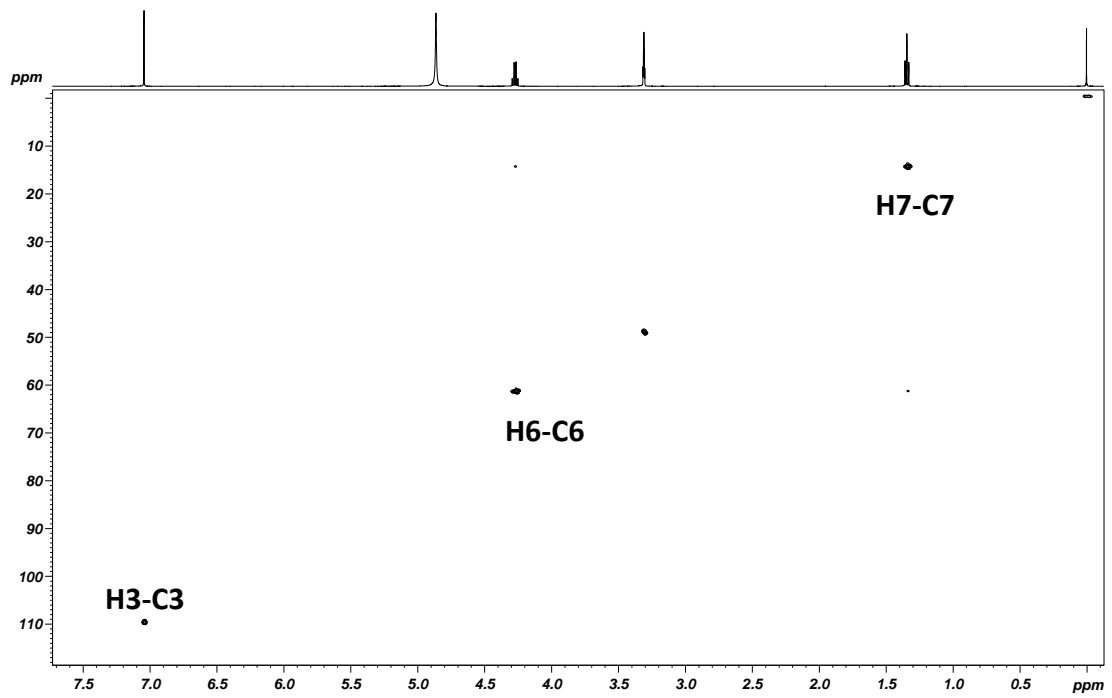
Ένωση-Δείγμα	Σελίδα
Γαλλικός αιθυλεστέρας	143
Καμφορόλη	145
Ουριδίνη	146
Κυτιδίνη	147
Φουμαρικό οξύ	148
Γαλακτουρονικό οξύ	150
Κατεχίνη	152
Επικατεχίνη	154
Κερσετίνη	156
Πεονιδίνη	158
Καφεϊκό οξύ	159
2-φαινυλοαιθανόλη	161
Μαλβιδίνη	162
Ρεσβερατρόλη	163
Ρομπινετίνη	164
1,3-προπανοδιόλη	165
Ουρακίλη	166
Τυροσόλη	167
Βανιλικό οξύ	168
Πρωτοκατεχικό οξύ	169
Κατεχίνη (³¹ P NMR)	170
Επικατεχίνη (³¹ P NMR)	171
Τυροσόλη (³¹ P NMR)	172
2-φαινυλοαιθανόλη (³¹ P NMR)	173
Βηλόνα	174
Κοτσιφάλι	176
Δαφνί	178
Μαντηλάρι	179

