

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΩΝ
ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ
ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΚΡΗΤΙΚΩΝ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΟΙΝΟΥ**

ΠΟΥΛΑΚΗΣ ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ

Υπεύθυνος: Βελεγράκης Μιχάλης

Επιβλέπων: Άγγλος Δημήτριος

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2017

UNIVERSITY OF CRETE
DEPARTMENT OF CHEMISTRY



Doctoral THESIS

**APPLICATION AND DEVELOPMENT OF
SPECTROSCOPIC TECHNIQUES IN MONITORING OF
CRETAN WINES**

POULAKIS EMMANOUIL

Supervisors: Velegrakis Michalis & Angloç Demetrios

HERAKLION 2017

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Άγγελος Δημήτριος (Επιβλέπων)

Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Απόστολος Σπύρος

Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Βελεγράκης Μιχάλης (Υπεύθυνος)

Διευθυντής Ερευνών Ινστιτούτου Ηλεκτρονικής Δομής & Λείζερ-ΙΤΕ

Κιτσόπουλος Θεοφάνης

Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Μιχαλόπουλος Νικόλαος

Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Περγαντής Σπύρος

Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Σαμαρτζής Πέτρος

Εντεταλμένος Ερευνητής Ινστιτούτου Ηλεκτρονικής Δομής & Λείζερ-ΙΤΕ



'Wine is the most healthful and hygienic of beverages'

-Louis Pasteur-

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Ινστιτούτο Ηλεκτρονικής Δομής και Λείζερ του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας στο Ηράκλειο Κρήτης, υπό την επιστημονική επίβλεψη του Διευθυντή Ερευνών Βελεγράκη Μιχάλη και τη συν-επίβλεψη του Καθηγητή του Τμήματος Χημείας Δημήτρη Άγγλου.

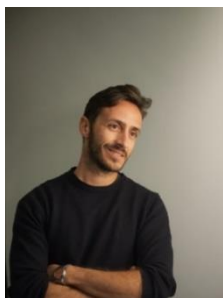
Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους επικεφαλής του ερευνητικού έργου Θαλής «Παλαιός Οίνος» και τον επιστημονικό υπεύθυνο Νταή Φώτη (ομότιμο καθηγητή του Τμήματος Χημείας) για την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν επιλέγοντας εμένα για την ερευνητική θέση την οποία προσέφεραν, τη χρηματοδότηση της έρευνας μου και τη διασφάλιση των κατάλληλων συνθηκών για την ομαλή εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Ευχαριστώ, το Τμήμα Χημείας που μου παρείχε τη δυνατότητα να ενταχθώ στο μεταπτυχιακό του πρόγραμμα, καθώς και το Ινστιτούτο Ηλεκτρονικής Δομής και Λείζερ για την παροχή ερευνητικής στέγης, τη μερική χρηματοδότηση της έρευνας μου και την παροχή των κατάλληλων υλικοτεχνικών μέσων και υποδομών.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να δώσω στον κύριο υπεύθυνο της ερευνητικής μου εργασίας μου, Διευθυντή Ερευνών Μιχάλη Βελεγράκη, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στην ανάθεση της συγκεκριμένης εργασίας, την ομαλή μας συνεργασία και τη συνεχή του καθοδήγηση και στήριξη έως και την περάτωση της εργασίας μου. Πολλές ευχαριστίες θα ήθελα να δώσω στον καθηγητή του Τμήματος Χημείας Δημήτρη Άγγλο, ο οποίος μέσω των επιστημονικών του συμβουλών και παρεμβάσεων, καθώς και των φροντιστηριακών μαθημάτων που μου προσέφερε, μου έδωσε τη δυνατότητα να αποκτήσω εξοικείωση με βασικές φασματοσκοπικές έννοιες και να βελτιωθώ επιστημονικά. Ευχαριστώ, όλα τα μέλη της εξεταστικής μου επιτροπής (Σπύρο Απόστολο, Κιτσόπουλο Θεοφάνη, Μιχαλόπουλο Νικόλαο και Περγαντή Σπύρο, καθηγητές του Τμήματος Χημείας) καθώς και τον Ερευνητή του Ινστιτούτου Ηλεκτρονικής Δομής και Λείζερ Πέτρο Σαμαρτζή, οι οποίοι δέχτηκαν να συμμετάσχουν στην εξεταστική μου επιτροπή, και των οποίων οι επιστημονικές παρεμβάσεις και συμβουλές ήταν ιδιαίτερα χρήσιμες.

Φυσικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συνεργάτες Άγγελο Φιλιππίδη, Χημικό PhD και Αντιγόνη Παπαδάκη, Φυσικό MSc για τη συμβολή τους και τη

βοήθεια τους στη διαδικασία των πειραμάτων, καθώς και το φιλικό κλίμα που επικρατούσε κατά την εργασία μου στο ΙΤΕ. Ευχαριστώ τους εξωτερικούς συνεργάτες Μαριάνθη Μπασαλέκου, Μαρία Αμαργιανιτάκη και Αργυρώ Στραταριδάκη για τη συνεργασία μας και την ανταλλαγή επιστημονικών απόψεων και πειραματικών δεδομένων. Επίσης, ευχαριστώ τους φοιτητές Θανάση Ρήγα, Άρη Βελεγράκη, Μαρία Πελώνη και Γιάννη Δασκαλάκη για τη βοήθεια στην πειραματική διαδικασία.

Τελειώνοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα φιλικά μου πρόσωπα τα οποία βρισκόντουσαν γύρω μου κατά τη διάρκεια των διδακτορικών μου σπουδών, εντός και εκτός ΙΤΕ/Πανεπιστημίου, δίνοντας μου θάρρος και όρεξη να προχωράω, και κυρίως τους γονείς μου, για την ηθική και οικονομική τους στήριξη, σε όλα τα στάδια των σπουδών μου.



ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Όνοματεπώνυμο: Πουλάκης Εμμανουήλ

Διεύθυνση: Ιωνίας 61, 71306 Ηράκλειο Κρήτης

Τηλέφωνα Επικοινωνίας: +302810391385, +302810236570 / +306937327970

Email: mpoulakis@iesl.forth.gr

Ημερομηνία Γέννησης: 07/10/1982

Οικογενειακή Κατάσταση: Άγαμος

Στρατιωτικές Υποχρεώσεις: Εκπληρωμένες

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

01/2013-07/2017: Διδακτορικό Δίπλωμα - Τμήμα Χημείας Πανεπιστήμιο Κρήτης

Θέμα Διατριβής: *Εφαρμογή και Ανάπτυξη Μεθόδων Φασματοσκοπίας Απορρόφησης και Φθορισμού στη Μελέτη Κρητικών Ποικιλιών Οίνου*

09/2008-07/2011: Μεταπτυχιακό Δίπλωμα - Τμήμα Χημείας Πανεπιστήμιο Κρήτης

Θέμα Διατριβής: *Μεταλλικά Στοιχεία σε Αιωρούμενα Σωματίδια του Παρισιού*

09/2002-07/2007: Δίπλωμα Γεωλογίας και Γεωπεριβάλλοντος - Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Διπλωματική Εργασία: *Ορυκτοχημική και Φασματοσκοπική Διευρεύνηση Ανθρακικών Σηπλαιοαποθέσεων από Σπήλαια της Κεντρικής Κρήτης*

06/2000: 3^ο Ενιαίο Λύκειο Ηρακλείου

ΕΡΓΑΣΙΑΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

01/2016-12/2016: Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας - Ινστιτούτο Ηλεκτρονικής Δομής και Λείζερ (Ερευνητική Δραστηριότητα)

01/2013-09/2015: Πανεπιστήμιο Κρήτης - Ερευνητικό Έργο ΘΑΛΗΣ ΠΑΛΑΙΟΣΟΙΝΟΣ (Συνεργάτης Ερευνητής)

03/2012-03/2013: ΟΠΕΚΕΠΕ - Ελεγκτής Γεωλόγος

05/2010-06/2010: Πανεπιστήμιο Κρήτης - Ερευνητικό Πρόγραμμα AIRPARIF (Συνεργάτης Ερευνητής)