Γαλλικός αιθυλεστέρας

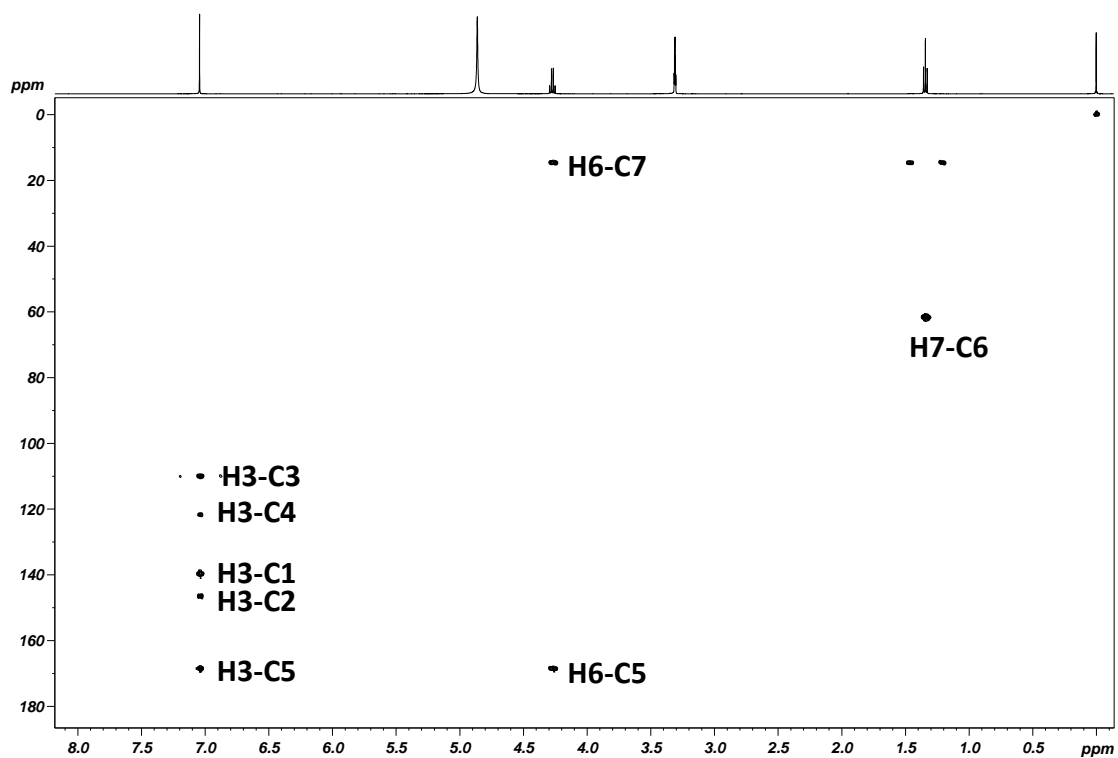
Φάσμα ^1H



HSQC

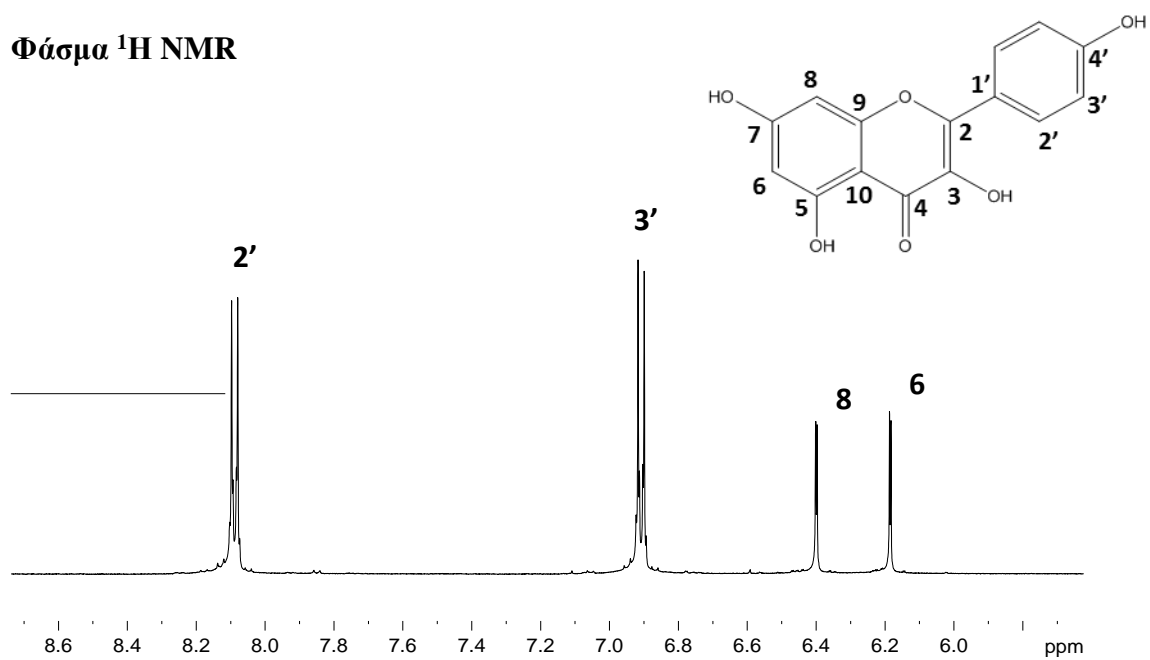


HMBC

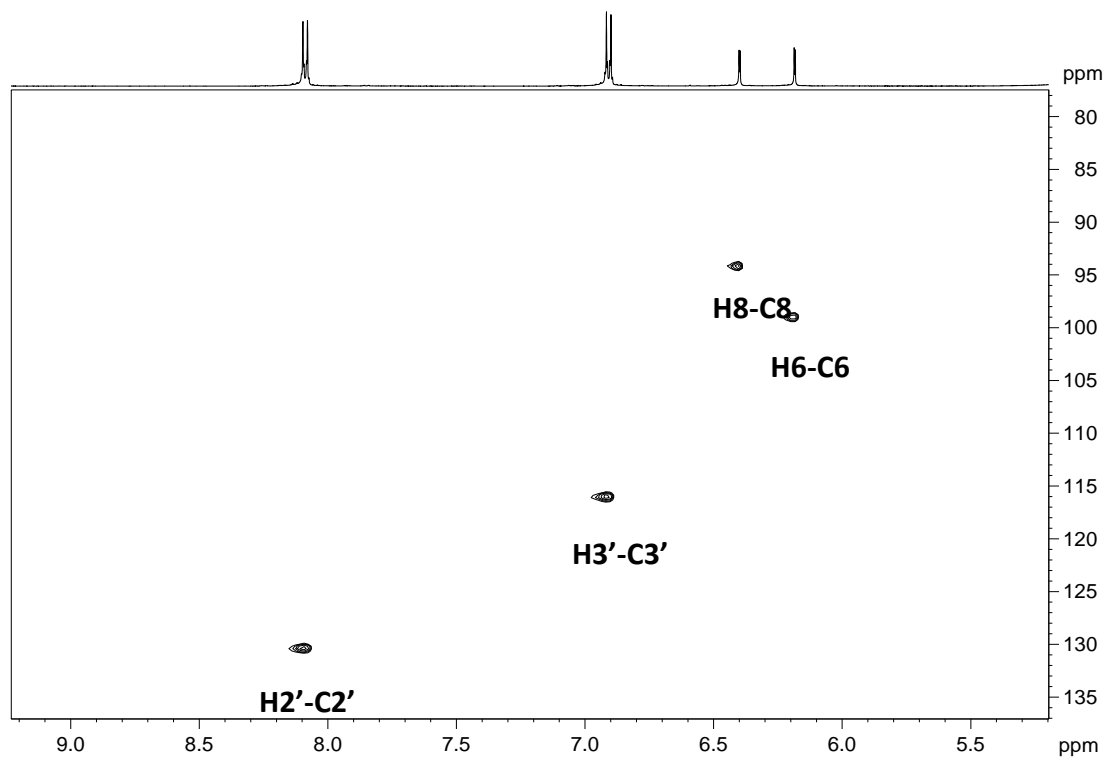


Καμφερόλη

Φάσμα ^1H NMR

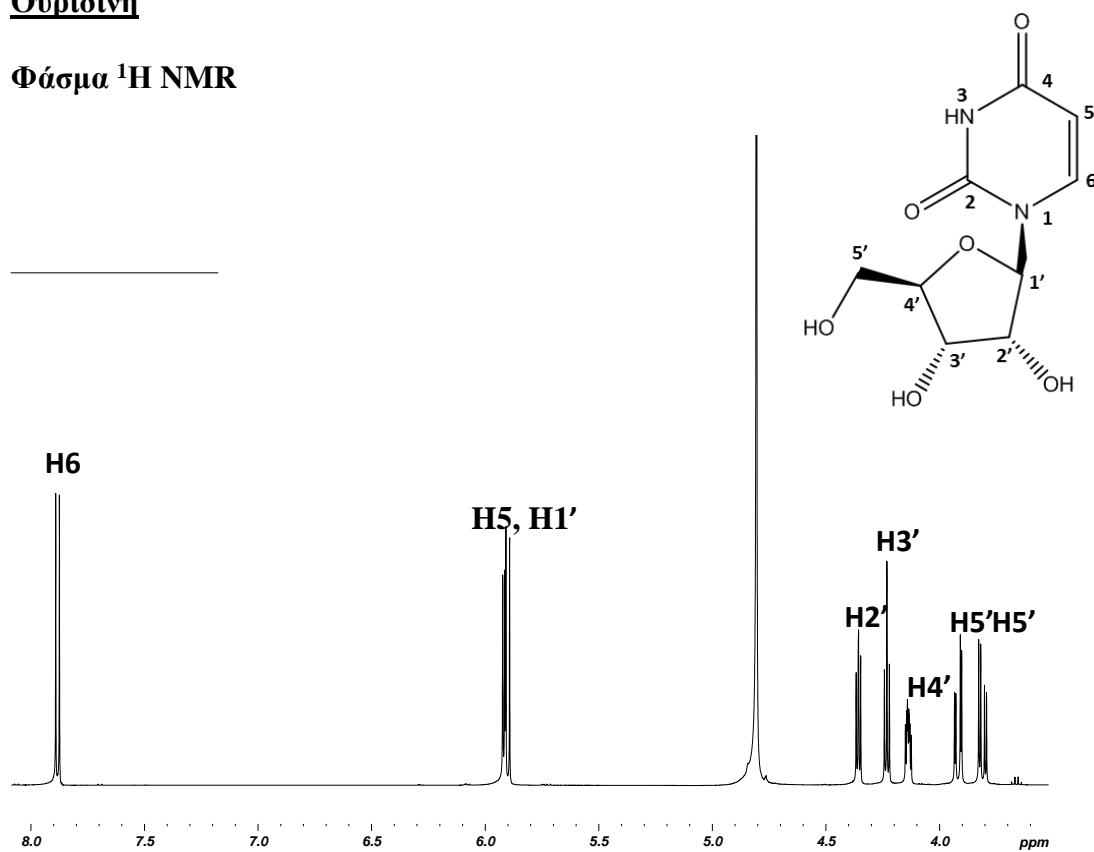


HSQC

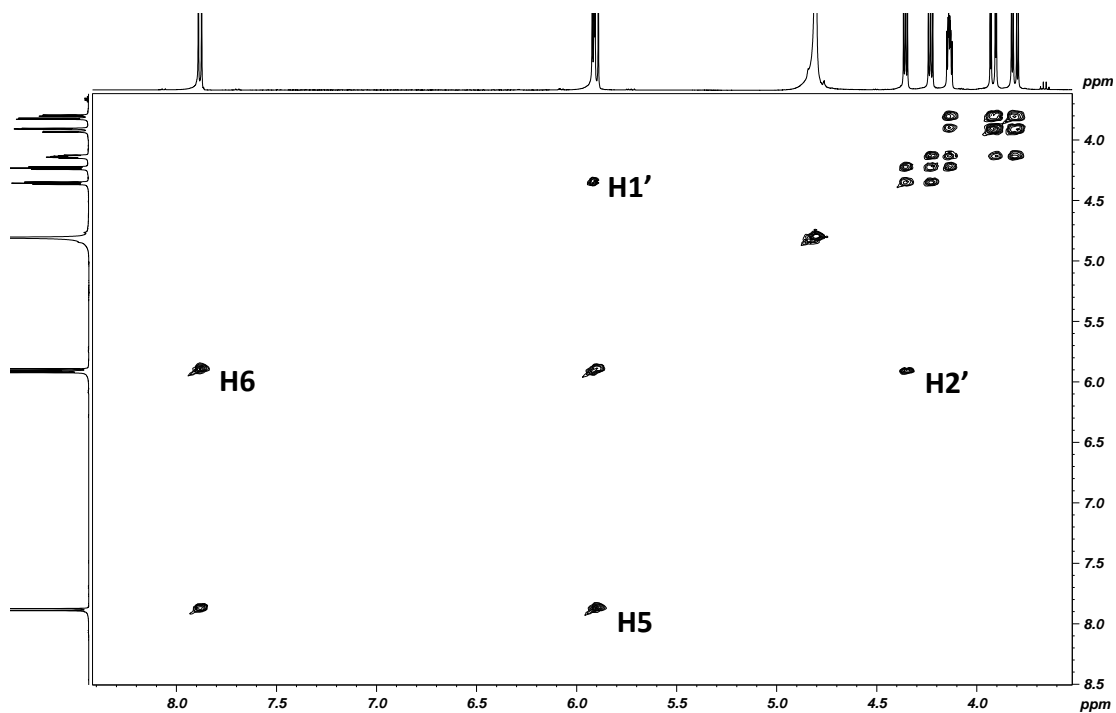


Ουριδίνη

Φάσμα ^1H NMR

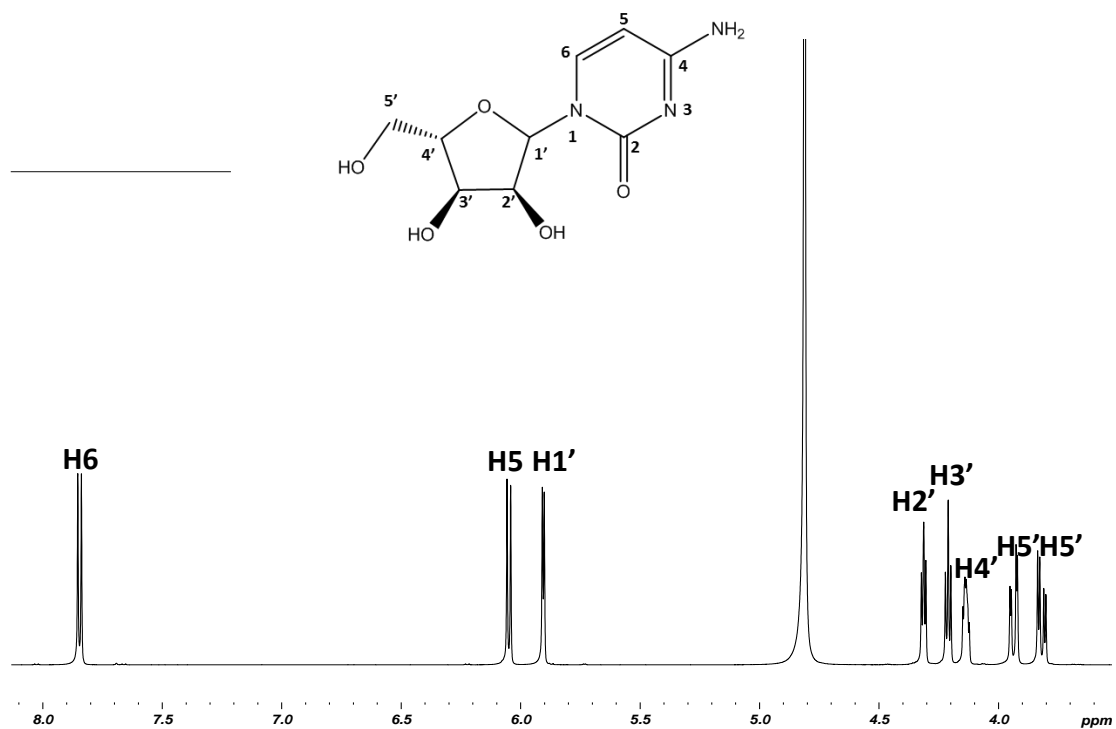


COSY

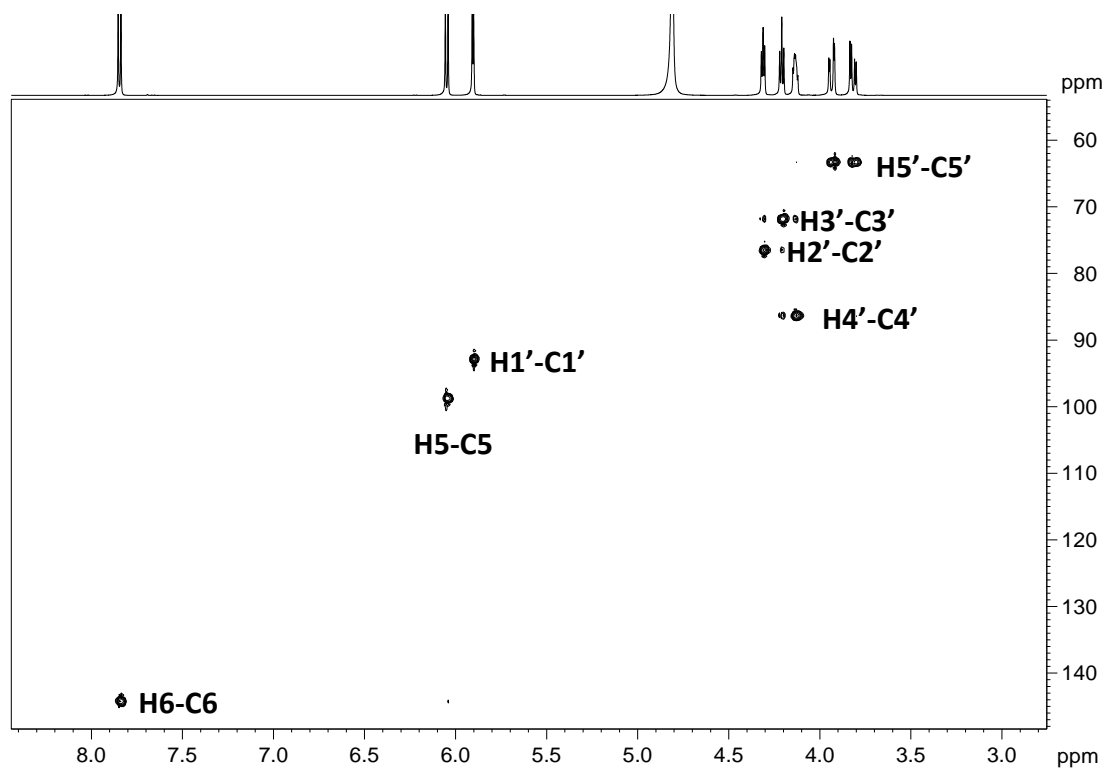


Κυτιδίνη

Φάσμα ^1H NMR

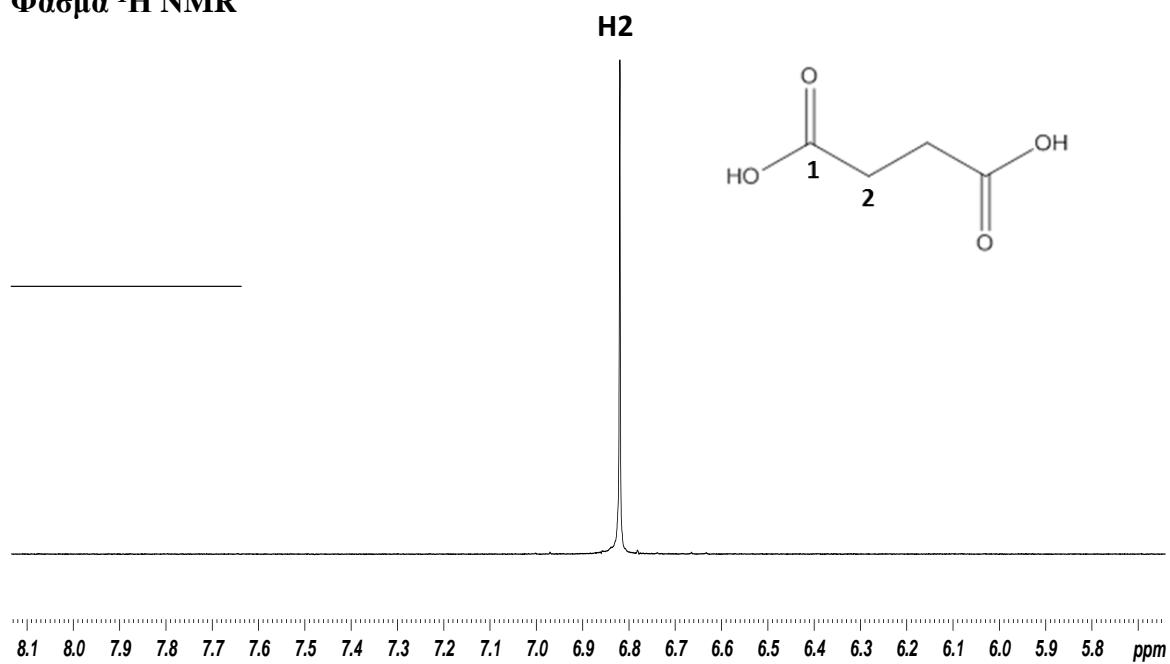


HSQC

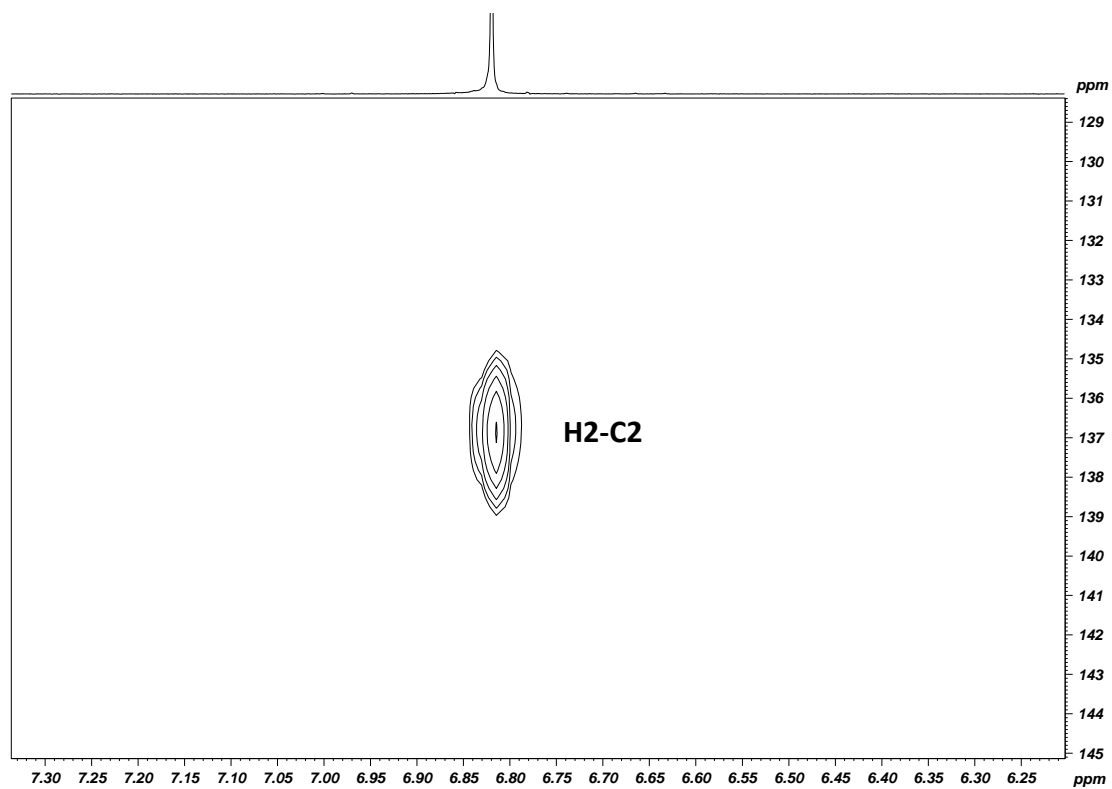


Φουμαρικό οξύ

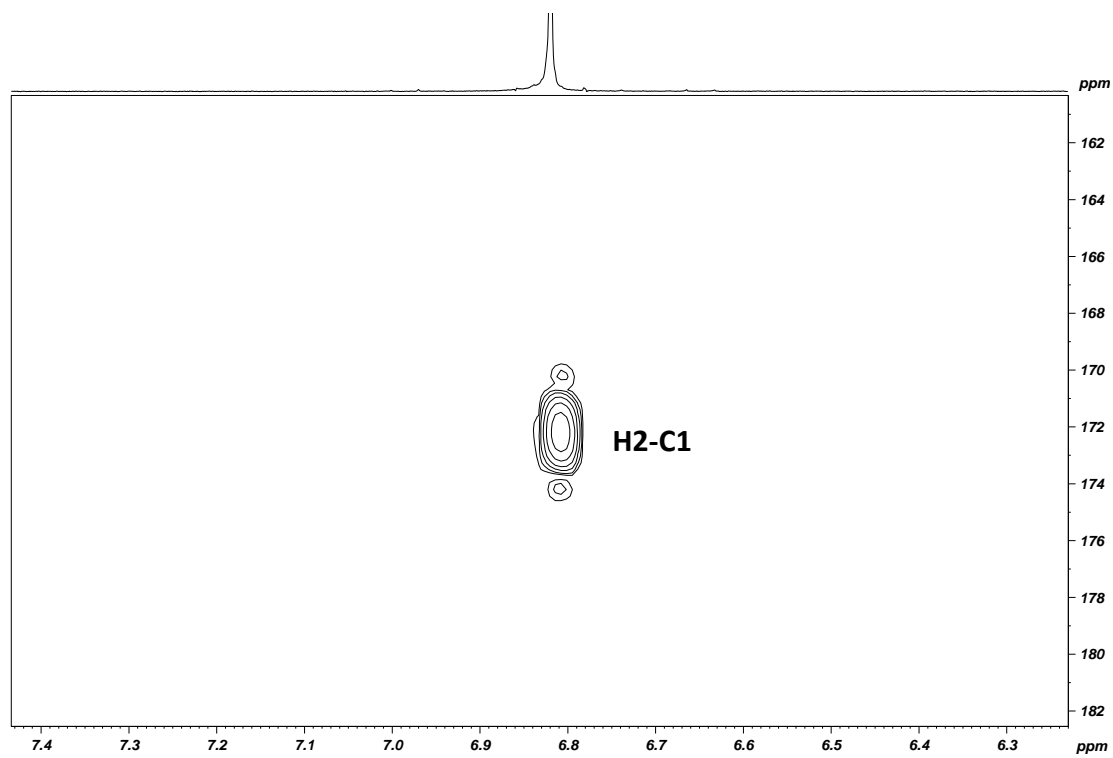
Φάσμα ^1H NMR



HSQC

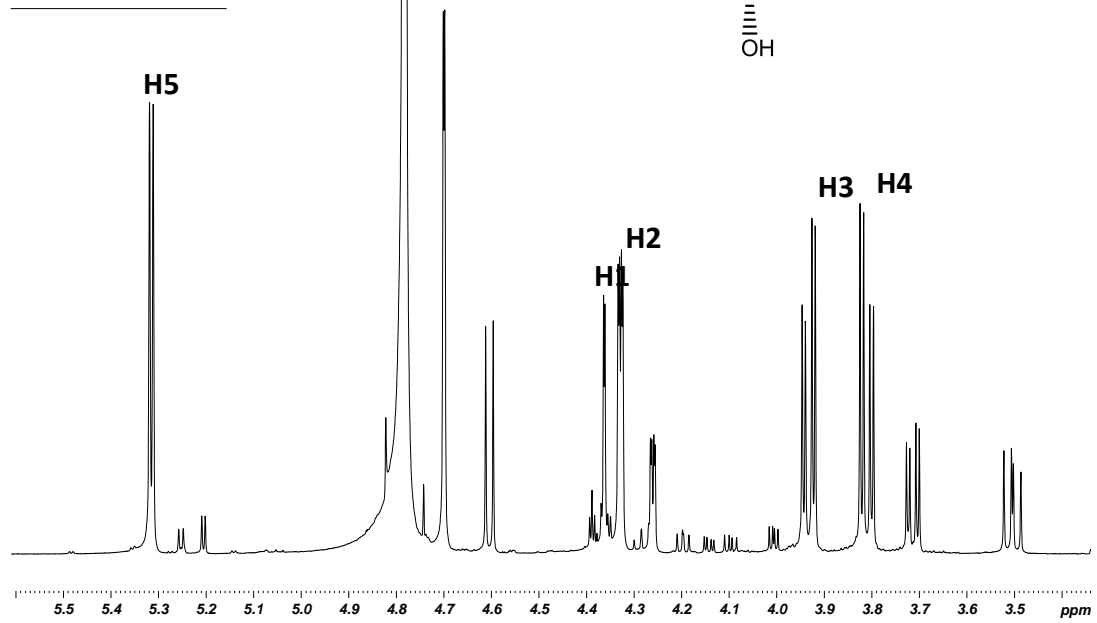
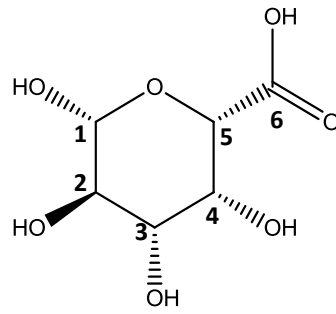


HMBC

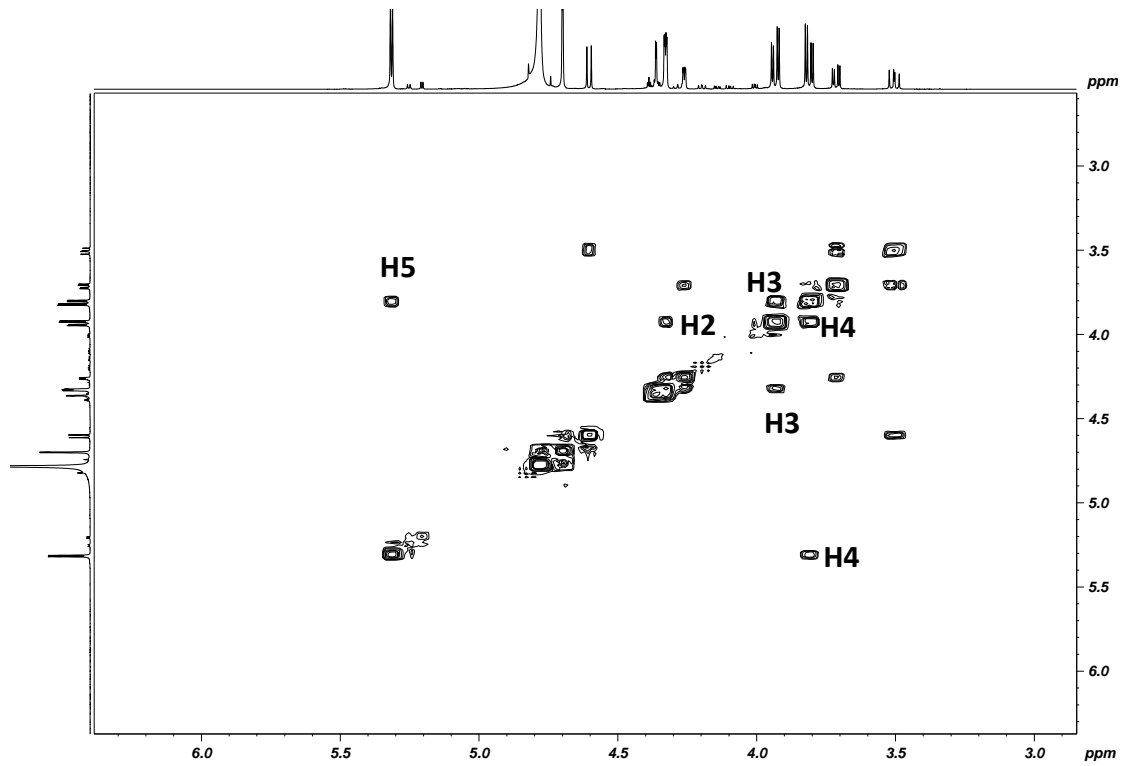


Γαλακτουρονικό οξύ

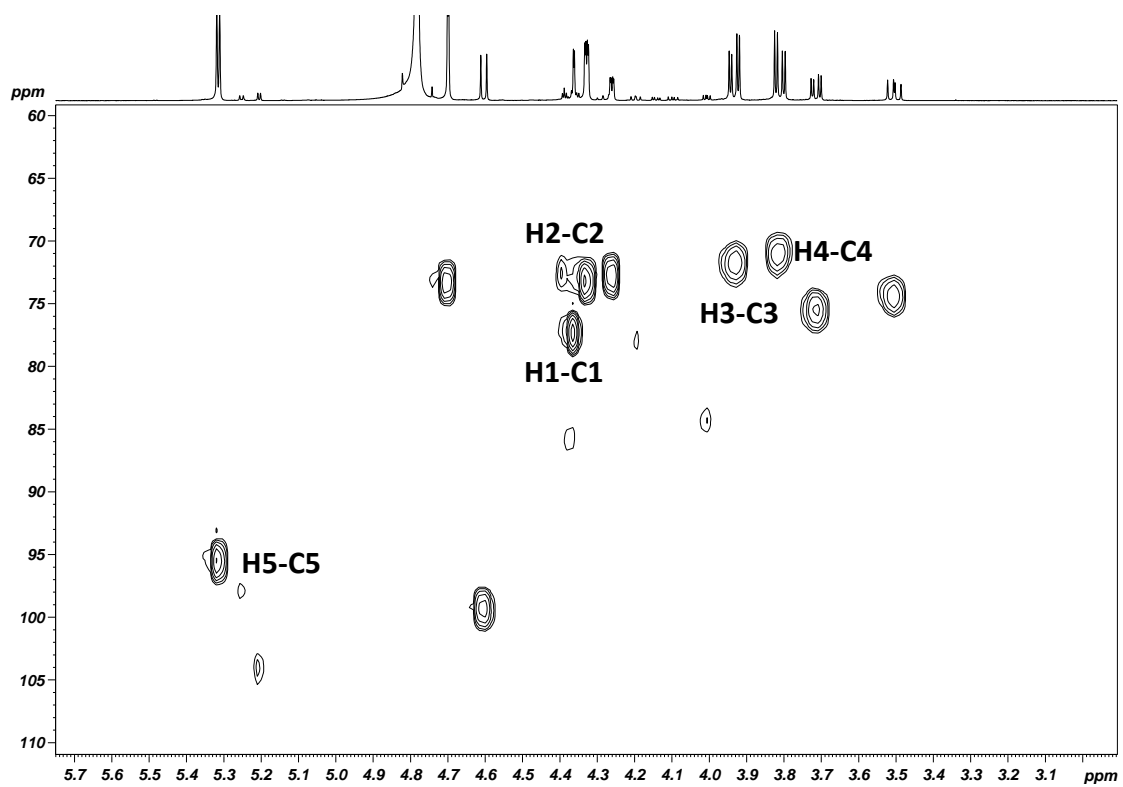
Φάσμα ^1H NMR



COSY

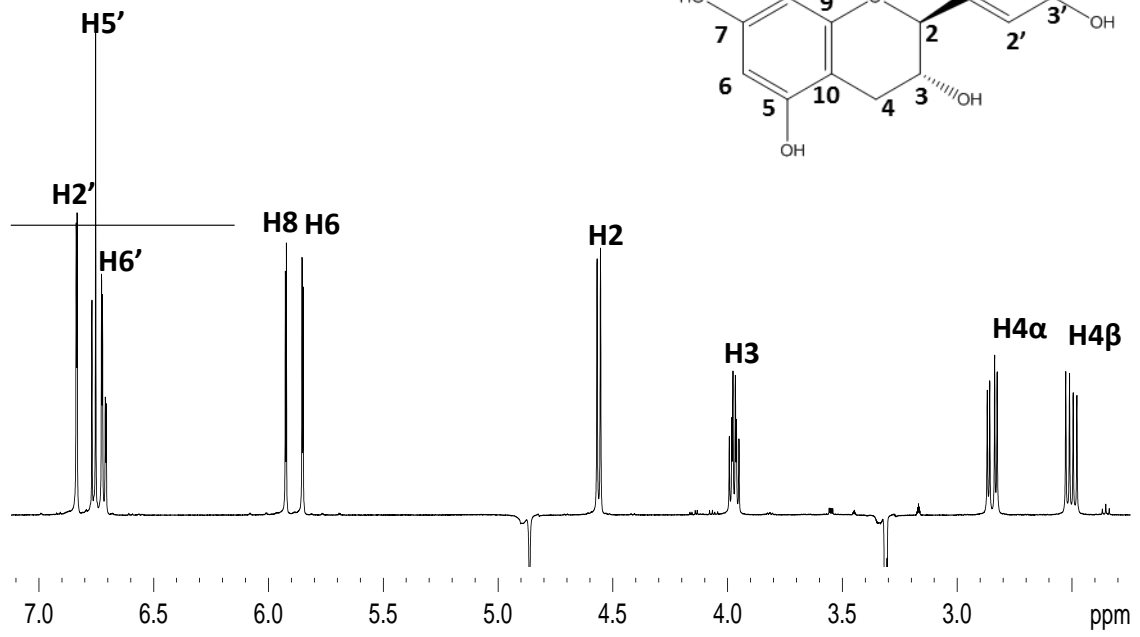
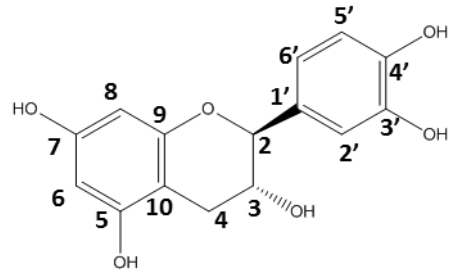