ΓΛΩΣΣΟΜΑΘΕΙΑ

Μητρική Γλώσσα: Ελληνική

Ξένες Γλώσσες

Αγγλική (Certificate of Proficiency in English – University of Michigan)

- Ικανότητα ανάγνωσης άριστη
- Ικανότητα ομιλίας άριστη
- Ικανότητα γραφής άριστη

Γερμανική (Zertifikat Deutsch als Fremdsprache Goethe Institut)

- Ικανότητα ανάγνωσης καλή
- Ικανότητα ομιλίας καλή
- Ικανότητα γραφής καλή

ΔΕΞΙΟΤΗΤΕΣ

Γνώσεις Η/Υ: Microsoft Windows, Office, OriginLab, Unscrambler και Matlab (Experience in Data Processing).

Εργαστηριακή Εμπειρία

- Χειρισμός Επιστημονικών Οργάνων: UV-VIS, NIR, Φάσματοφθορισμόμετρο και ICP-MS.

Διδακτική Εμπειρία

- Βοηθός διδάσκοντα σε εκπαιδευτικά εργαστήρια Φυσικοχημείας
- Επιβλέπων σε διπλωματικές εργασίες προπτυχιακών φοιτητών

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

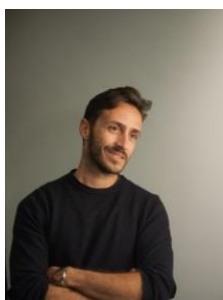
- A. Philippidis, **E. Poulakis**, M. Basalekou, S. Kalithraka, A. Strataridaki, M. Velegrakis, Characterization of Greek Wines by Ultraviolet–Visible Absorption Spectroscopy and Statistical Multivariate Methods. *Analytical Letters*.2017, **50**(12), 1950-1963
- A.Philippidis, **E. Poulakis**, A. Papadaki, and M. Velegrakis, Comparative Study using Raman and Visible Spectroscopy of Cretan Extra Virgin Olive Oil Adulteration with Sunflower Oil. *Analytical Letters*.2017, **50**(7), 1-14
- **E.Poulakis**, C. Theodosi, M. Bressi, J. Sciare, V. Ghersi, N. Mihalopoulos, Airborne mineral components and trace metals in Paris region: Spatial and temporal variability. *Environ. Sci. Pollut. Res.*2015, **22**, 14663-14672
- M. Bressi, J. Sciare, V. Ghersi, N. Mihalopoulos, J.E.Petit, J.B.Nicolas, S. Moukhtar, A. Rosso, A. Féron, N. Bonnaire, **E. Poulakis**, C.Theodosi, 2014. Sources and geographical origins of fine aerosols in Paris (France). *Atmos. Chem. Phys.*, **14**, 8813-8839

ΣΥΝΕΔΡΙΑ ΚΑΙ ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ

- Investigation on Greek White and Red Wines using Optical Absorption and Fluorescence Spectroscopy in combination with Chemometrics (Poster). 9th International Conference on Instrumental Methods of Analysis - Modern Trends and Applications, September 2015
- Wine maturation in different barrels with UV-Vis and Fluorescence spectroscopy (Poster). ISLS RHODES 2014 XVI International Symposium on Luminescence Spectrometry, September 2014
- Copenhagen School of Chemometrics, June 2015.

ΆΛΛΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Άδειες Οδήγησης: Αυτοκινήτου, μοτοσυκλέτας, ιστιοπλοϊκού, ταχύπλοου σκάφους.
Προσωπικά Ενδιαφέροντα: Φωτογραφία, ταξίδια και αθλήματα (Δρομέας μεσαίων αποστάσεων, Ιστιοπλοΐα, Χιονοδρομία).