HSQC

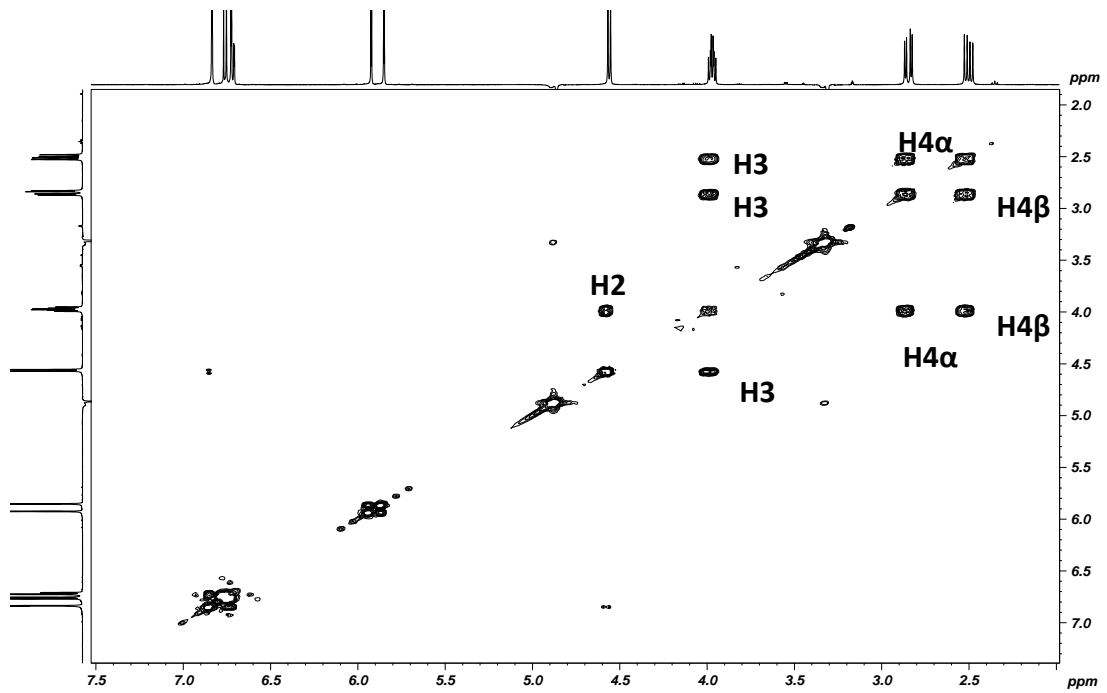


Κατεγίνη

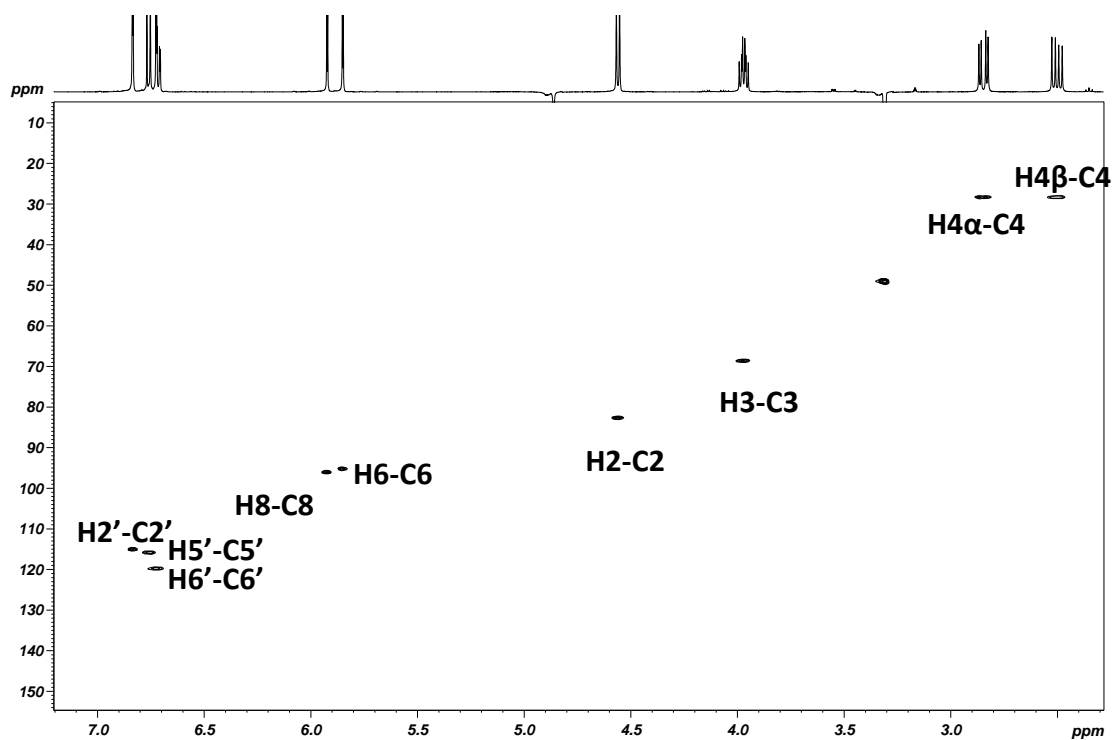
Φάσμα ^1H NMR



COSY

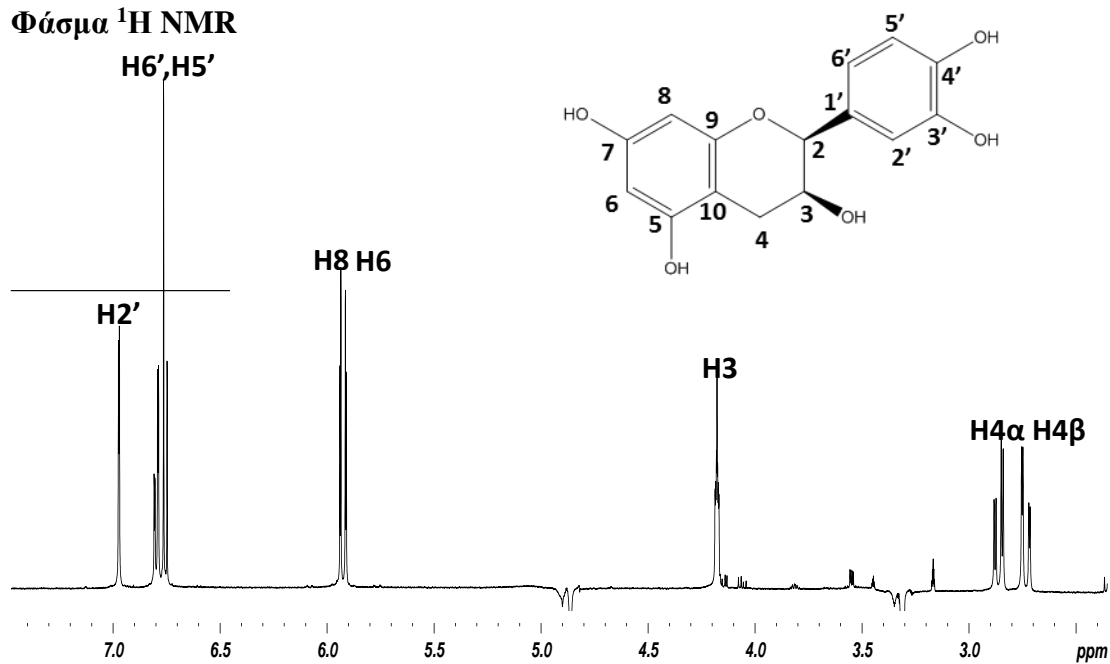


HSQC

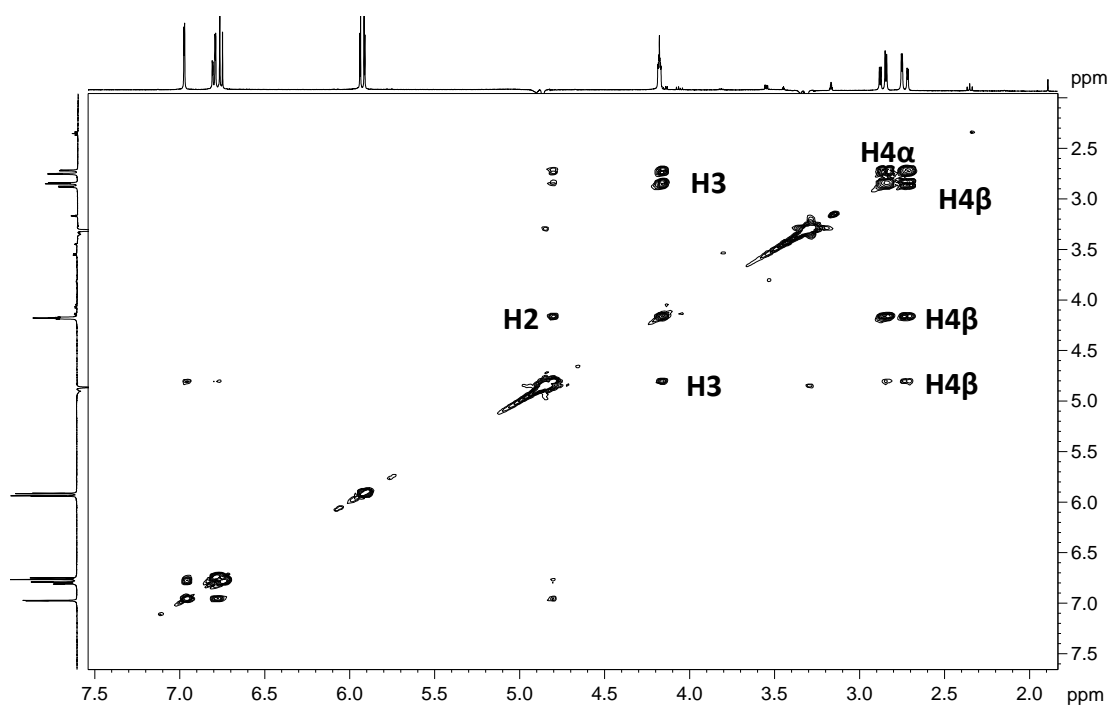


Ελικατεχίνη

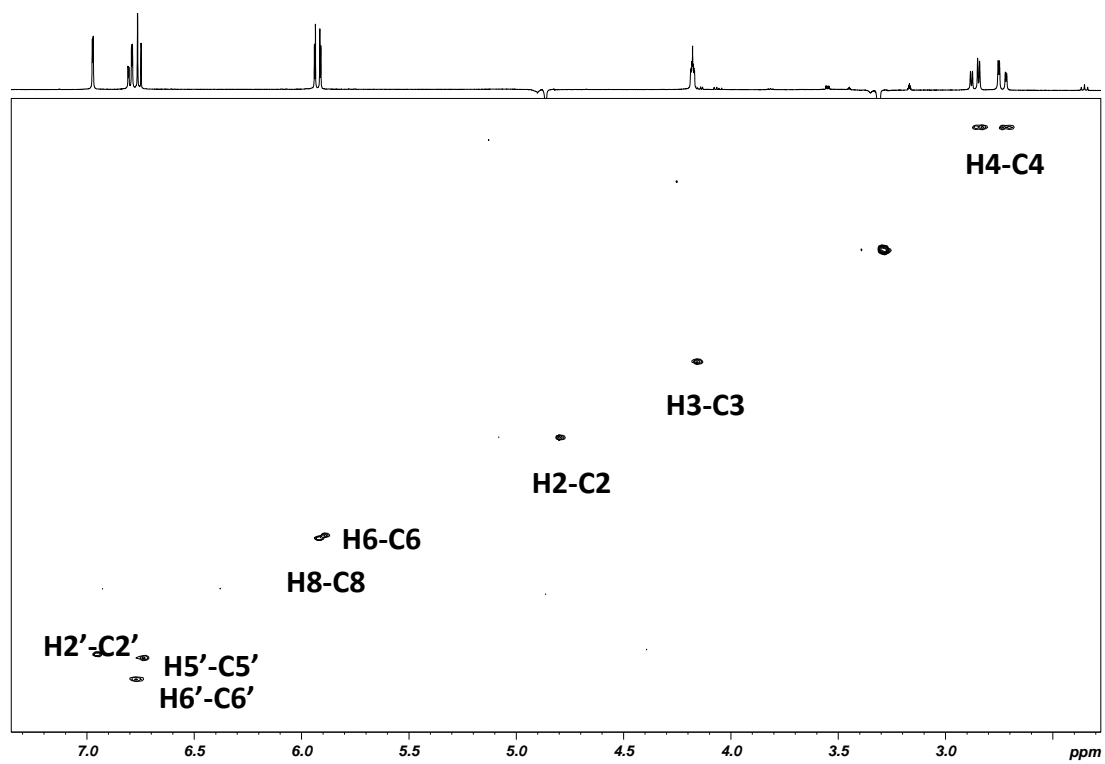
Φάσμα ^1H NMR



COSY

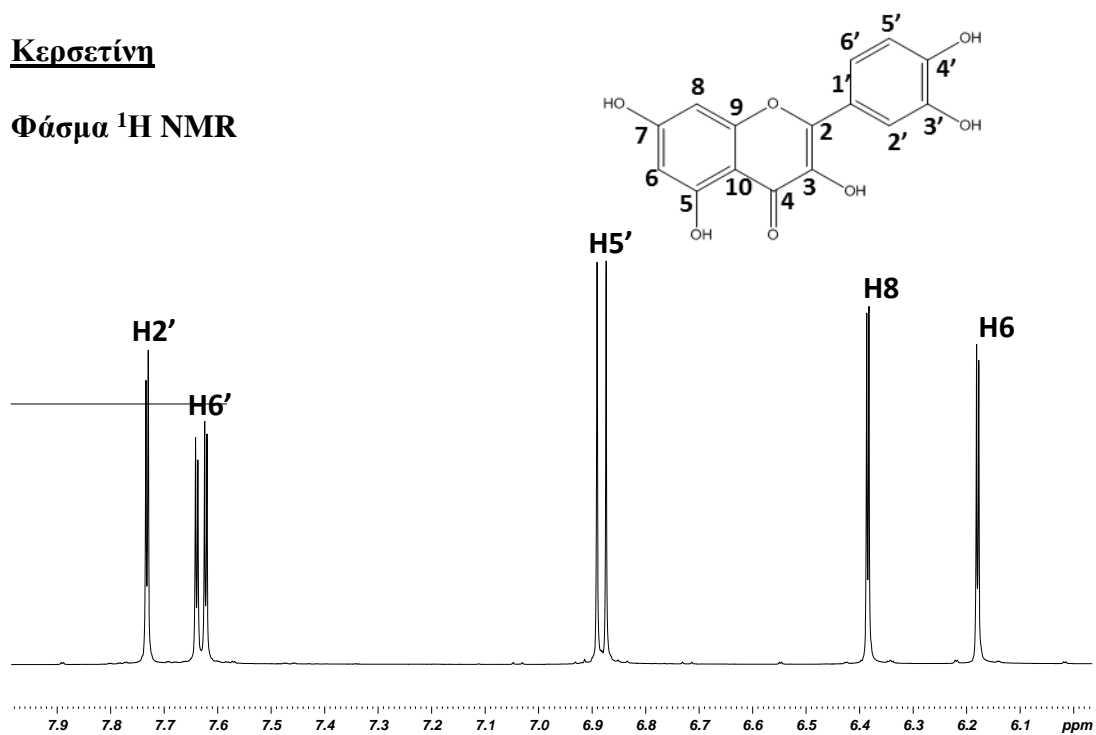


HSQC

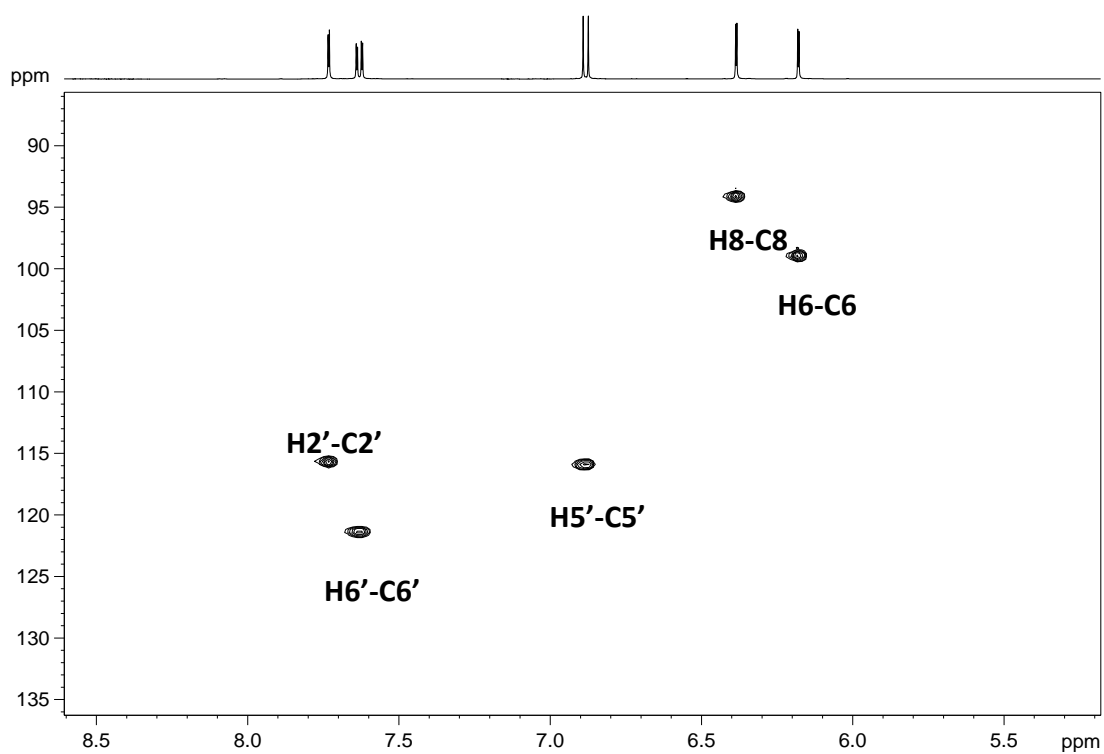


Κερσετίνη

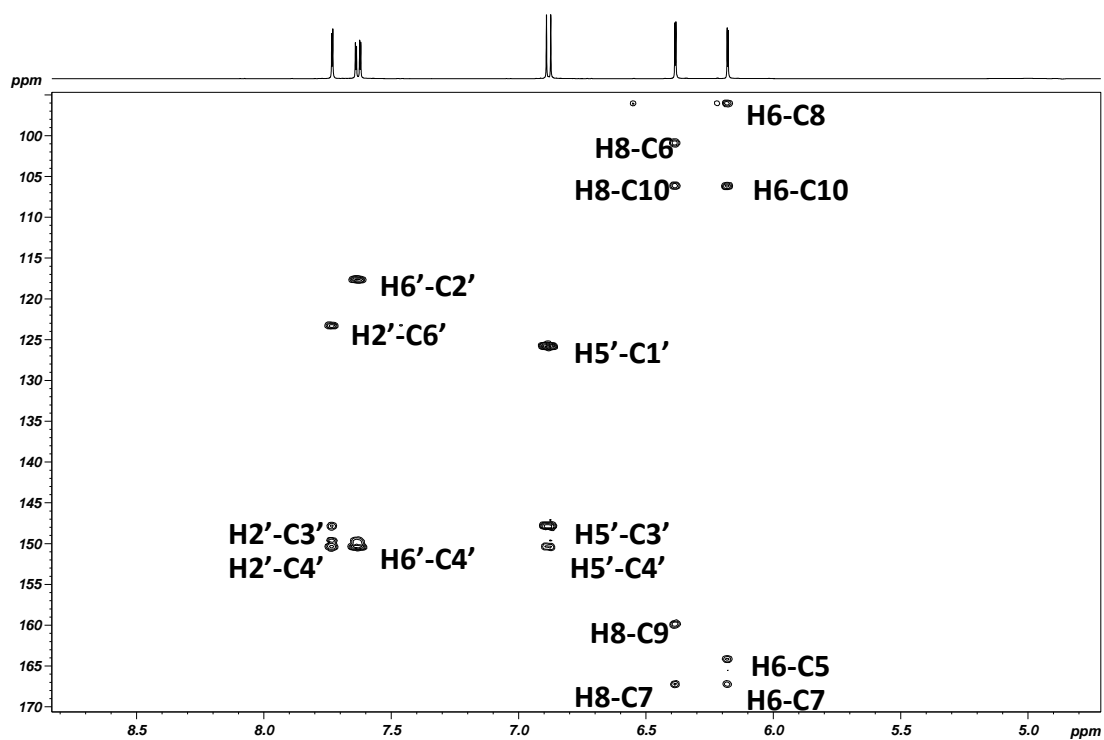
Φάσμα ^1H NMR



HSQC

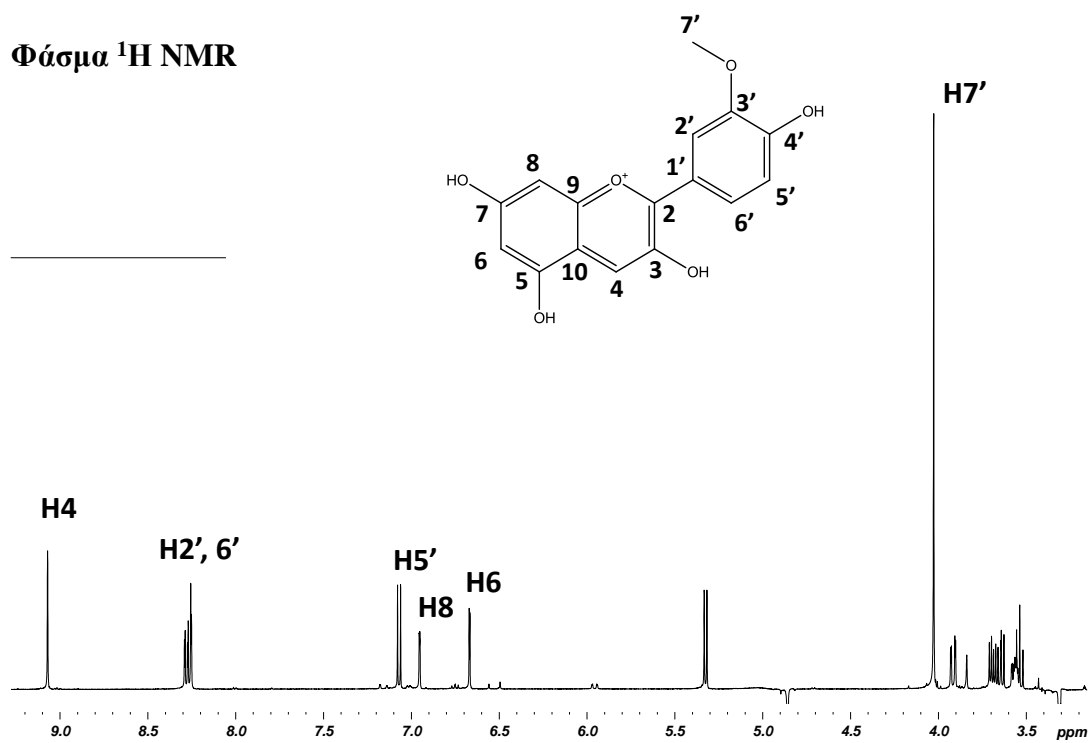


HMBC

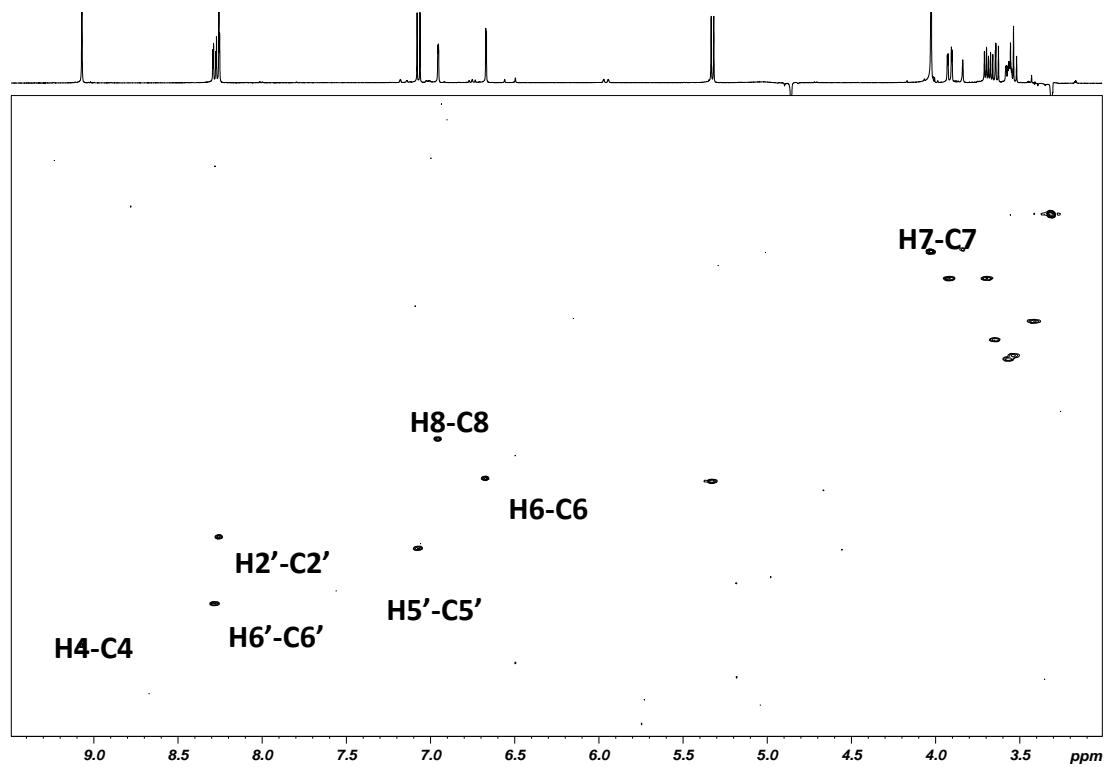


Πεονιδίνη

Φάσμα ^1H NMR

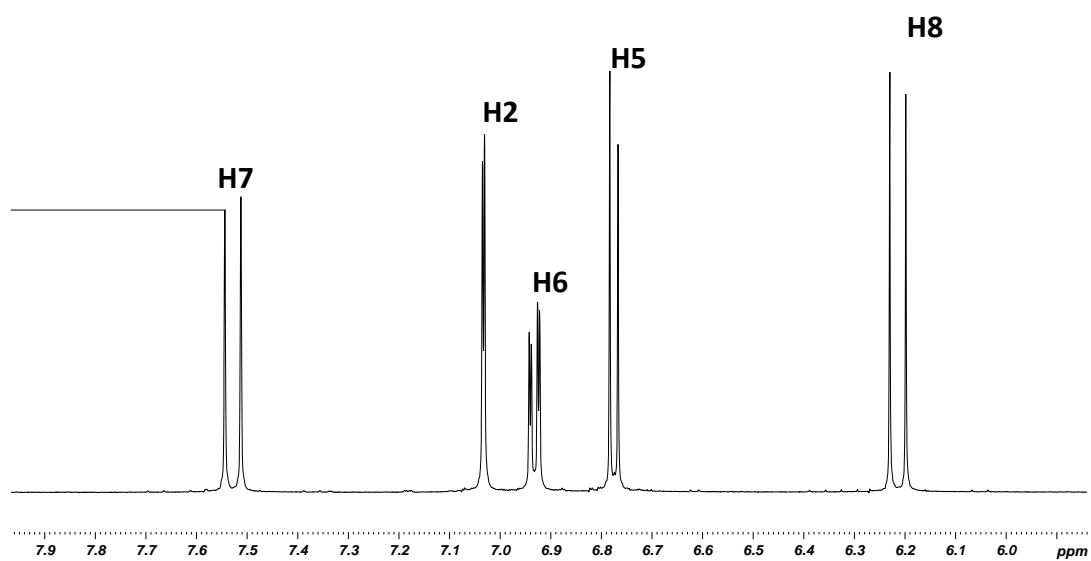
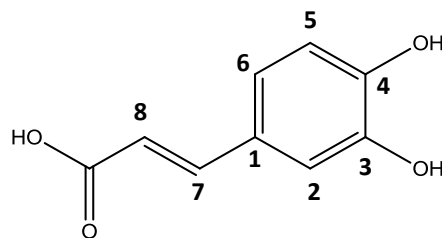