Curriculum Vitae

PERSONAL INFORMATIONS

Surname / First name: Poulakis Emmanouil
Address: Ionias 61, 71306 Heraklion Crete, Greece
Phone Landline/ Mobile: +302810391385, +302810236570 / +306937327970
Email: mpoulakis@iesl.forth.gr
Date of Birth: 07/10/1982
Nationality: Greek
Marital Status: Single
Military Obligations: Fulfilled

EDUCATION

01/2013-07/2017: PhD in Chemistry-University of Crete
Thesis: *Application and Development of Spectroscopic Techniques in Monitoring of Cretan Wines*

09/2008-07/2011: MSc. Program Technologies in Environmental Protection
Department of Chemistry-University of Crete
Thesis: *Airborne Trace Metals in the area of Paris*

09/2002-07/2007: Diploma of Geology
Department of Geology and Geo-environment-National and Kapodistrian University of Athens
Diploma work: *Mineral, Chemical and Spectroscopic Investigation of Carbonate Speleothems from caves of central Crete*

06/2000: 3rd High School of Heraklion Crete

EMPLOYMENT

01/2016-12/2016: Forth (Research grants)
01/2013-09/2015: Thales (Research Program-Old-Wine)
05/2010-06/2010: AIRPARIF (Research Program for the chemical investigation of airborne particulate matter in the area of Paris)

LANGUAGES

Native Language: Greek

Other Languages

English (Certificate of Proficiency in English – University of Michigan)

- Understanding Proficiently
- Speaking Proficiently
- Writing Proficiently

German (Zertifikat Deutsch als Fremdsprache Goethe Institut)

- Understanding Efficiently
- Speaking Efficiently
- Writing Efficiently

SKILLS

Computational Skills

-Microsoft Windows, Office, OriginLab, Unscrambler and Matlab (Experience in Data Processing).

Laboratory Skills

- UV-VIS, NIR Spectrometer, Fluorometer and ICP-MS.

Teaching Experience

- Lab's Teacher assistant in physical chemistry laboratories.
- Supervisor of undergraduate students in their diploma works.

PUBLICATIONS

- A. Philippidis, **E. Poulakis**, M. Basalekou, S. Kalithraka, A. Strataridaki, M. Velegrakis, Characterization of Greek Wines by Ultraviolet–Visible Absorption Spectroscopy and Statistical Multivariate Methods. *Analytical Letters*.2017, **50** (12), 1950-1963
- A.Philippidis, **E. Poulakis**, A. Papadaki, and M. Velegrakis, Comparative Study using Raman and Visible Spectroscopy of Cretan Extra Virgin Olive Oil Adulteration with Sunflower Oil. *Analytical Letters*.2017, **50** (7), 1-14
- **E.Poulakis**, C. Theodosi, M. Bressi, J. Sciare, V. Gherzi, N. Mihalopoulos, Airborne mineral components and trace metals in Paris region: Spatial and temporal variability. *Environ. Sci. Pollut. Res.*2015, **22**, 14663-14672
- M. Bressi, J. Sciare, V. Gherzi, N. Mihalopoulos, J.E.Petit, J.B.Nicolas, S. Moukhtar, A. Rosso, A. Féron, N. Bonnaire, **E. Poulakis**, C.Theodosi, 2014. Sources and geographical origins of fine aerosols in Paris (France). *Atmos. Chem. Phys.*, **14**, 8813-8839

CONFERENCES AND COURSES

- Investigation on Greek White and Red Wines using Optical Absorption and Fluorescence Spectroscopy in combination with Chemometrics (Poster). 9th International Conference on Instrumental Methods of Analysis-Modern Trends and Applications, September 2015
- Wine maturation in different barrels with UV-Vis and Fluorescence spectroscopy (Poster). ISLS RHODES 2014 XVI International Symposium on Luminescence Spectrometry, September 2014
- Copenhagen School of Chemometrics, June 2015.

FURTHER INFORMATIONS

Driving Skills: License for car, motorbike, sailing and speed boat.

Personal Interests: Photography. Enjoy all sports (Running, Sup, Ski and Football). Love to travel and experience different cultures.

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη	xix
Abstract	xxi
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	23
1.1 Ερευνητικό Πλαίσιο.....	23
1.2 Στόχος Διδακτορικής Διατριβής	27
Βιβλιογραφία	29
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	33
2.1 Ιστορικά Στοιχεία και Οίνος	33
2.2 Τύποι και Κατηγορίες Οίνων	34
2.3 Ελληνικός και Κρητικός Αμπελώνας	36
2.4 Χημική Σύσταση.....	39
2.4.1 Σάκχαρα	39
2.4.2 Αλκοόλες.....	40
2.4.3 Οργανικά Οξέα	40
2.4.4 Ανόργανα Συστατικά	41
2.4.5 Αζωτούχες Ενώσεις	42
2.4.6 Πτητικά Συστατικά	43
2.4.7 Φαινολικές Ενώσεις.....	44
2.5 Χρώμα και Όψη	47
2.6 Παλαίωση.....	51
Βιβλιογραφία	52
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	57
3.1 Ηλεκτρομαγνητική Ακτινοβολία	57
3.2 Φασματοσκοπία Απορρόφησης Υπεριώδους- Ορατού (UV-VIS)	58

3.3 Εγγύς Υπέρυθρο (NIR).....	62
3.4 Φασματοσκοπία Φθορισμού	63
Βιβλιογραφία	67
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	69
4.1 Χημειομετρικές Μέθοδοι.....	69
4.2 Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών	71
4.3 Τεχνική Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων.....	72
4.4 Μέθοδοι Κατηγοριοποίησης.....	74
4.4.1 Ανάλυση Διακριτότητας Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων	75
4.5 Δεδομένα Πολλών Διαστάσεων.....	76
4.5.1 Ανάλυση Παράλληλων Παραγόντων	77
4.6 Προ-Επεξεργασία Δεδομένων	79
4.6.1 Μέθοδος Mean Centering	79
4.6.2 Μέθοδος Standard Normal Variate.....	80
4.6.3 Μέθοδος Savitzky Golay	80
4.6.4 Μέθοδος Παραγωγίσις Δεδομένων.....	80
4.7 Προ-επεξεργασία Χαρτών Φθορισμού	81
Βιβλιογραφία	82
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5	85
5.1 Πειραματικός Σχεδιασμός και Δείγματοληψία.....	85
5.2 Προετοιμασία Δειγμάτων	87
5.3 Μέτρηση Απορρόφησης	87
5.4 Μέτρηση Φθορισμού	88
5.5 Λογισμικά και Επεξεργασία Φασματοσκοπικών Δεδομένων	89
Βιβλιογραφία	90

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6	91
6.1 Επίδραση της μεταβολής της παραμέτρου του pH στον οίνο κατά τη μέτρηση της απορρόφησης και του φθορισμού του	91
6.2 Έλεγχος γραμμικότητας μεταξύ κατ' όγκο συγκέντρωσης οίνου και τιμής Απορρόφησης	94
6.3 Εκθετική - Γραμμική Σχέση κατ' όγκο συγκέντρωσης οίνου και έντασης εκπομπής Φθορισμού.....	95
6.4 Διαφοροποίηση Χαρτών Φθορισμού με βάση τη γεωμετρία μέτρησης.....	97
Βιβλιογραφία	98
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7	101
7.1 Διαχωρισμός Βοτανικής Προέλευσης με τη Φασματοσκοπία Απορρόφησης Υπεριώδους.....	101
7.2 Διαχωρισμός Βοτανικής Προέλευσης με τη Φασματοσκοπία Απορρόφησης Ορατού.....	106
7.3 Διαχωρισμός Βοτανικής Προέλευσης με τη Φασματοσκοπία Απορρόφησης Εγγύς Υπέρυθρου.....	108
7.4 Διαχωρισμός Βοτανικής Προέλευσης με τη Φασματοσκοπία Φθορισμού	110
Βιβλιογραφία	115
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8	117
8.1 Διαχωρισμός σταδίου ωρίμανσης με τη Φασματοσκοπία Απορρόφησης Υπεριώδους.....	118
8.2 Διαχωρισμός σταδίου ωρίμανσης με τη Φασματοσκοπία Απορρόφησης Ορατού	120
8.3 Διαχωρισμός σταδίου ωρίμανσης με τη Φασματοσκοπία Απορρόφησης Εγγύς Υπέρυθρου	123
8.4 Διαχωρισμός σταδίου ωρίμανσης με τη Φασματοσκοπία Φθορισμού	125
Βιβλιογραφία	127