HSQC

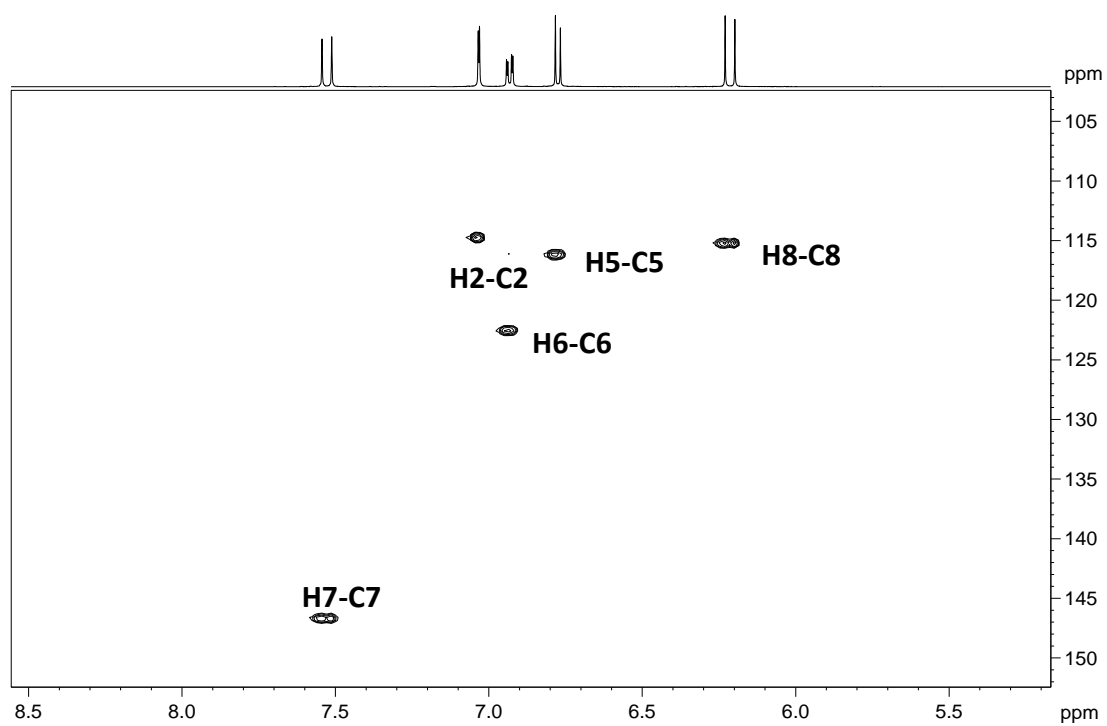


Καφεϊκό οξύ

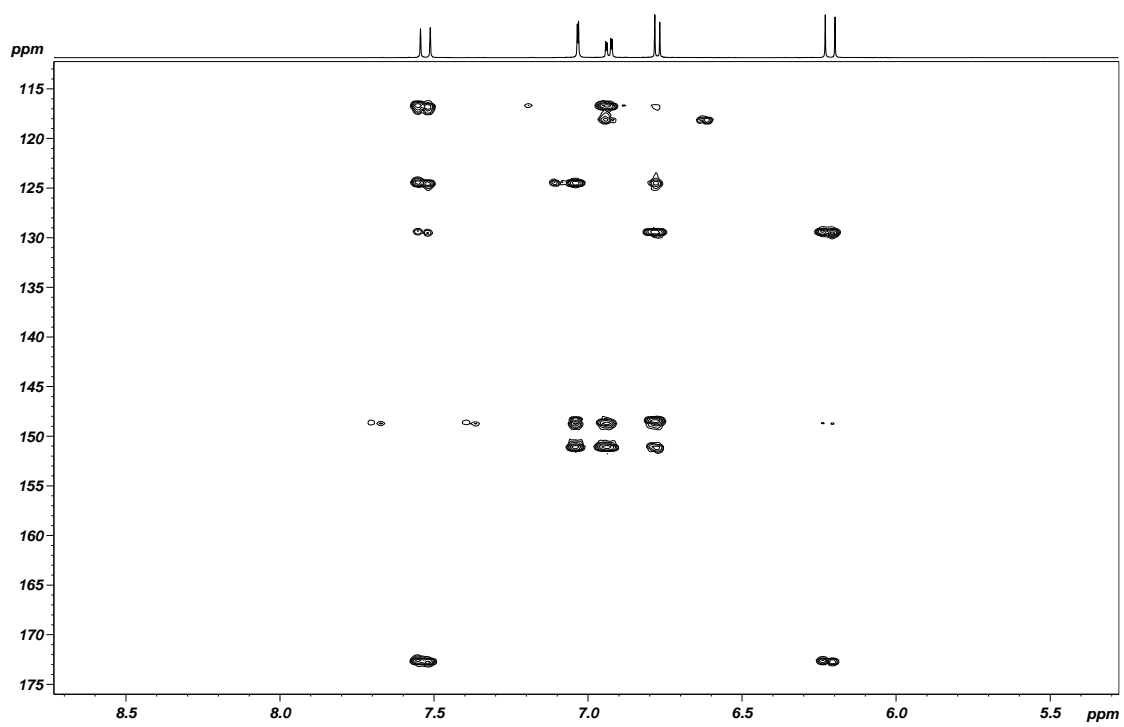
Φάσμα ^1H NMR



HSQC

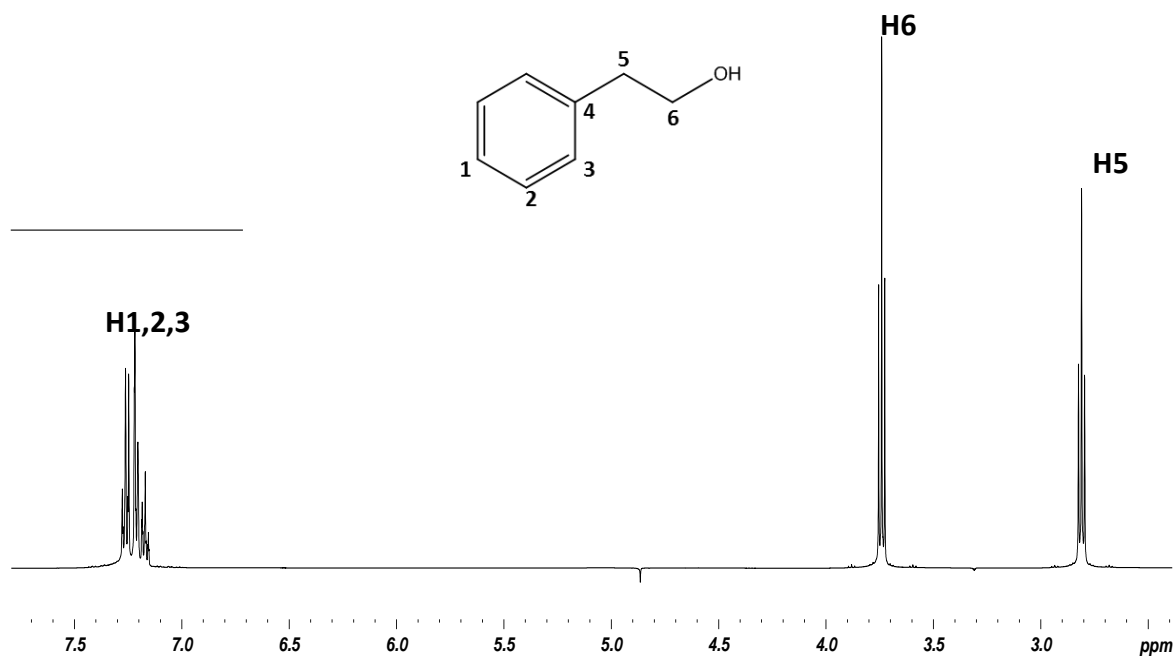


HMBC

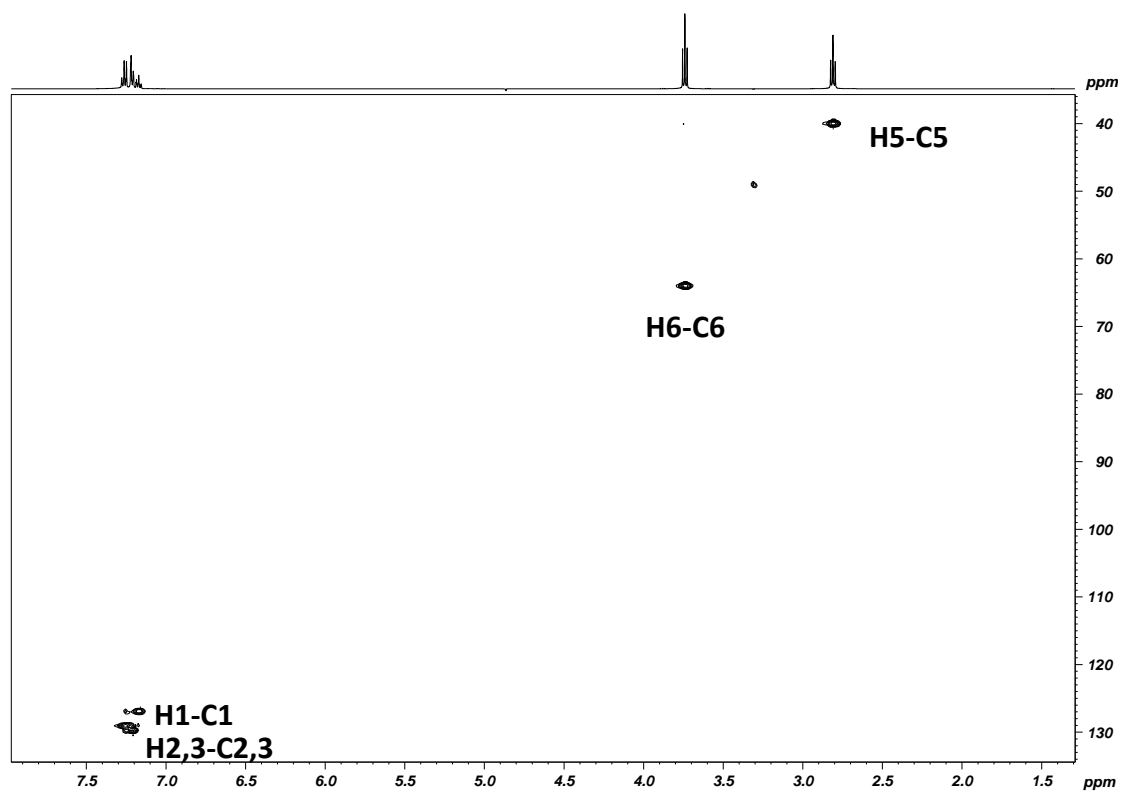


2-φαινυλο-αιθανόλη

Φάσμα ^1H NMR

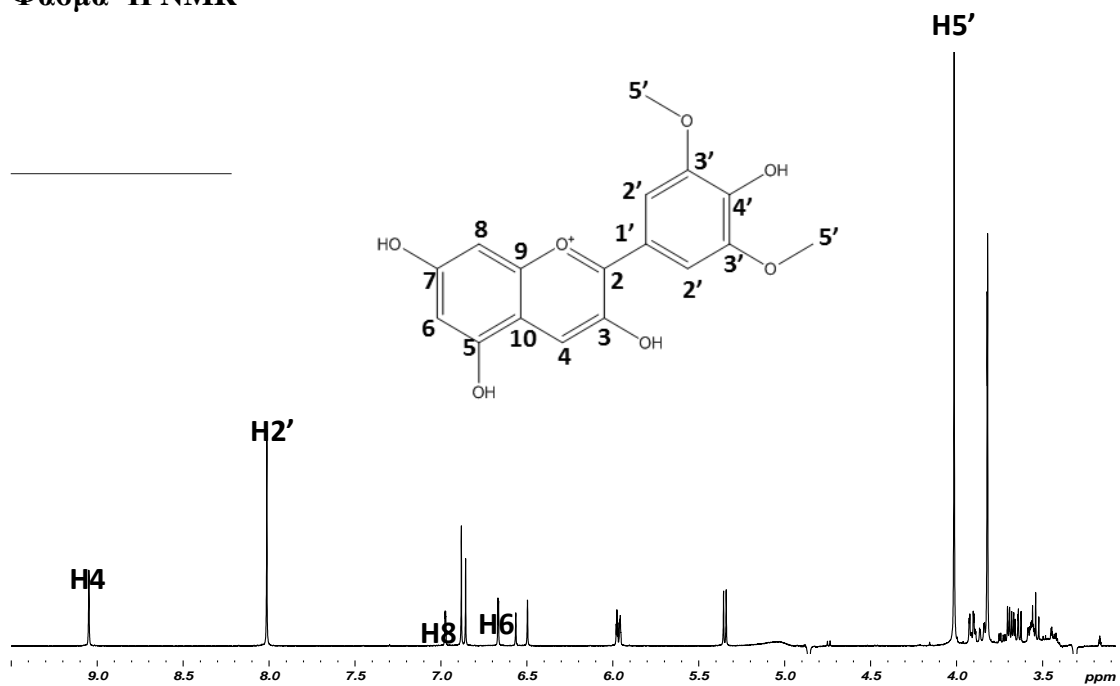


HSQC



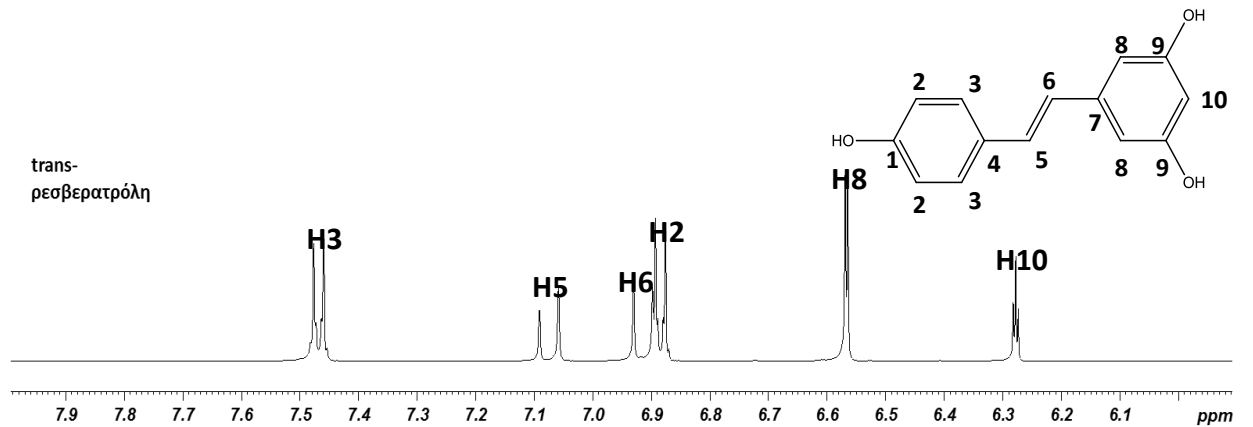
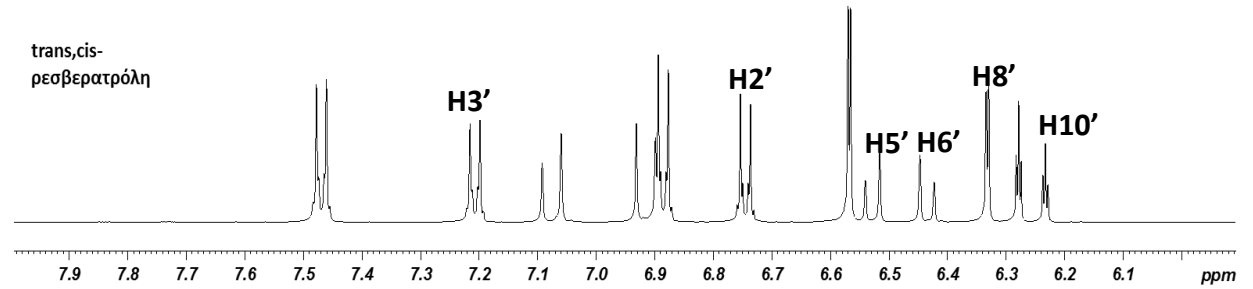
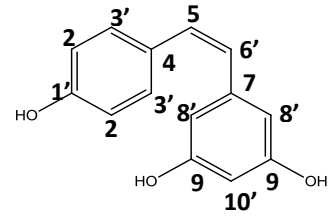
Μαλβιδίνη