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9	129
9.1 Διαχωρισμός τρόπου ωρίμανσης με τη Φασματοσκοπία Απορρόφησης Υπεριώδους.....	130
9.2 Διαχωρισμός τρόπου ωρίμανσης με τη Φασματοσκοπία Απορρόφησης Ορατού	132
9.3 Διαχωρισμός τρόπου ωρίμανσης με τη Φασματοσκοπία Φθορισμού	134
Βιβλιογραφία	136
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10	137
10.1 Συσχέτιση Φασματοσκοπίας Απορρόφησης Υπεριώδους με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu	139
10.2 Συσχέτιση Φασματοσκοπίας Απορρόφησης Υπεριώδους με τη Φασματοσκοπική Τεχνική NMR	143
10.3 Συσχέτιση Φασματοσκοπίας Απορρόφησης Υπεριώδους με Οργανοληπτικά Χαρακτηριστικά του οίνου	149
10.4 Συσχέτιση Φασματοσκοπίας Απορρόφησης Ορατού με τη συγκέντρωση των Ανθοκυανών.....	156
10.5 Συσχέτιση Φασματοσκοπίας Απορρόφησης Υπεριώδους με τη συγκέντρωση των Ταννινών	158
10.6 Πρόσδιορισμός Ποσοστού Μίξης με τη Φασματοσκοπία Απορρόφησης Ορατού	161
Βιβλιογραφία	163
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11	165
Συμπεράσματα	165
Παράρτημα.....	169
Συντομεύσεις.....	173
Δημοσιεύσεις	175
Συμμετοχές σε συνέδρια	175

Περίληψη

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκαν δείγματα από Ελληνικές-Κρητικές ποικιλίες οίνου (Δαφνί, Βηλάνα, Κοτσιφάλι και Μαντηλάρι) προερχόμενα από δύο σοδειές (2012 και 2013). Τα δείγματα εξετάστηκαν κατά τη διάρκεια της παλαίωσης τους σε διαφορετικούς περιέκτες (ανοξειδωτες δεξαμενές, ανοξειδωτες δεξαμενές με ρινίσματα Γαλλικής δρυός, βαρέλι από ξύλο Γαλλικής δρυός, βαρέλι από ξύλο ακακίας, βαρέλι από ξύλο Αμερικανικής δρυός και βαρέλι από ξύλο καστανιάς) σε χρόνους ωρίμανσης των 3, 6, 9 και 12 μηνών. Για τη μελέτη τους χρησιμοποιήθηκαν οι φασματοσκοπικές τεχνικές της απορρόφησης στο υπεριώδες (UV), ορατό (Visible) και εγγύς υπέρυθρο (NIR), καθώς και η τεχνική του φθορισμού. Αρχικά αναπτύχθηκε μία συγκεκριμένη διαδικασία αποθήκευσης, προεπεξεργασίας και μέτρησης των δειγμάτων. Στη συνέχεια μελετήθηκαν παράγοντες όπως η μεταβολή του pH στον οίνο και η επίδραση της στα αποτελέσματα των μετρήσεων της απορρόφησης και του φθορισμού. Ο βασικός ερευνητικός στόχος της διατριβής ήταν η διερεύνηση των δυνατοτήτων των συγκεκριμένων φασματοσκοπικών τεχνικών στη μελέτη του οίνου.

Σε συνδυασμό με τις χημειομετρικές μεθόδους της ανάλυσης κύριων συνιστωσών (PCA), της ανάλυσης διακριτότητας με την τεχνική μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA) και της ανάλυσης παράλληλων παραγόντων (PARAFAC), διαπιστώθηκε ότι τόσο η φασματοσκοπία απορρόφησης όσο και η φασματοσκοπία φθορισμού είναι ικανές να διαχωρίσουν δείγματα οίνου με βάση τη βοτανική του προέλευση (100%, επιτυχημένη πρόβλεψη). Με παρόμοιο τρόπο διαπιστώθηκε ότι είναι εφικτός ο διαχωρισμός ως προς το στάδιο ωρίμανσης (60-100%, επιτυχημένη πρόβλεψη) και τον τρόπο ωρίμανσης (ειδικότερα για βαρέλια από ξύλο ακακίας και καστανιάς). Σε όλους τους προαναφερθέντες διαχωρισμούς δύναται να δοθεί μία ποιοτική χημική ερμηνεία. Στο πλαίσιο της διερεύνησης των δυνατοτήτων των φασματοσκοπικών τεχνικών πραγματοποιήθηκε συσχέτιση των φασματικών δεδομένων με δεδομένα από άλλες αναλυτικές τεχνικές. Με τη χρήση της χημειομετρικής τεχνικής μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS), κατασκευάστηκαν επιτυχημένα μοντέλα πρόβλεψης της φαινολικής σύστασης του οίνου, της συγκέντρωσης συγκεκριμένων χημικών ενώσεων (Τυροσόλη και Καφταρικό Οξύ), της βαθμολογίας σε οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (αίσθηση στυφού και αίσθηση