Φάσμα ^1H NMR

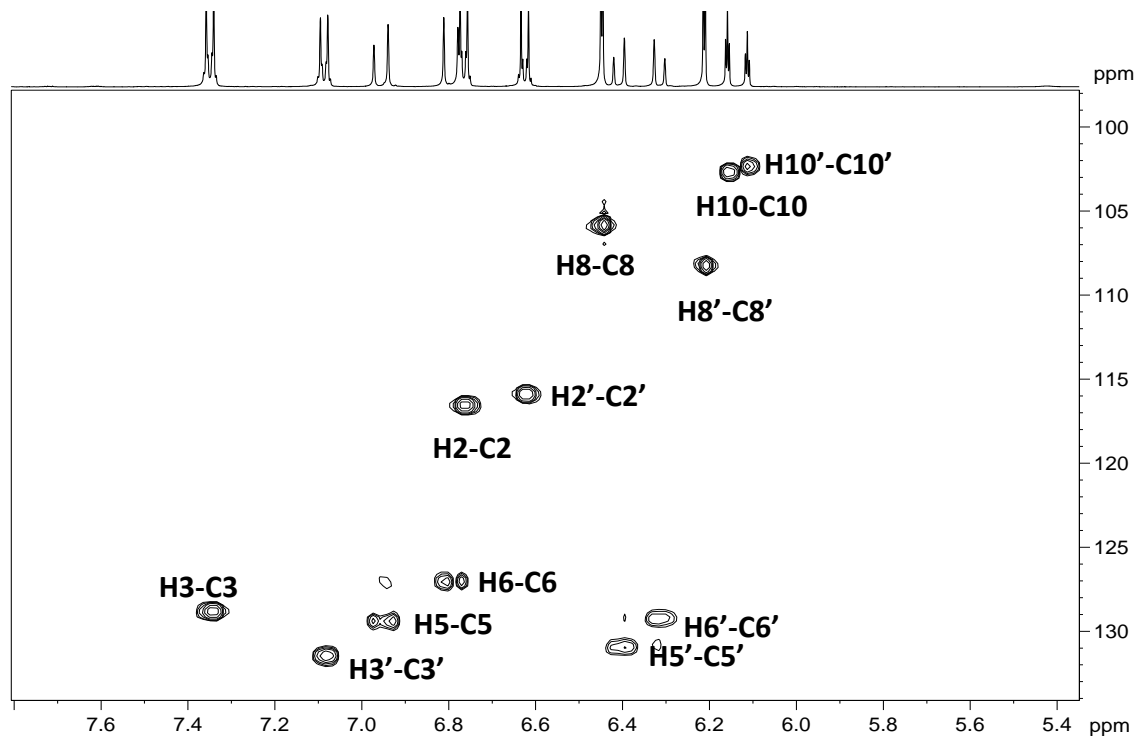


Ρεσβερατρόλη

Φάσμα ^1H NMR

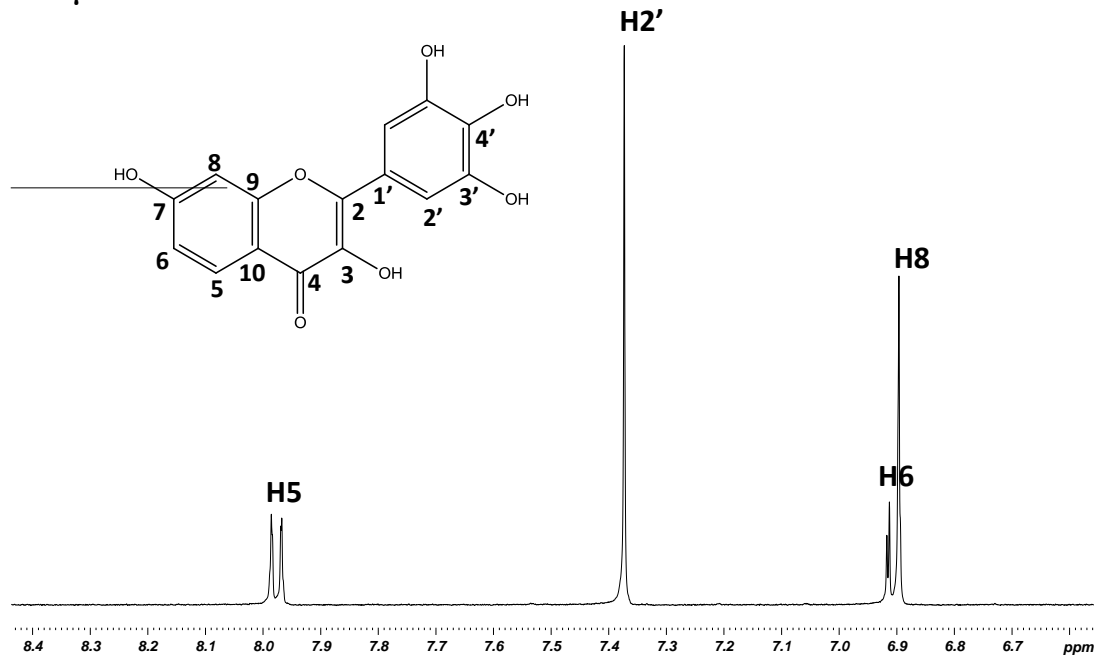


HSQC

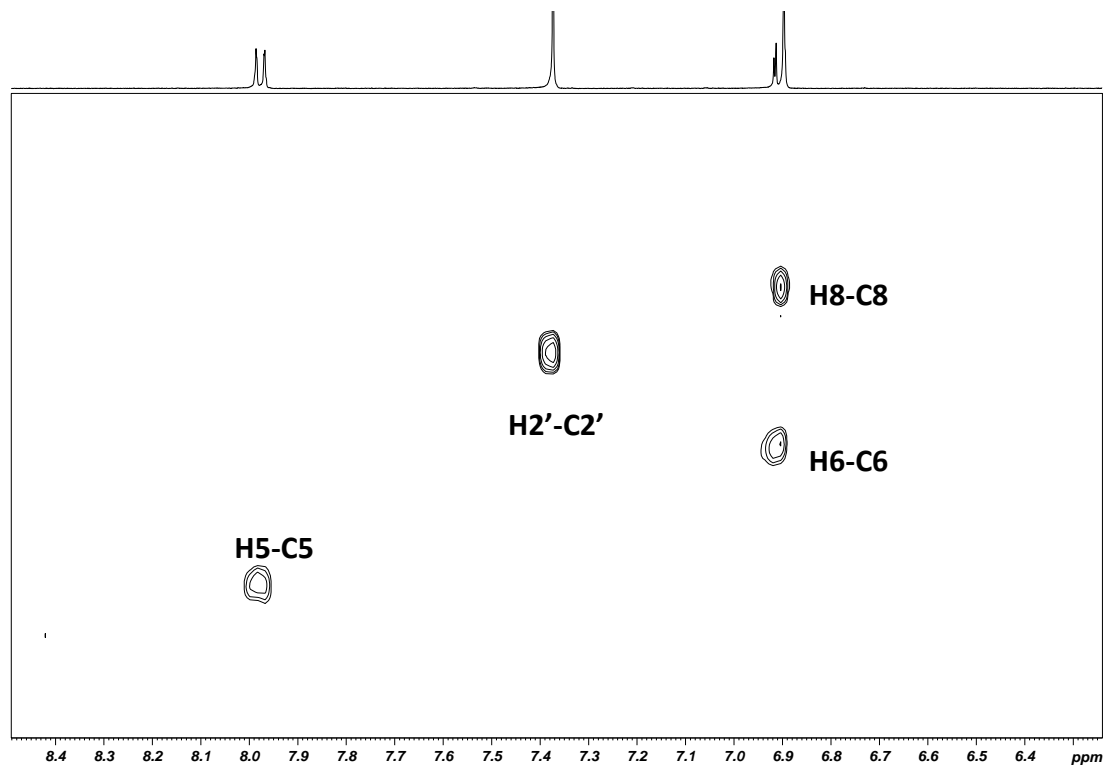


Ρομπινετίνη

Φάσμα ^1H NMR

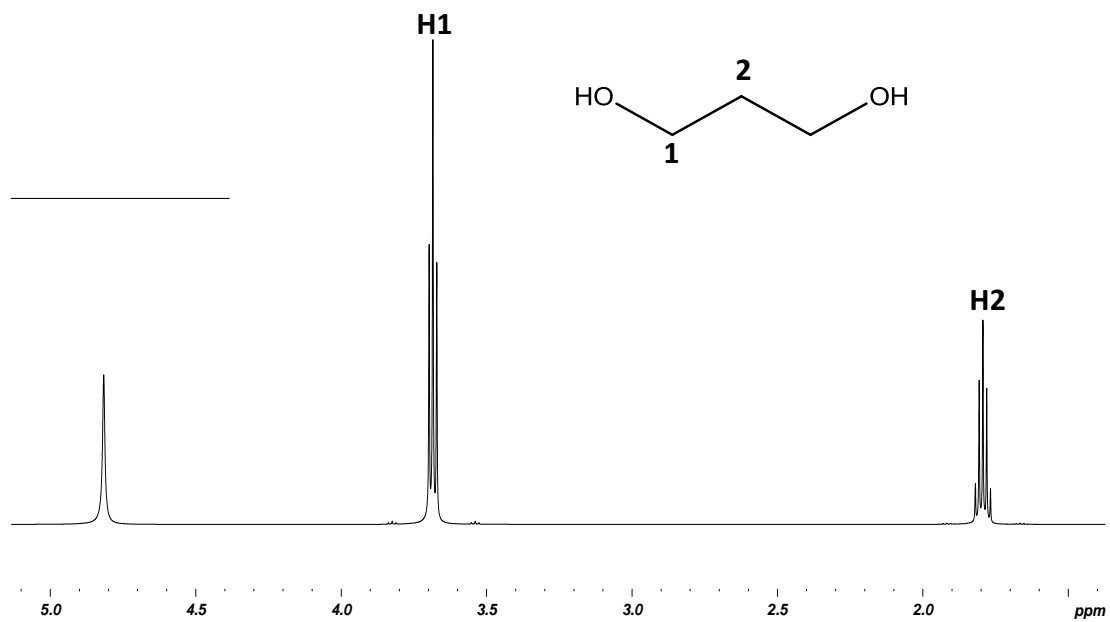


HSQC

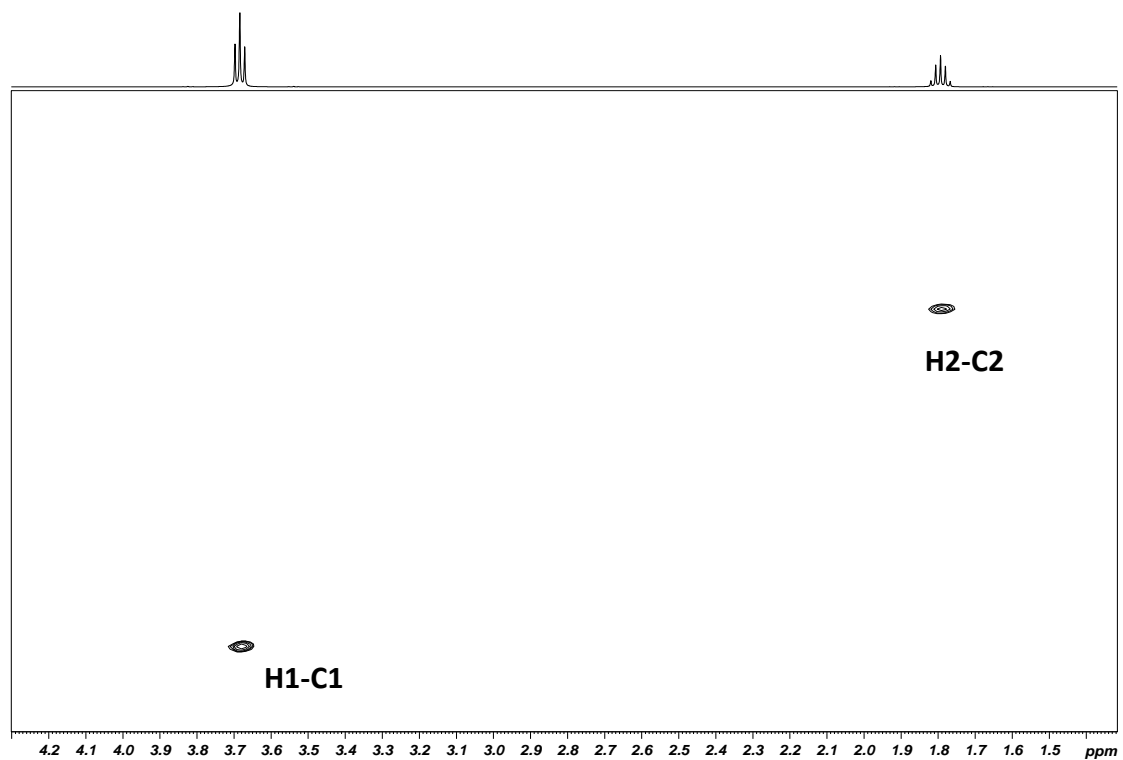


1,3-προπανοδιόλη

Φάσμα ^1H NMR

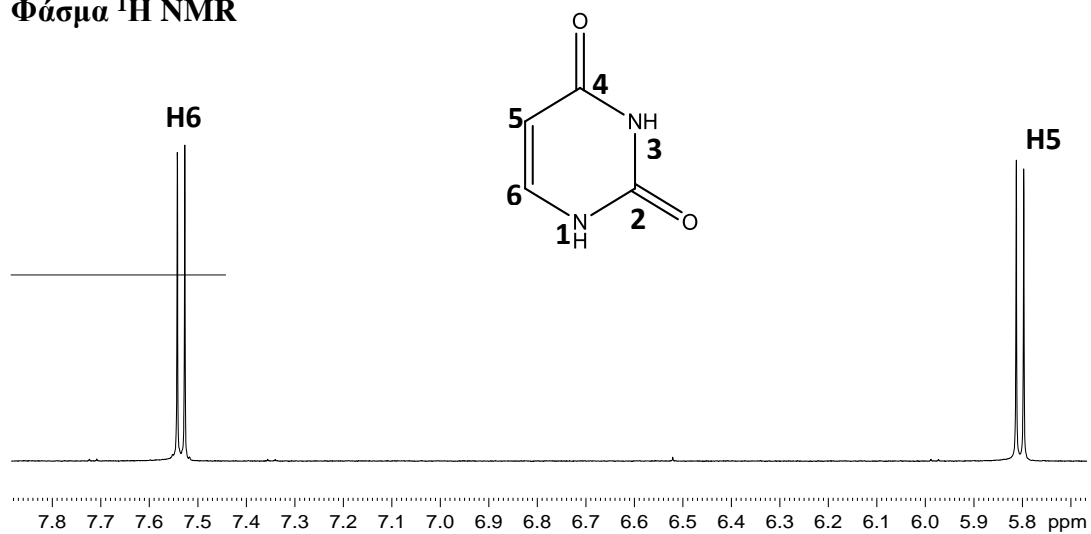


HSQC

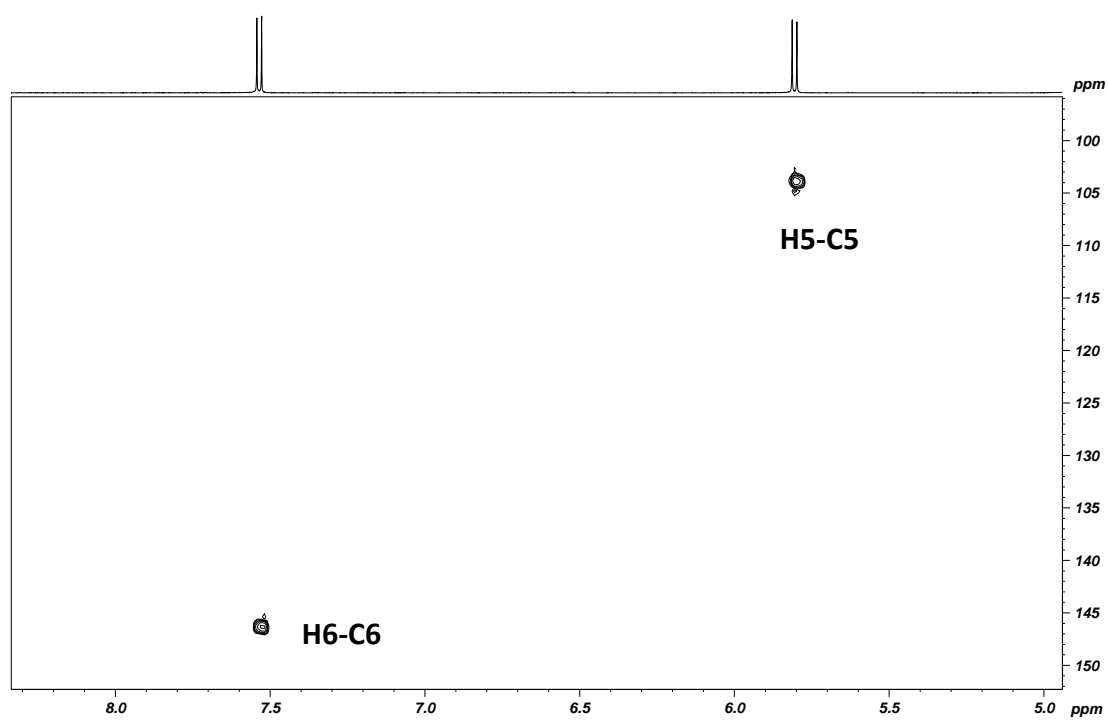


Ουρακίλη

Φάσμα ^1H NMR

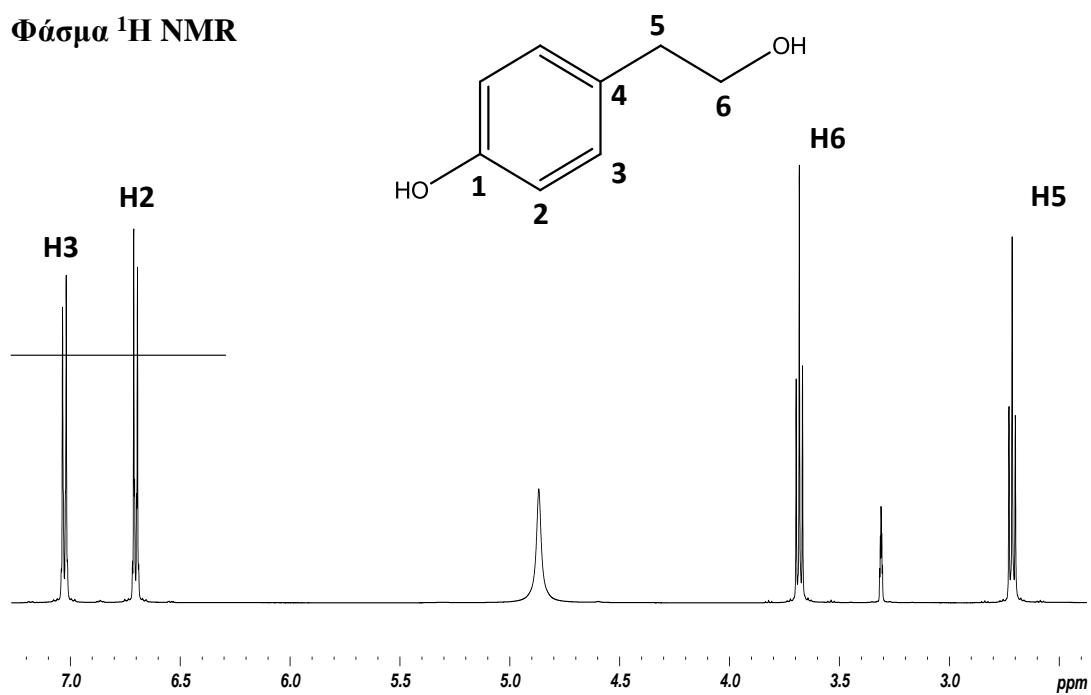


HSQC

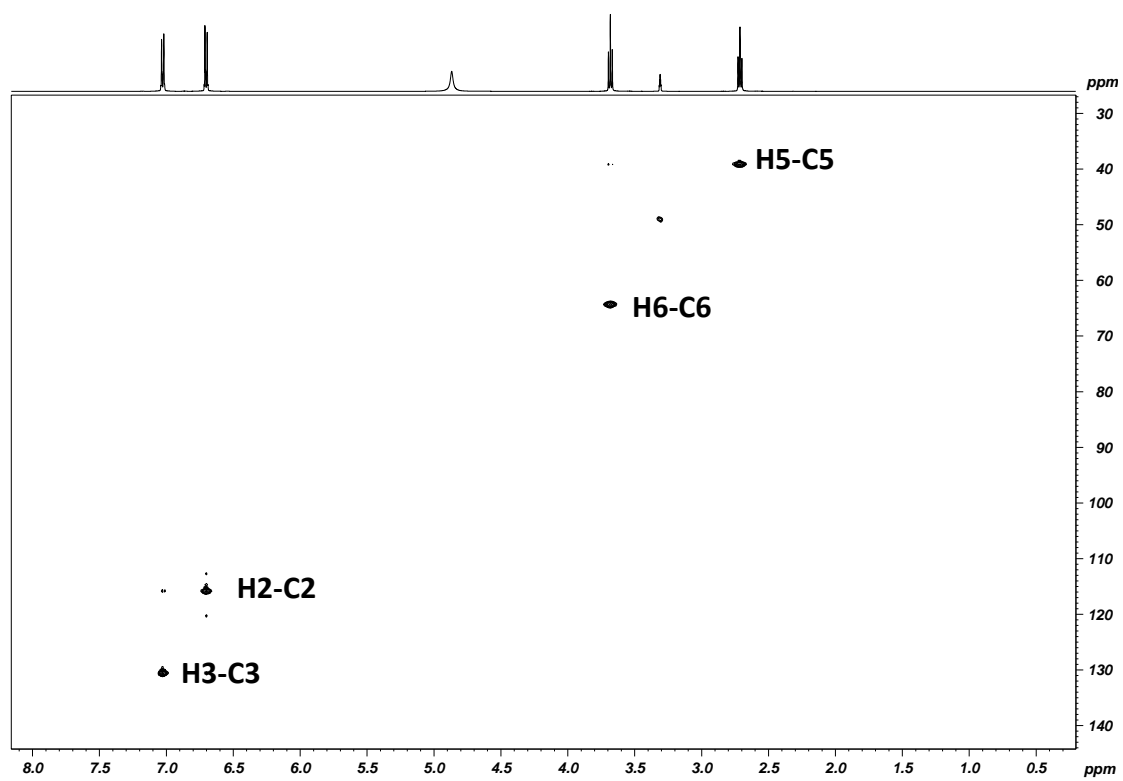


Τυροσόλη

Φάσμα ^1H NMR

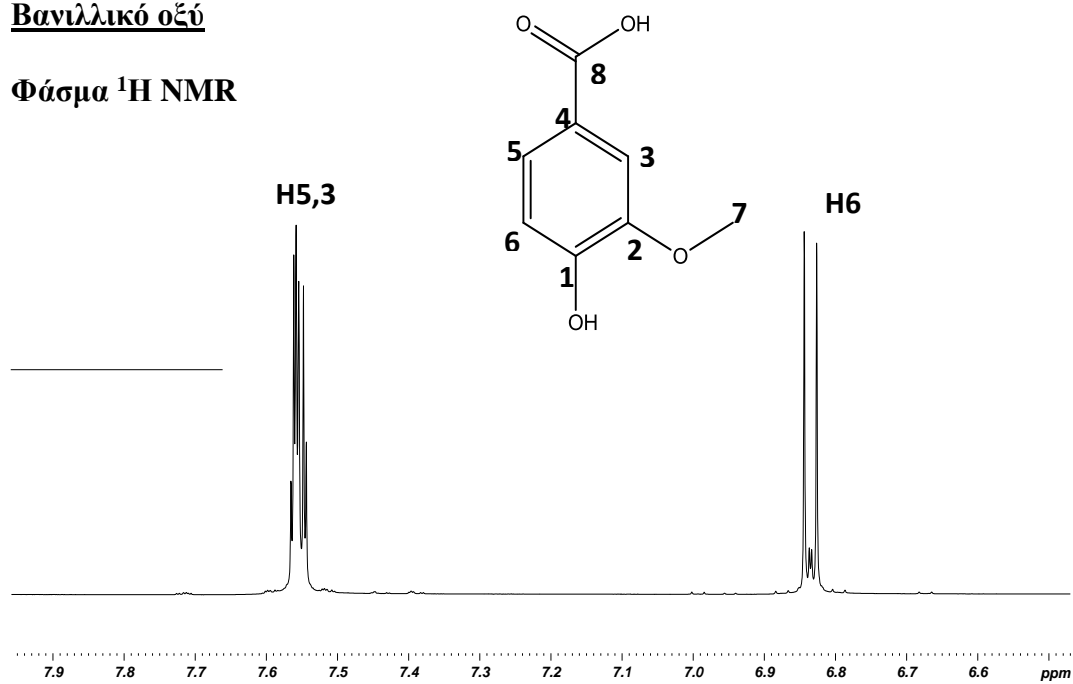


HSQC

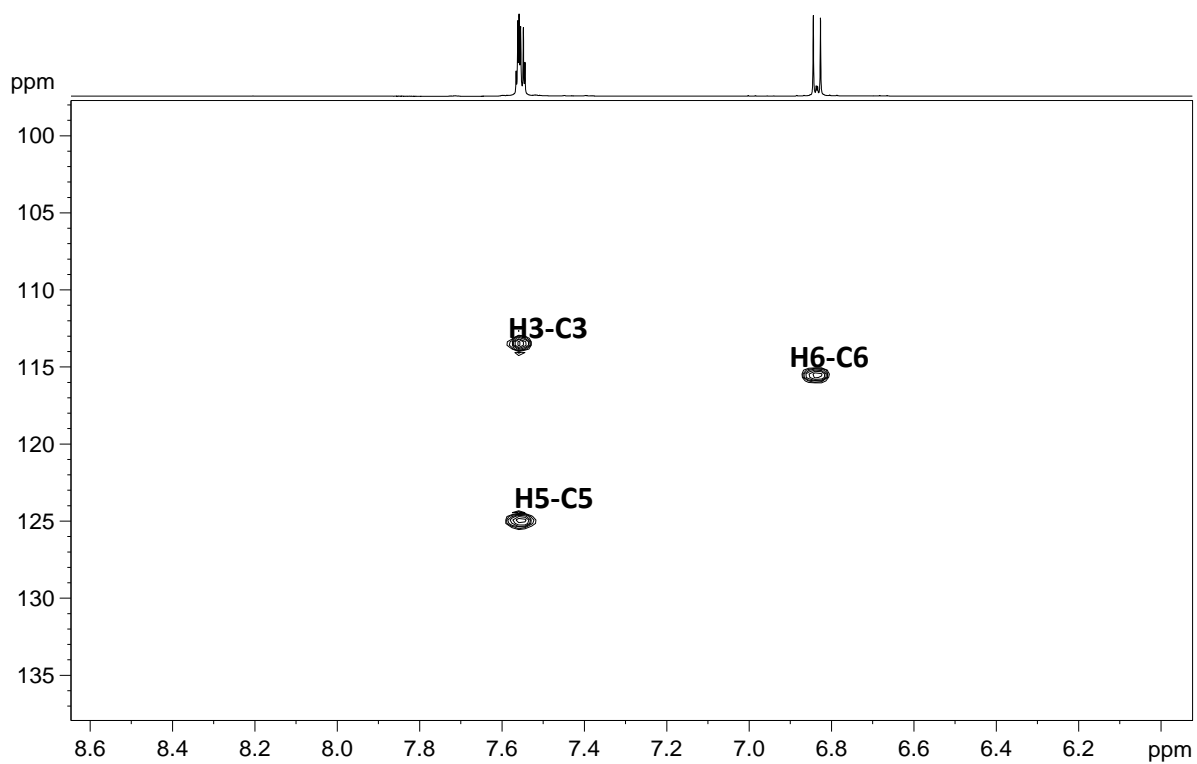


Βανιλλικό οξύ

Φάσμα ^1H NMR