πικρού), της συγκέντρωσης σε ανθοκυάνες και ταννίνες, ενώ δημιουργήθηκε μοντέλο πρόβλεψης του ποσοστού παρουσίας της κάθε ποικιλίας σε μίγμα οίνου προερχόμενο από δύο ποικιλίες.

Λέξεις Κλειδιά: Φασματοσκοπία Απορρόφησης, Φασματοσκοπία Φθορισμού, Οίνος, Χημειομετρία, Χαρακτηριστικά Οίνου, Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών, Τεχνική Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων, Ανάλυση Παράλληλων Παραγόντων

Abstract

Within the framework of the present dissertation, typical Cretan Wines were investigated. Wine samples came from the vinification of four indigenous Cretan grape varieties (Dafni, Vilana, Kotsifali and Mantilari) after their cultivation in two different harvest periods (2012 and 2013). Analysis of the samples was implemented during their maturation in different types of containers (stainless steel barrels, stainless steel barrels with oak chips and wooden barrels made of American oak, Acacia, French oak and Chestnut) at different stages of 3, 6, 9 and 12 months. UV, VIS, NIR absorption spectroscopy and Fluorescence spectroscopy were used for the analysis of the samples. Initially, a specific procedure of storage, pre-treatment and measurement was developed. Factors such as change in wine pH and its impact on the absorption and fluorescence spectral data were investigated. The main purpose of this research has been to explore the potential of simple spectroscopic techniques in wine analysis.

Chemometrics methods such as Principal Component Analysis (PCA), Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) and Pararell Factor Analysis (PARAFAC) were used and it was found that spectroscopic techniques have the ability to discriminate wines based on their botanical origin (100%, success). In the same way, it was shown that discrimination of maturation stage (60-100%, success) and containers used for wine maturation can also be accomplished (especially, in the cases of wooden barrels made of Acacia and Chestnut). A qualitative chemical explanation of all types of discriminations can be given. In the framework of our research on the optical spectroscopy of wines, spectral data were correlated with data obtained by use of other analytical methods and standard tests for assessing wine properties. Based on the Partial Least Squares (PLS) method, efficient mathematical models were constructed that were capable of estimating with reasonable success the content of wine in Phenolics, Tyrosol, Caftaric acid, Anthocyanins and Tannins. Likewise, the rating of wines based on selected Organoleptic Characteristics such as astringency and bitterness could be successfully assessed by means of the PLS-based models. Finally, a straightforward prediction model was established, which allowed quantification of the percentage of different grape varieties in a binary wine mixture.

KeyWords: UV-VIS, Fluorescence, Spectroscopy, Wines, Characteristics of Wine
Chemometrics, Principal Component Analysis, Partial Least Squares Regression,
Pararell Factor Analysis

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Εισαγωγή

1.1 Ερευνητικό Πλαίσιο

Ο έλεγχος της ποιότητας, η ασφάλεια και η αυθεντικότητα των τροφίμων αποτελούν θέματα μείζονος σημασίας, τόσο για τους παραγωγούς, όσο και για τους καταναλωτές [1]. Ο οίνος ανήκει σε μία κατηγορία τροφίμων με πολύ μεγάλη διακύμανση της εμπορικής του αξίας, καθιστώντας τον ως ένα προϊόν ιδιαίτερου ενδιαφέροντος, το οποίο δύναται να αποτελέσει εύκολο στόχο νοθείας. Διάφοροι τρόποι αλλοίωσης του προϊόντος με κύριο σκοπό την παραπλάνηση του καταναλωτικού κοινού έχουν παρατηρηθεί, με τους πιο συνηθισμένους να είναι i) η αραίωσή του με νερό, ii) η προσθήκη αλκοόλης, χρωστικών και γευστικών ουσιών, iii) η ανάμιξη του με άλλους οίνους κατώτερης ποιότητας και iv) η ψευδής ταυτοποίηση του [2].