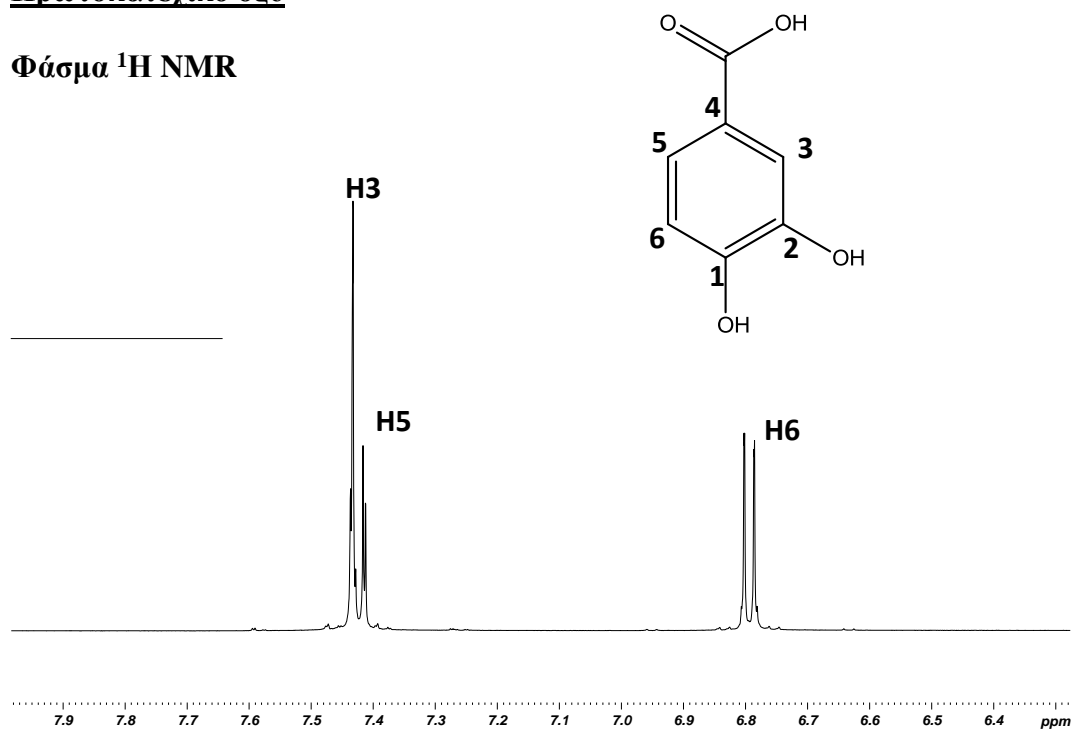


HSQC

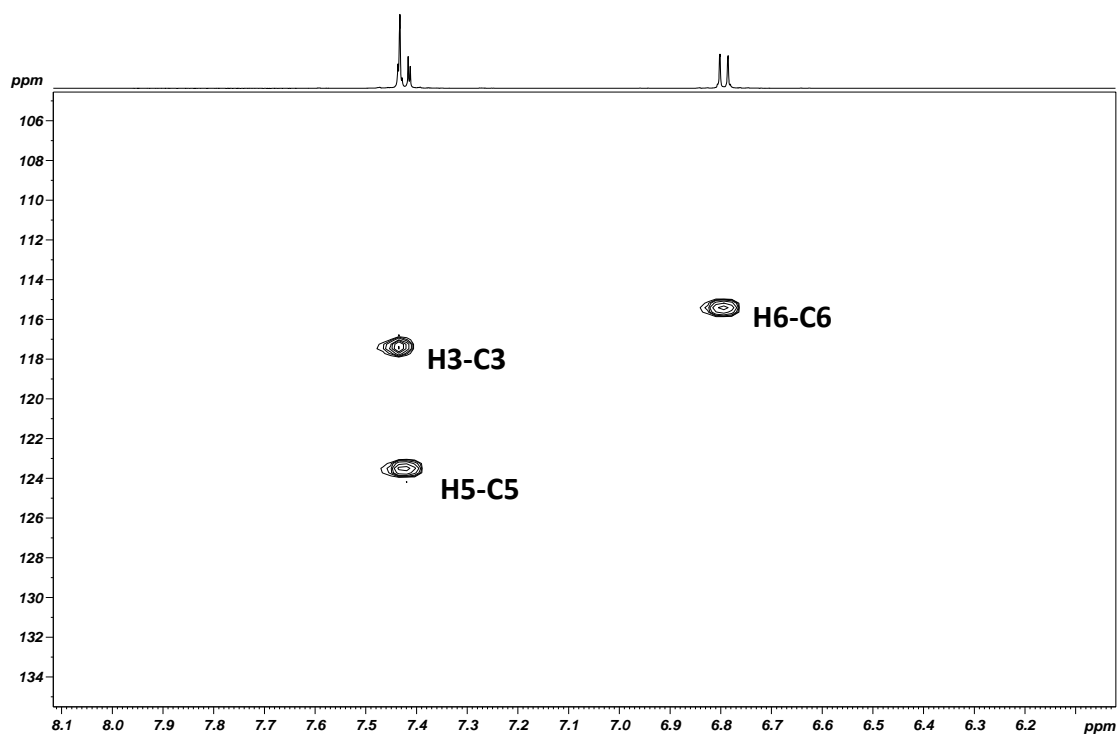


Πρωτοκατεγικό οξύ

Φάσμα ^1H NMR

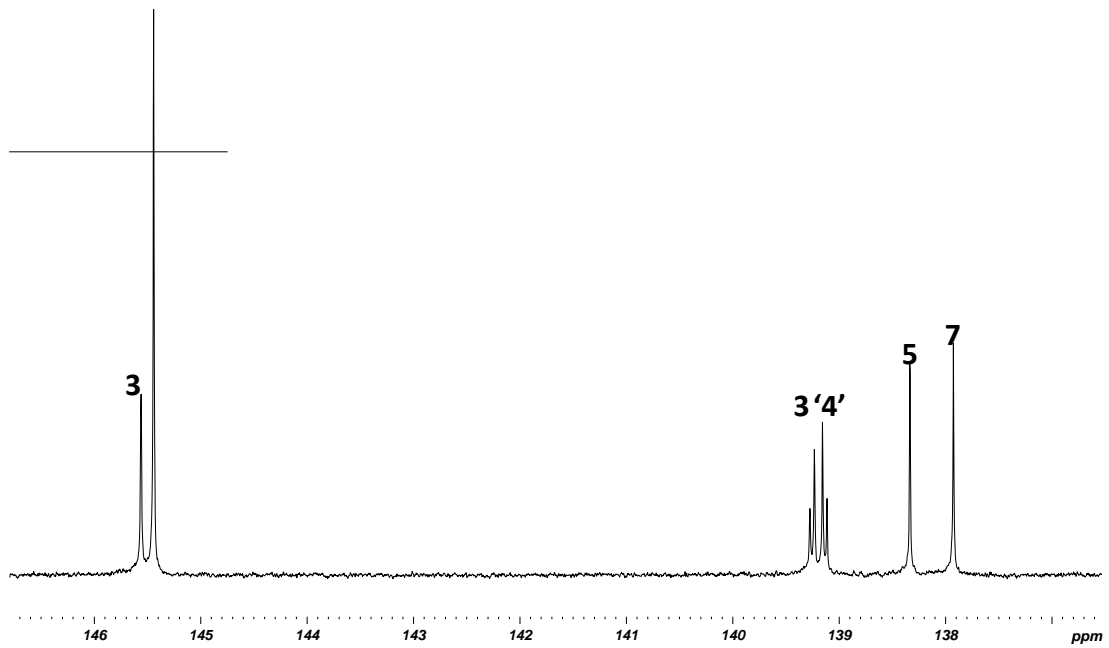
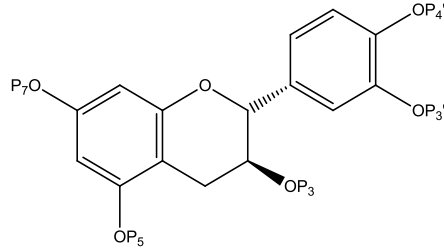


HSQC

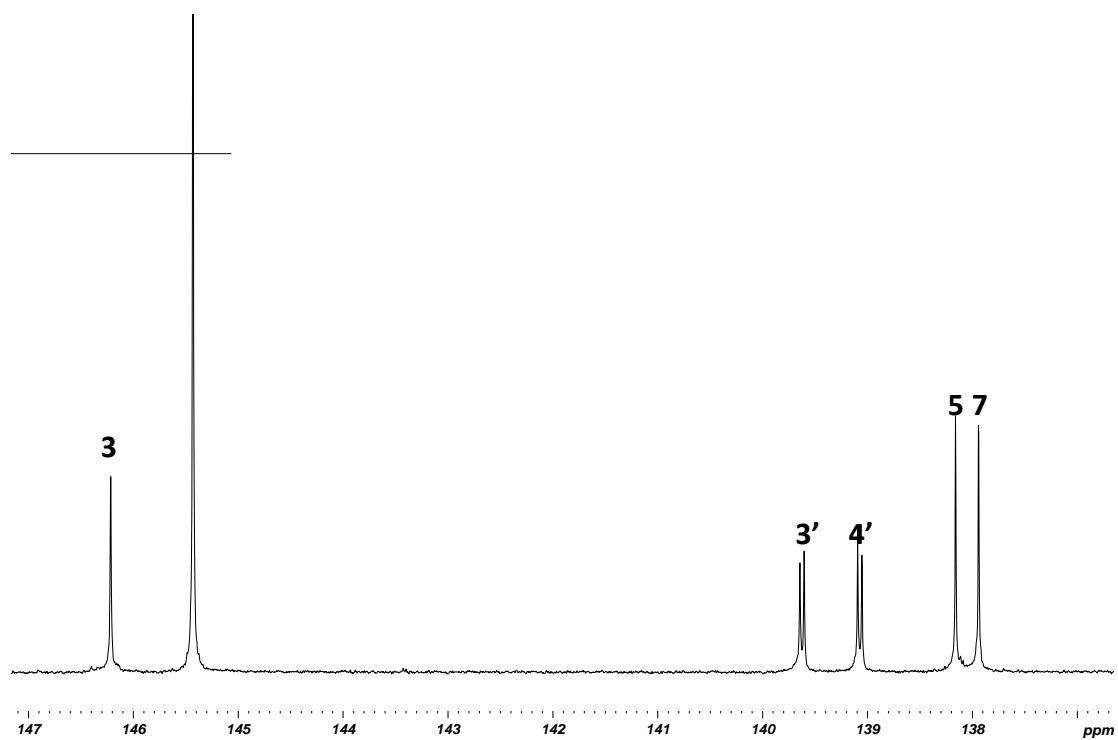
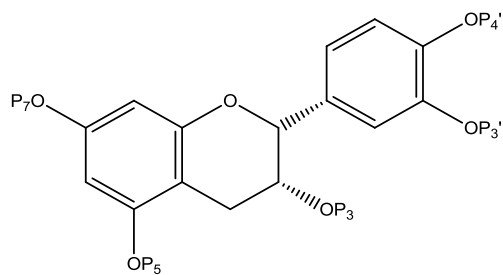


ΦΑΣΜΑΤΑ ^{31}P NMR

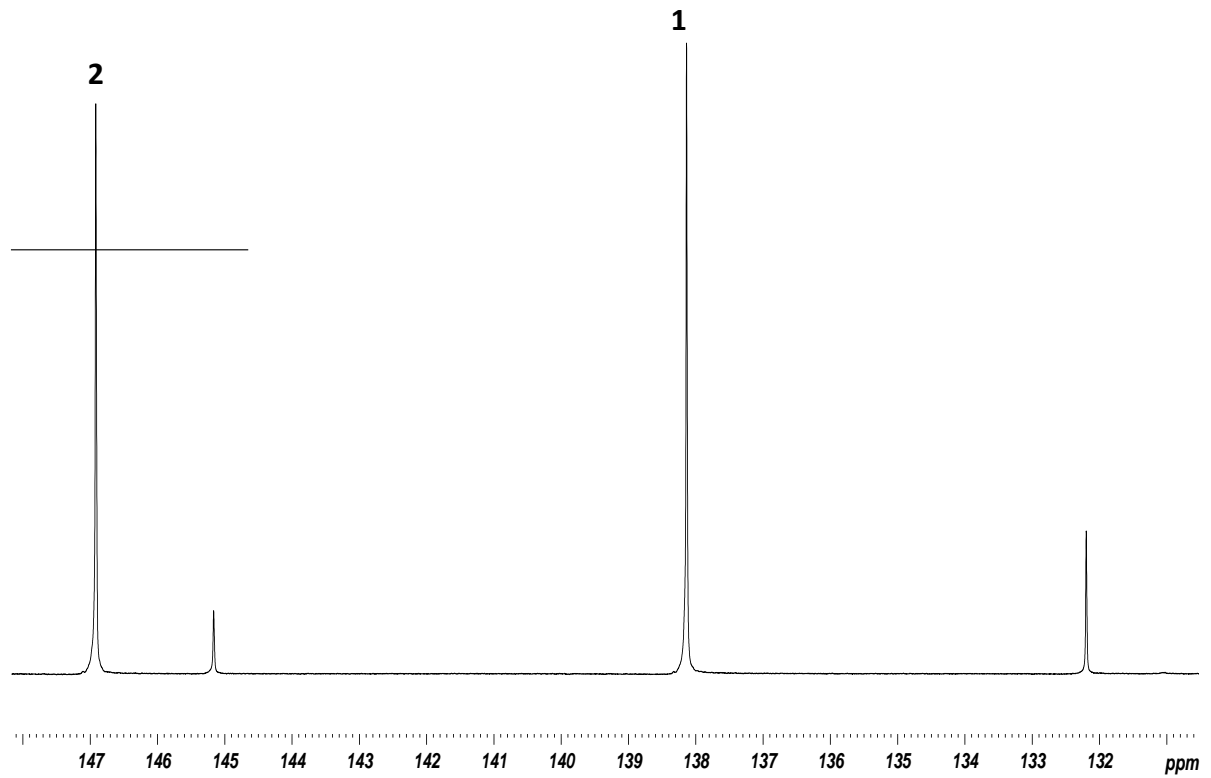
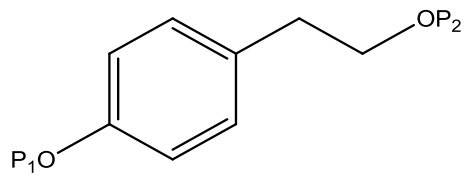
Κατεγίνη



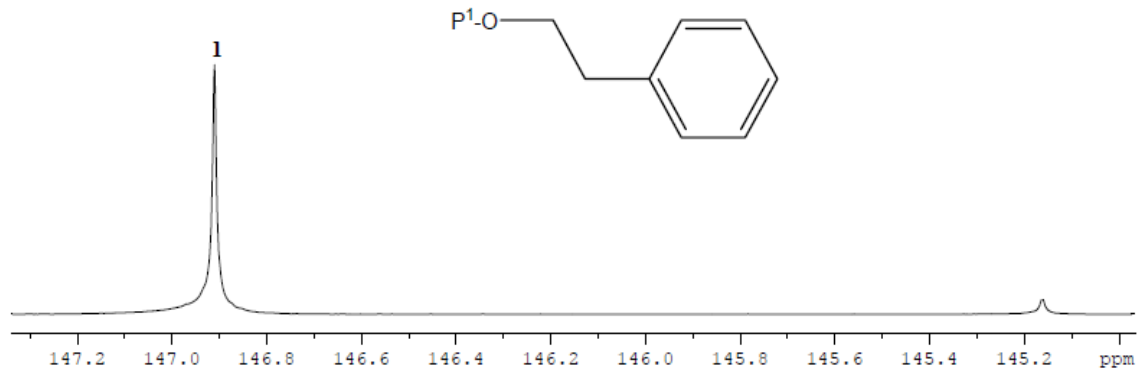
Ελικατεγίνη



Τυροσόλη



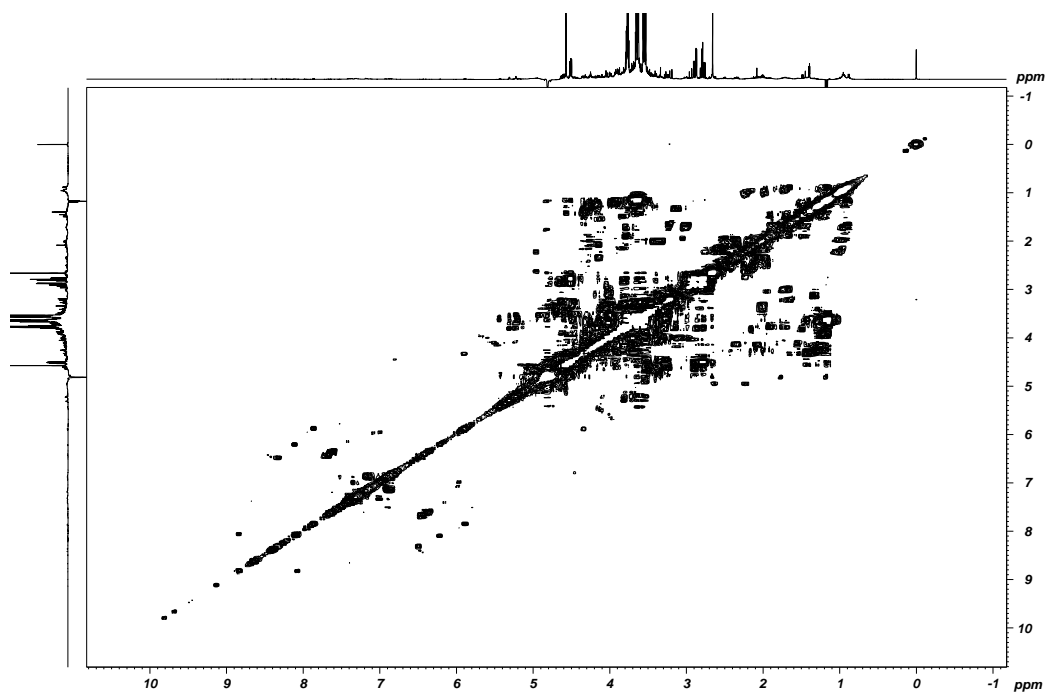
2-Φαινυλο-αιθανόλη



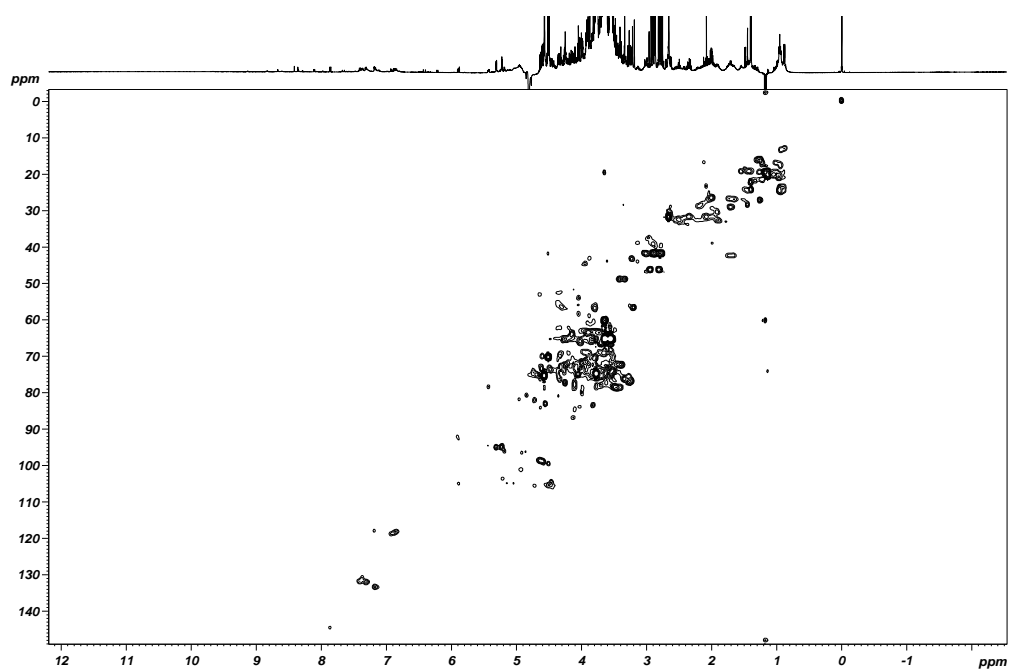
ΔΙΣΔΙΑΣΤΑΤΑ ΦΑΣΜΑΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΙΝΟΥ ΣΕ ΔΙΑΛΥΤΗ ΔΕΥΤΕΡΙΩΜΕΝΟ ΝΕΡΟ (D₂O)

ΦΑΣΜΑΤΑ 2D ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΒΗΛΑΝΑ

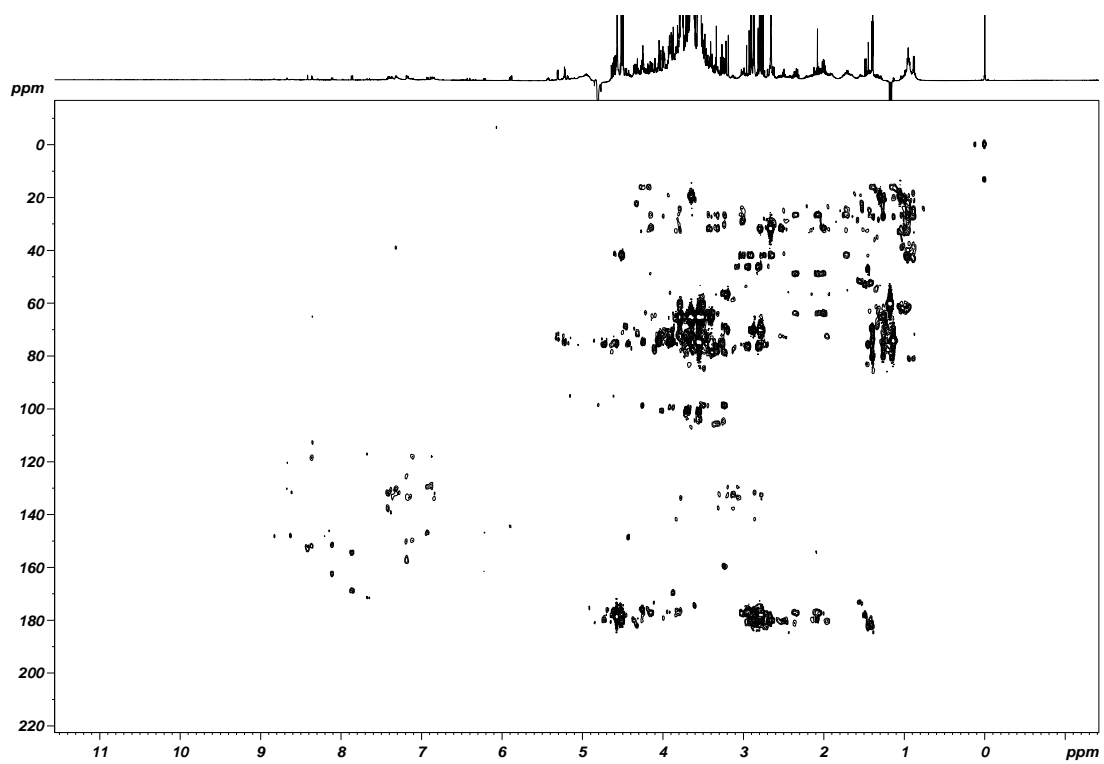
COSY



HSQC

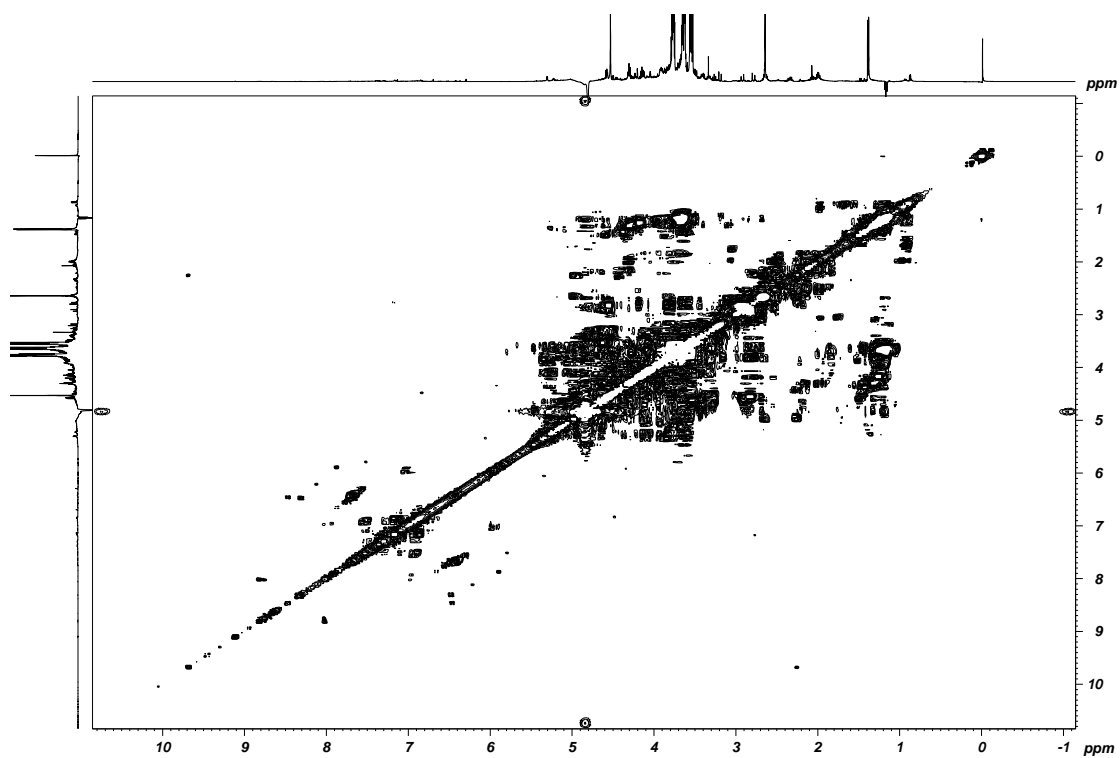


HMBC

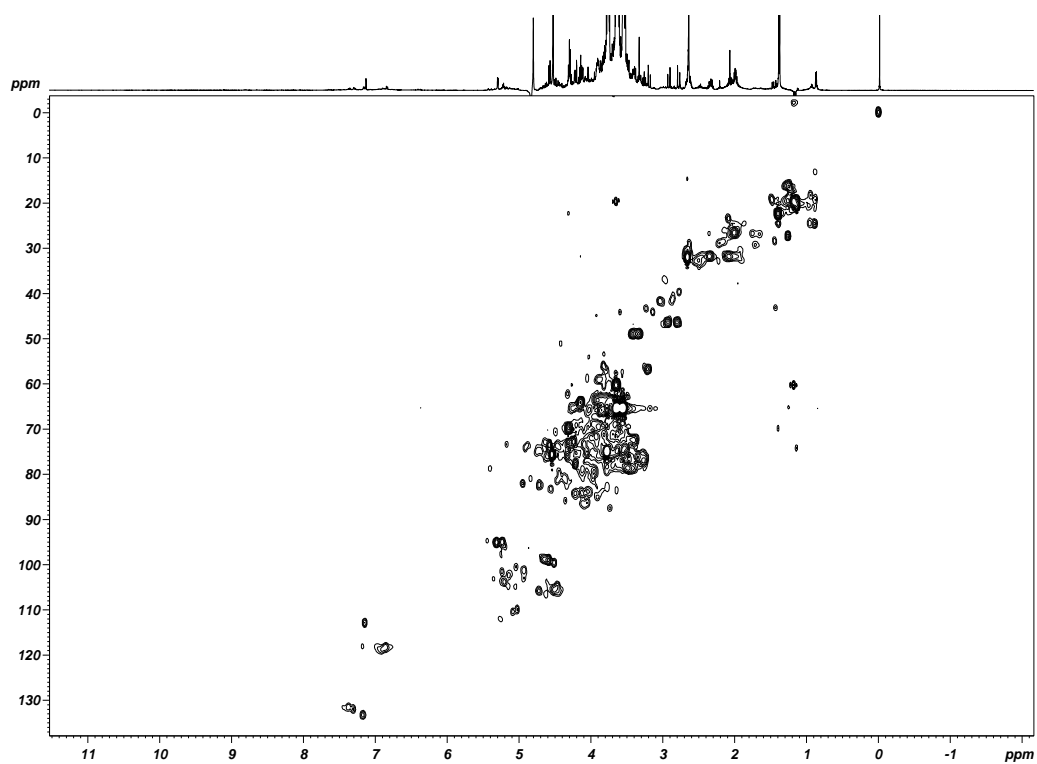


ΦΑΣΜΑΤΑ 2D ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΚΟΤΣΙΦΑΛΙ

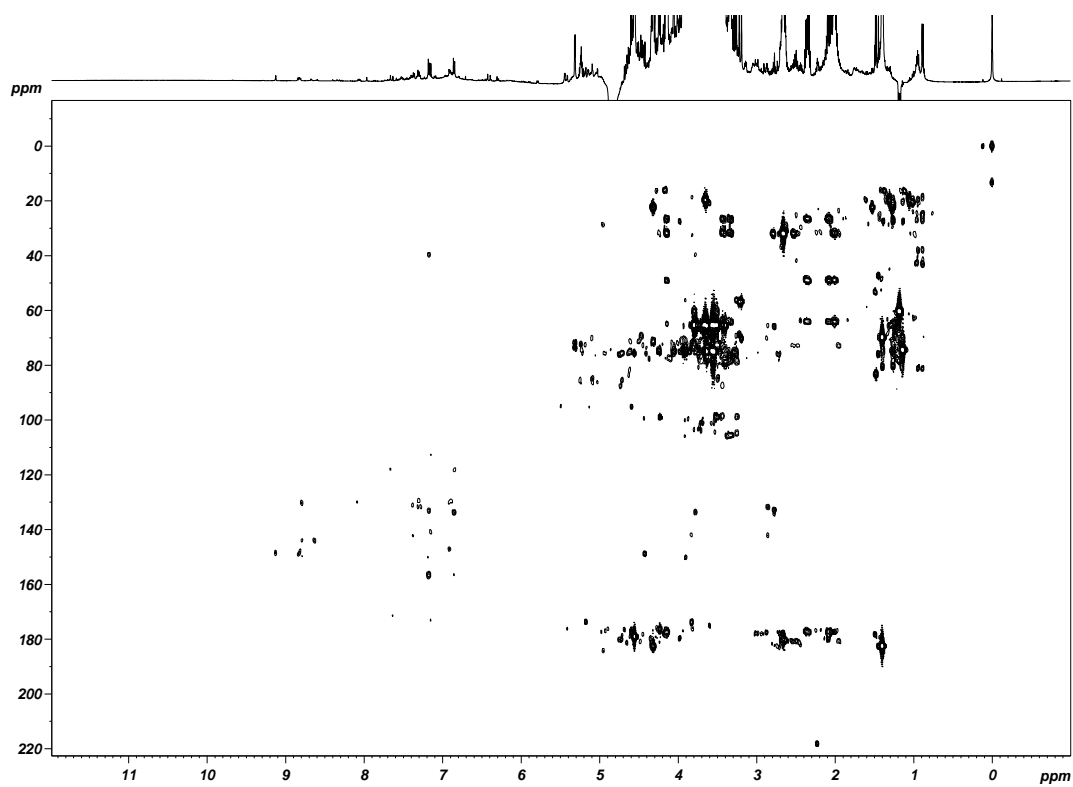
COSY



HSQC

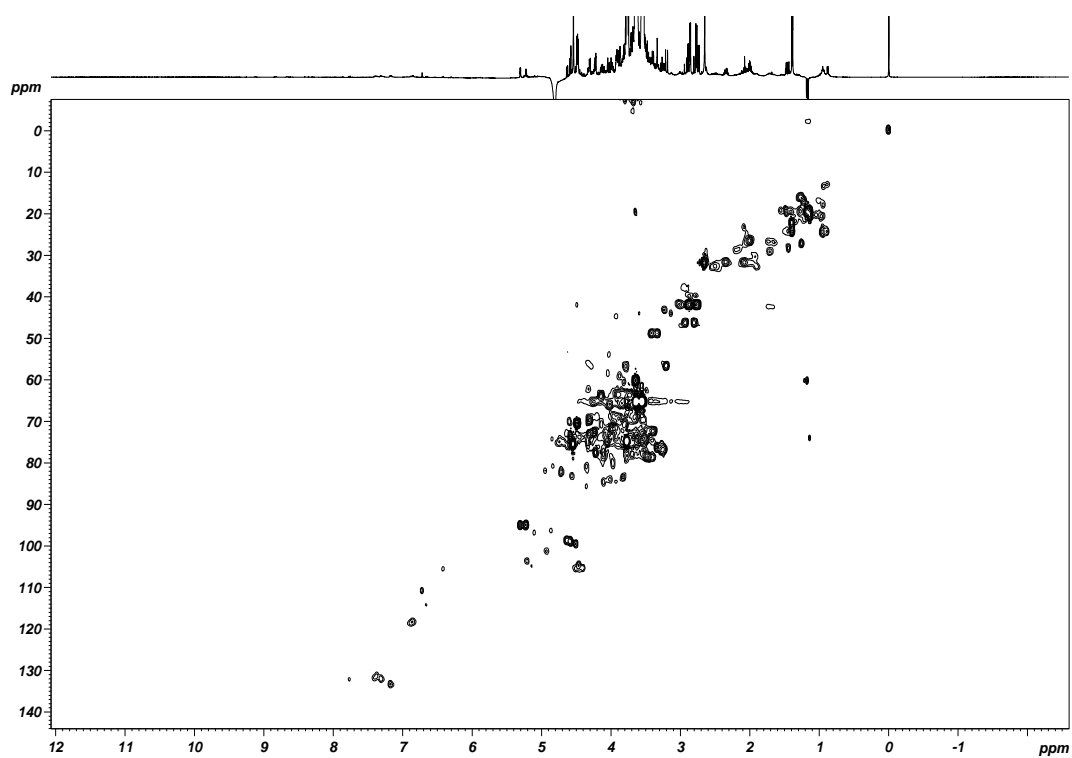


HMBC

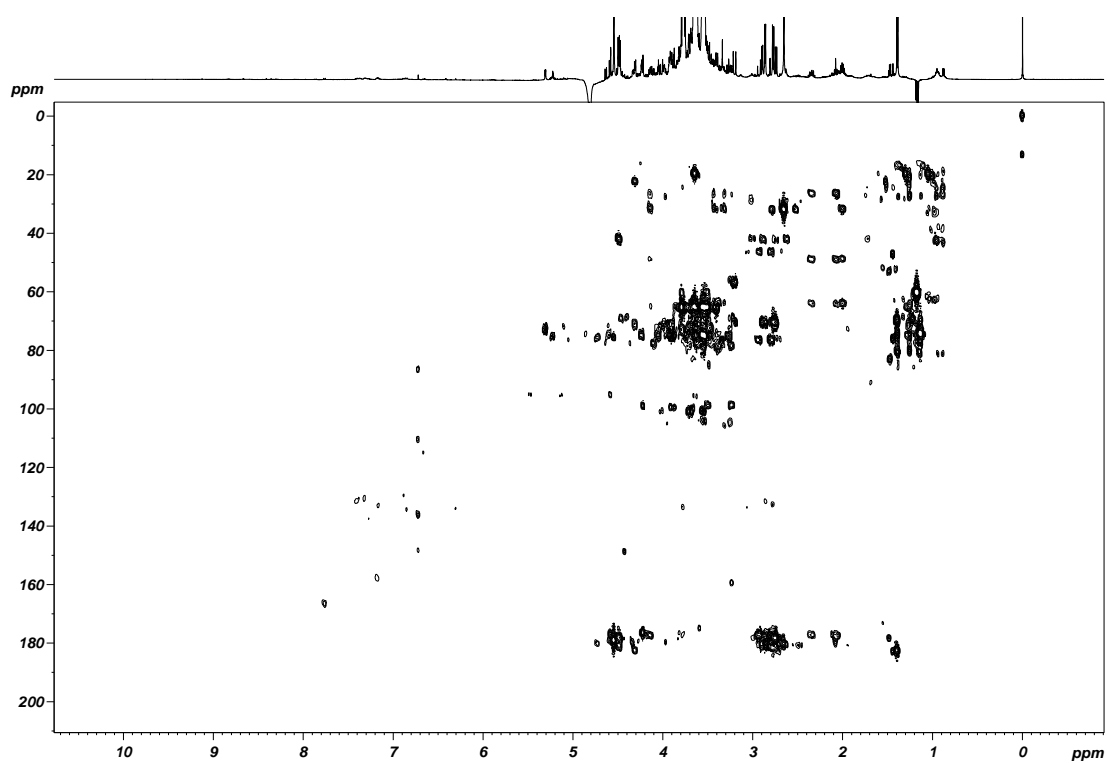


ΦΑΣΜΑΤΑ 2D ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΔΑΦΝΙ

HSQC

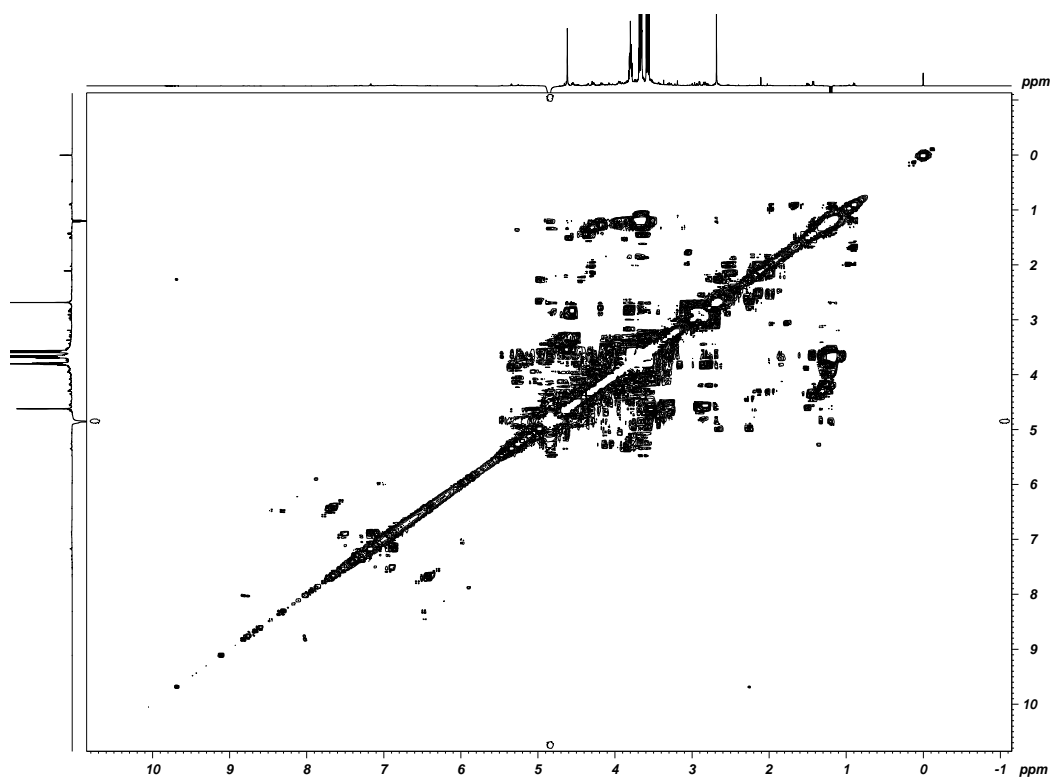


HMBC

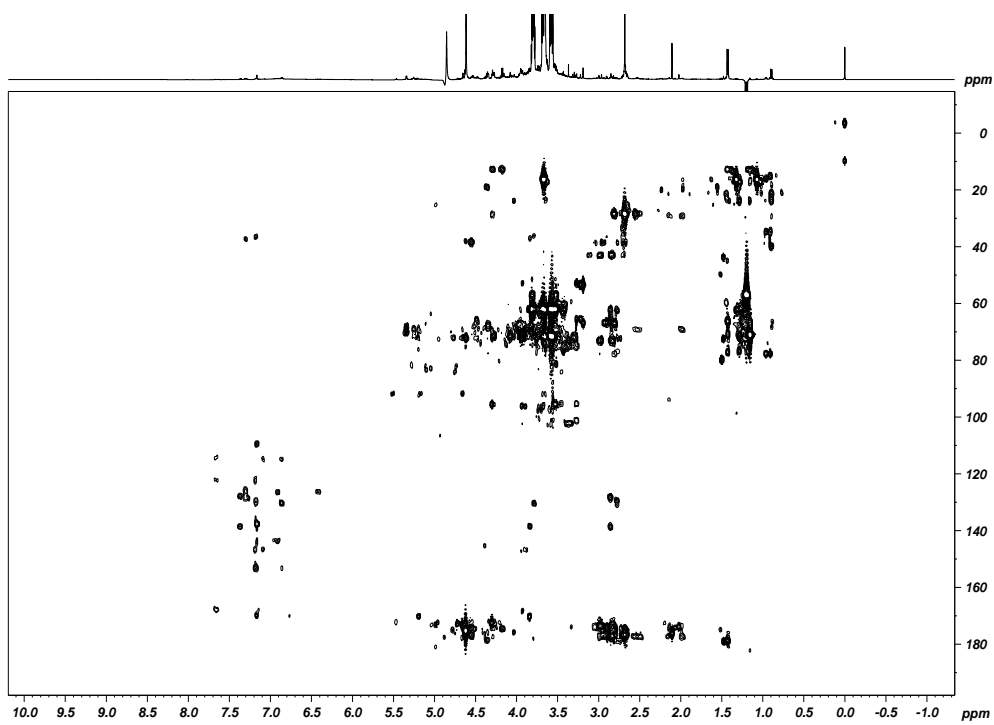


ΦΑΣΜΑΤΑ 2D ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΜΑΝΤΗΛΑΡΙ

COSY

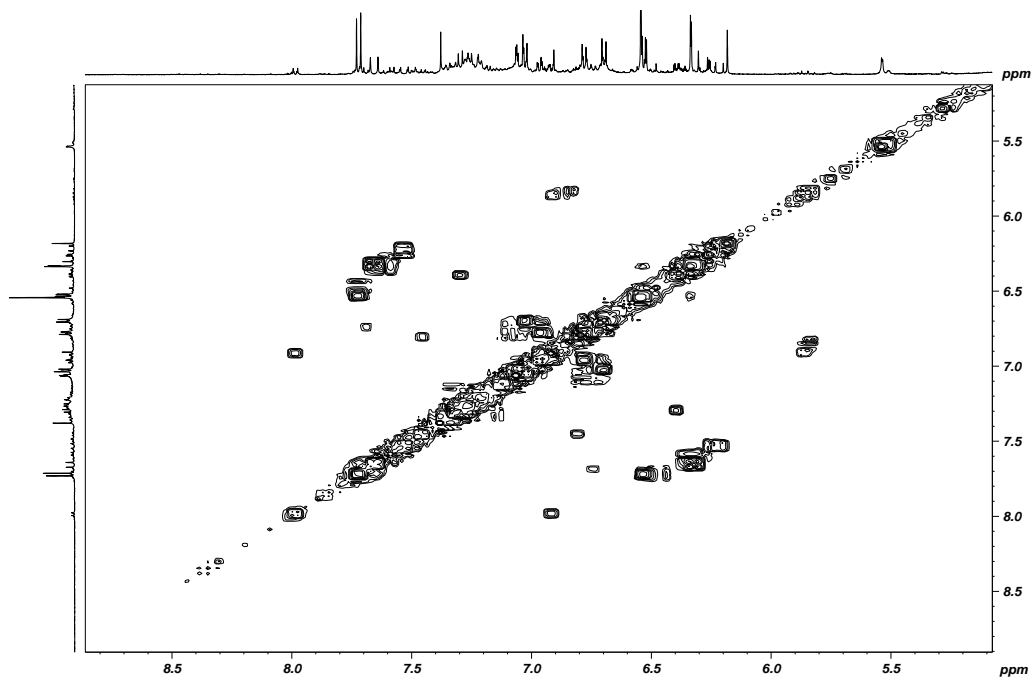


HMBC

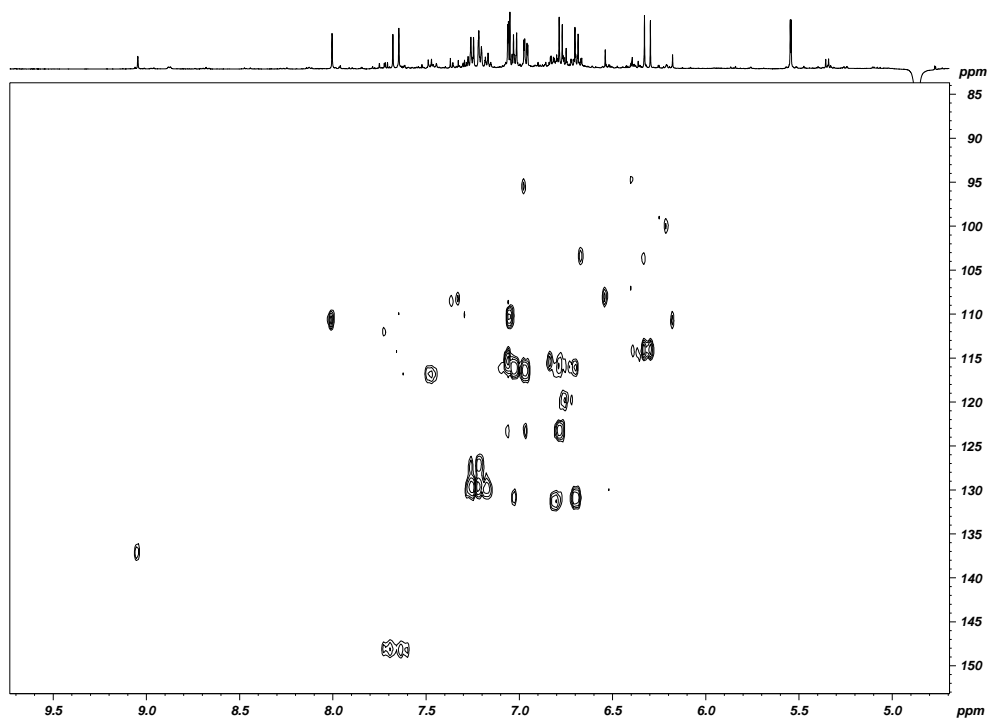


2D ΦΑΣΜΑΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΙΝΟΥ ΣΕ ΔΙΑΛΥΤΗ ΔΕΥΤΕΡΙΩΜΕΝΗ ΜΕΘΑΝΟΛΗ

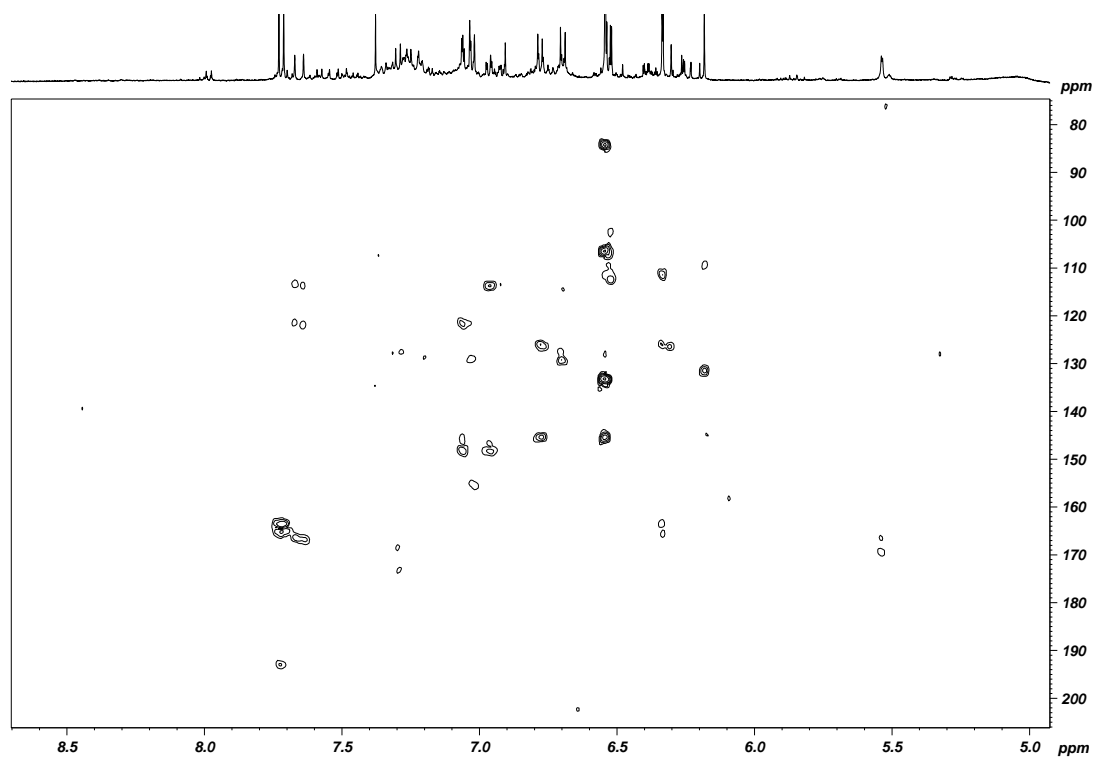
COSY ΑΡΩΜΑΤΙΚΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΒΗΛΑΝΑ



HSQC ΑΡΩΜΑΤΙΚΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΜΑΝΤΗΛΑΡΙ



HMBC ΑΡΩΜΑΤΙΚΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΒΗΛΑΝΑ



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ¹ Ε. Σουφλερός, Οινολογία, Επιστήμη και Τεχνογνωσία, Εκδ. Σουφλερός Ευάγγελος, Θεσσαλονίκη, 2012
- ² Μ. Λιούνη, Σημειώσεις και εργαστηριακές ασκήσεις χημείας και τεχνολογίας οίνου και άλλων αλκοολούχων ποτών, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Χημείας, Αθήνα, 2010
- ³ M. G. L. Hertog, E. J. M. Feskens, P. C. H. Hollman, M. B. Katan, D. Kromhout, Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study, *Lancet* 1993, 342, 1007-1011
- ⁴ A. Dorozynski, Wine may prevent dementia, *Br. Med. J.* 1997, 314, 997
- ⁵ Α. Τσακίρης, Οινολογία από το σταφύλι στο κρασί, Εκδοτικός οίκος: Ψυχάλλου, Αθήνα, 1998
- ⁶ Γ. Κοτσερίδης, Σημειώσεις Οινολογίας ΙΙ, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα 2005
- ⁷ I.S. Arvanitoyannis, M.N. Katsola, E.P. Psarra, E.H. Soufleros, S. Kallithraka, *Trends Food Sci. Technol.* 1999, 10, 321-336
- ⁸ P. Oliveri, M. Forina, *Chemical Analysis of Food: Techniques and Applications*, chap.2, Data analysis and chemometrics, 2012
- ⁹ M. Spraul, B. Schütz, E. Humpfer, M. Mörtter, H. Schäfer, S. Koswig, P. Rinke, Mixture analysis by NMR as applied to fruit juice quality control, *Magn. Res. Chem.*, 2009, 47, S130
- ¹⁰ L. L. Nord, P. Vaag and J. Ø. Duus, J. Øllgaard, Quantification of organic and amino acids in beer by H-1 NMR spectroscopy, *Anal. Chem.*, 2004, 76, 4790-4798
- ¹¹ K. Skogerson, R. Runnebaum, G. Wohlgemuth, J. De Ropp, H. Heymann, O. Fiehn, Comparison of gas chromatography-coupled time-of-flight mass spectrometry and 1H

nuclear magnetic resonance spectroscopy metabolite identification in white wines from a sensory study investigating wine body, *J. Agric. Food Chem.*, 2009, **57**, 6899-6907

¹² K. F. Vajargah, R. Mehdizadeh, H. Sadeghi-Bazargani, Applications of OPLS Statistical Method in Medicine, *J. Math. Computer Sci.*, 2014, **8**, 411-422

¹³ J. Trygg, S. Wold, Orthogonal Projections to Latent Structures, *Journal of Chemometrics*, 2002, **16**, 119–128)

¹⁴ A. Spyros, P. Dais, *NMR Spectroscopy in Food Analysis*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2013, Chap. 8, 202-240

¹⁵ R. Zamora, J. L. Navarro, F. J. Hidalgo, Identification and classification of olive oils by high-resolution ¹³C Nuclear Magnetic Resonance, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1994, **71**, 361-364

¹⁶ G. Vigli, A. Phillipidis, A. Spyros, P. Dais, Classification of edible oils by employing ³¹P and ¹H NMR spectroscopy in combination with multivariate statistical analysis. A proposal for the detection of seed oil adulteration in virgin olive oils, *J. Agric. Food Chem.*, 2003, **51**, 5715-5722

¹⁷ A. P. Sobolev, D. Capitani, D. Giannino, C. Nicolodi, G. Testone, F. Santoro, G. Frugis, M. A. Iannelli, A. K. Mattoo, E. Brosio, R. Gianferri, I. D'Amico, L. Mannina, *NMR-Metabolic Methodology in the Study of GM Foods*, *Nutrients*, 2010, **2**, 1-15

¹⁸ I. B. Abdel-Farid, K. K. Hye, H. C. Young, R. Verpoorte, Metabolic characterization of Brassica rapa leaves by NMR spectroscopy, *J. Agric. Food Chem.*, 2007, **55**, 7936-7943

¹⁹ C. V. Di Anibal, I. Ruisánchez, M. P. Callao, High-resolution ¹H Nuclear Magnetic Resonance spectrometry combined with chemometric treatment to identify adulteration of culinary spices with Sudan dyes, *Food Chem.*, 2011, **124**, 1139-1145

²⁰ M. Ritota, F. Marini, P. Sequi, M. Valentini, Metabolomic Characterization of Italian Sweet Pepper (*Capsicum annum* L.) by Means of HRMAS-NMR Spectroscopy and Multivariate Analysis, *J. Agric. Food Chem.*, 2010, **58**, 9675-9684

-
- ²¹ M. A. Brescia, V. Mazzillia, A. Sgaramella, S. Ghellic, F. P. Fanizzid, and A. Sacco, ¹H NMR Characterization of Milk Lipids: A Comparison Between Cow and Buffalo Milk, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 2004, 81, 431-436
- ²² M. A. Brescia, M. Monfreda, A. Buccolieri, C. Carrino, Characterisation of the geographical origin of buffalo milk and mozzarella cheese by means of analytical and spectroscopic determinations, *Food Chem.*, 2005, 89, 139-147
- ²³ L. Shintu, S. Caldarelli, High-Resolution MAS NMR and Chemometrics: Characterization of the Ripening of Parmigiano Reggiano Cheese, *J. Agric. Food Chem.*, 2005, 53, 4026
- ²⁴ R. Lamanna, I. Piscioneri, V. Romanelli, N. Sharma, A preliminary study of soft cheese degradation in different packaging conditions by ¹H-NMR, *Magn. Reson. Chem.*, 2008, 46, 828-831
- ²⁵ C. Almeida, I. F. Duarte, A. Barros, J. Rodrigues, M. Spraul, A. M. Gil, Composition of Beer by ¹H NMR Spectroscopy: Effects of Brewing Site and Date of Production, *J. Agric. Food Chem.*, 2006, 54, 700-706
- ²⁶ J.A. Rodrigues, A.S. Barros, B. Carvalhoc, T. Brandão, Ana M. Gil, Probing beer aging chemistry by nuclear magnetic resonance and multivariate analysis, *Anal. Chim. Acta*, 2011, 702, 178-187
- ²⁷ C. Fotakis, D. Christodouleas, K. Kokkotou, M. Zervou, P. Zoumpoulakis, P. Moulos, M. Liouni, A. Calokerinos, NMR metabolite profiling of Greek grape marc spirits, *Food Chem.*, 2013, 138, 1837-46
- ²⁸ F. Wei, K. Furihata, M. Koda, F. Hu, R. Kato, T. Miyakawa, M. Tanokura, ¹³C NMR-Based Metabolomics for the Classification of Green Coffee Beans According to Variety and Origin, *J. Agric. Food Chem.*, 2012, 60, 10118-10125
- ²⁹ J-E. Lee, B-J. Lee, J-O. Chung, J-A. Hwang, S-J. Lee, C-H. Lee, Y-S. Hong, Geographical and climatic dependencies of green tea (*Camellia sinensis*) metabolites: A ¹H NMR-Based metabolomics study, *J. Agric. Food Chem.*, 2010, 58, 10582-10589

-
- ³⁰ M. Spraul, B. Schutz, E. Humpfer, M. Mortter, H. Schafer, S. Koswig, P. Rinke, Mixture analysis by NMR as applied to fruit juice quality control, *Magn. Reson. Chem.*, 2009, 47, 130-137
- ³¹ M. Guillou, C. Tellier, Determination of Ethanol in Alcoholic Beverages by Low-Resolution Pulsed Nuclear Magnetic Resonance, *Anal. Chem.* 1988, 60, 2182-2185
- ³² I. J. Kosir, J. Kidric, Use of modern nuclear magnetic resonance spectroscopy in wine analysis: determination of minor compounds, *Anal. Chim. Acta*, 2002, 458, 77-84
- ³³ L. Viggiani, M. A. C. Morelli, Characterization of wines by nuclear magnetic resonance: A work study on wines from the Basilicata region in Italy, *J. Agric. Food Chem.*, 2008, 56, 8273
- ³⁴ H-S. Son, K.M. Kim, F. Van den Berg, G-S. Hwang, W-M. Park, C-H. Lee, Y-S. Hong, ¹H nuclear magnetic resonance-based metabolomics characterization of wines by grape varieties and production areas, *J. Agric. Food Chem.*, 2008, 56, 8007-8016
- ³⁵ M. Anastasiadi, A. Zira, P. Magiatis, S. A. Haroutounian, A. L. Skaltsounis, E. Mikros, ¹H NMR-based metabolomics for the classification of Greek wines according to variety, region, and vintage. Comparison with HPLC data, *J. Agric. Food Chem.*, 2009, 57, 11067-74
- ³⁶ Y.-S. Hong, NMR-based metabolomics in wine science, *Magn. Reson. Chem.*, 2011, 49, S13
- ³⁷ E. Bouloumpasi, E. H. Soufleros, C. Tsarchopoulos, C. G. Biliaderis, Primary amino acid composition and its use in discrimination of Greek red wines with regard to variety and cultivation region, *Vitis*, 2002, 41, 195-202
- ³⁸ P. Hernández-Orte, M. J. Barz, J. Cacho, V. Ferreira, Amino acid determination in grape juices and wines by HPLC using a modification of the 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) method, *Chromatographia*, 2003, 58, 29-35

³⁹ S. Gorinstein, R. Moshe, J. Deutsch, F. H. Wolfe, K. Tilis, A. Stiller, I. Flam, Ya. Gat, Determination of basic components in white wines by HPLC, FT-IR Spectroscopy, and Electrophoretic techniques, *J. Food Comp. Anal.*, 1992, 5, 236-245

⁴⁰ L. Gambelli, G.P. Santaroni, Polyphenols content in some Italian red wines of different geographical origins, *J. Food Comp. Anal.*, 2004, 17, 613-318

⁴¹ C. Proestos, A. Bakogiannis, M. Komaitis, Determination of phenolic compounds in wines, *Int. J. Food St.*, 2012, 1, 33-41

⁴² V. Pereira, J. Camara, J. Cacho, J. C. Marques, HPLC-DAD methodology for the quantification of organic acids, furans and polyphenols by direct injection of wine samples, *J. Sep. Sci.*, 2010, 33, 1204-1215

⁴³ B. Fernández de Simón, M. Sanz, E. Cadahía, J. Martínez, E. Esteruelas, A.M. Muñoz, Polyphenolic compounds as chemical markers of wine ageing in contact with cherry, chestnut, false acacia, ash and oak wood, *Food Chem.*, 2014, 143, 66-76

⁴⁴ A. González-Marco, N. Jimenez-Moreno, C. Ancín-Azpilicueta, Concentration of volatile compounds in Chardonnay wine fermented in stainless steel tanks and oak barrels, *Food Chem.*, 2008, 108, 213-219

⁴⁵ M. Sanz, B. F. de Simón, E. Esteruelas, A. M. Muñoz, E. Cadahía, M. T. Hernandez, I. Estrella, J. Martinez, Polyphenols in red wine aged in acacia (*Robinia pseudoacacia*) and oak (*Quercus petraea*) wood barrels, *Anal. Chim. Acta*, 2012, 732, 83-90

⁴⁶ S. Christoforidou, P. Dais, Novel Approach to the detection and quantification of phenolic compounds in olive oil based on ³¹P NMR spectroscopy, *J. Agric. Food Chem.*, 2006, 54, 656-664

⁴⁷ P. Fronimaki, A. Spyros, S. Christoforidou, P. Dais, Determination of the diglyceride content in greek virgin olive oils and some commercial oils by employing ³¹P NMR spectroscopy, *J. Agric. Food Chem.*, 2002, 50, 2207-2213

⁴⁸ E. Hatzakis, G. Dagounakis, A. Agiomyrgiannaki, P. Dais, A facile NMR method for the quantification of total, free and esterified sterols in virgin olive oil, *Food Chem.*, 2010, 122, 342-352

⁴⁹ E. Hatzakis, P. Dais, Determination of glycerol in wine using ³¹P NMR spectroscopy, *J. Am. Oil. Che. Soc.*, 2007, 84, 615-619

⁵⁰ E. Hatzakis, A. Agiomyrgianaki, P. Dais, Detection and quantification of free glycerol in virgin olive oil by ³¹P NMR spectroscopy, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 2010, 87, 29-34

⁵¹ A. Agiomyrgianaki, P. Dais, Simultaneous determination of phenolic compounds and triterpenic acids in oregano growing wild in Greece by ³¹P NMR spectroscopy, *Magn. Reson. Chem.*, 2012, 50, 739-748

⁵² Ε. Σουφλερός, *Οίνος και Αποστάγματα*, Εκδ. Σουφλερός Ευάγγελος Θεσσαλονίκη, 2000

⁵⁴ Σ. Κουράκου-Δραγωνά, *Θέματα οινολογίας: Επιστήμη και Τεχνολογία στον τομέα της οινοποιητικής τεχνικής*, Εκδ. Τροχαλία, Αθήνα, 1998

⁵⁵ H.S. Son, G.-S. Hwang, H.-J. Ahn, W.-M. Park, C.-H. Lee, Y.-S. Hong, Characterization of wines from grape varieties through multivariate statistical analysis of ¹H NMR spectroscopic data, *Food Res. Int.*, 2009, 42, 1483-1491.

⁵⁶ D. W. Jeffery, M. D. Mercurio, M. J. Herderich, Y. Hayasaka, P. A. Smith, Rapid isolation of red wine polymeric polyphenols by solid-phase extraction, *J. Agric. Food Chem.*, 2008, 56, 2571-2580

⁵⁷ A. Zwierzak, Cyclic organophosphorus compounds. I. Synthesis and infrared spectral studies of cyclic hydrogen phosphites and thiophosphites. *Can. J. Chem.*, 1967, 45, 2501-2512

⁵⁸ I. J. Kosir and J. Kidric, Identification of amino acids in wines by one- and two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy, *J. Agric. Food Chem.*, 2001, 49, 50-56

-
- ⁵⁹ <http://www.hmdb.ca/> , The Human Metabolome Database (HMDB)
- ⁶⁰ http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi, Spectral Database for Organic Compounds SDBS
- ⁶¹ B. Worley, R. Powers, Multivariate Analysis in Metabolomics, *Curr. Metabolomics*, 2013, 1, 92-107
- ⁶² H. Schütz, F. Radler, Anaerobic Reduction of Glycerol to Propanediol-1.3 by *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus buchneri*, *Syst. Appl. Microbiol.*, 1984, 5, 169-178
- ⁶³ N. Sauvageot, K. Gouffi, J-M. Laplace, Y. Auffray, Glycerol metabolism in *Lactobacillus collinoides*: production of 3-hydroxypropionaldehyde, a precursor of acrolein, *Int. J. Food Microbiol.*, 2000, 55, 167-170
- ⁶⁴ M. Sanz, B. F. de Simón, E. Cadahía, E. Esteruelas, Á. M. Muñoz, M. T. Hernández, I. Estrella, Polyphenolic profile as a useful tool to identify the wood used in wine aging, *Anal. Chim. Acta.*, 2012, 732, 33-45
- ⁶⁵ E.F. Gris, F. Mattivi, E.A. Ferreira, U. Vrhovsek, D.W. Filho, R.C. Pedrosa, M.T. Bordignon-Luiz, Phenolic profile and effect of regular consumption of Brazilian red wines on *in vivo* antioxidant activity, *J. of Food Comp. Anal.*, 2013, 31, 31-40
- ⁶⁶ M. Schwarz, G. Hofmann, P. Winterhalter, Investigations on anthocyanins in wines from *Vitis vinifera* cv. Pinotage: Factors influencing the formation of pinotin A and its correlation with wine age, *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52, 498-504.
- ⁶⁷ J. E. Lee, G. S. Hwang, F. V. D. Berg, C. H. Lee, Y. S. Hong, Evidence of vintage effects on grape wines using ¹H NMR-based metabolomic study, *Analytica Chimica Acta*, 2009, 648, 71-76.
- ⁶⁸ J. E. Lee , G. S. Hwang , C. H. Lee , Y. S. Hong, Metabolomics reveals alterations in both primary and secondary metabolites by wine bacteria, *J. Agric. Food Chem.*, 2009, 57, 10772-83

⁶⁹ A. B. Cerezo, M. A. Álvarez-Fernández, R. Hornedo-Ortega, A. M. Troncoso, M. C. García-Parrilla, Phenolic Composition of Vinegars over an Accelerated Aging Process Using Different Wood Species (Acacia, Cherry, Chestnut, and Oak): Effect of Wood Toasting, *J. Agric. Food Chem.*, 2014, 62 , 4369–4376

⁷⁰ B. S. Sun, C. Ferrao, M.I. Spranger, Effect of wine style and winemaking technology on resveratrol level in wines, *Cienc Tec Vitivinic*, 2003, 18, 77-91

⁷¹ J. Cvejić, M. Atanacković, Processing and Impact on Active Components in Food, Chapter 60 – Effect of Wine Production Techniques on Wine Resveratrol and Total Phenolics, 2015, Chapt 60, 501–508

⁷² L. Frémont, Biological effects of resveratrol, *Life Sci.*, 2000, 66, 663-73