Ήδη εδώ και αρκετά χρόνια, ο έλεγχος της ποιότητας και η πιστοποίηση της αυθεντικότητας του οίνου έχει αποτελέσει και συνεχίζει να αποτελεί μία μεγάλη πρόκληση για τον κλάδο της αναλυτικής χημείας. Στη βιβλιογραφία, υπάρχει πληθώρα επιστημονικών εργασιών, οι οποίες μελετούν χημικά είδη όπως μεταλλικά στοιχεία, ισότοπα στοιχείων, πτητικές ενώσεις, αμινοξέα και φαινολικές ενώσεις [3]. Από τις πιο συνηθισμένες αναλυτικές τεχνικές είναι η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC), η αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography, GC), η φασματογραφία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (Induced Coupled Plasma–Mass Spectrometry, ICP-MS), η φασματοσκοπία οπτικής εκπομπής επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (Induced Coupled Plasma–Optical Emission Spectroscopy, ICP-OES), η ατομική απορρόφηση (Atomic Absorption Spectroscopy, AAS) η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR) και

φασματοσκοπικές τεχνικές οι οποίες βασίζονται στα φαινόμενα της απορρόφησης και του φθορισμού [4-10]. Σε πιο πρόσφατες μελέτες, διερευνήθηκε η χρησιμότητα τεχνικών όπως η φασματοσκοπία Raman και η φασματοσκοπία εκπομπής επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος από λέιζερ (Laser Induced Breakdown Spectroscopy, LIBS) [11,12].

Τα τελευταία χρόνια, έχει αναπτυχθεί μία καινοτόμα επιστημονική προσέγγιση η οποία περιγράφεται με τον όρο *μεταβολομική ανάλυση* και προέρχεται από τον κλάδο των Βίο-Επιστημών. Βασίζεται στη μελέτη μικρών χημικών μορίων όπως οι μεταβολίτες, μέσω μίας λεπτομερούς χημικής ανάλυσης με σκοπό την ανίχνευση όσο το δυνατόν περισσότερων τέτοιων χημικών μορίων από μία και μόνο μέτρηση [13]. Εξαιτίας της βιολογικής προέλευσης των τροφίμων και την παρουσία μεταβολιτών, η προσέγγιση αυτή δεν άργησε να επεκταθεί και στον τομέα αυτό. Ο οίνος αποτελεί ένα από τα πρώτα προϊόντα μελέτης και η τεχνική του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) θεωρείται η καταλληλότερη τεχνική μεταβολομικής ανάλυσης. Η μεταβολομική ανάλυση δεν περιορίστηκε στην τεχνική του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού. Ο ίδιος τρόπος προσέγγισης εφαρμόστηκε και σε άλλες φασματοσκοπικές τεχνικές. Η χρήση της περιγράφεται με όρους όπως, *μη στοχευμένη ανάλυση* ή *χημικό αποτύπωμα* τροφίμων [14], οι οποίοι σχετίζονται με την καταγραφή δεδομένων από κάποια τεχνική και τη χρησιμοποίησή τους χωρίς στόχευση στην ανίχνευση συγκεκριμένων χημικών ενώσεων.

Τα δεδομένα τα οποία προκύπτουν από τέτοιου είδους προσεγγίσεις είναι συνήθως πολύ-παραμετρικά. Παράλληλα λοιπόν με τη μη στοχευμένη προσέγγιση, ένα άλλο επιστημονικό πεδίο εξελίσσεται ταυτόχρονα. Η *Χημειομετρία* ορίζεται ως το πεδίο εκείνο το οποίο χρησιμοποιεί τη στατιστική και τα μαθηματικά με σκοπό την καλύτερη αξιολόγηση και ερμηνεία δεδομένων, τα οποία προκύπτουν από τη χημική ανάλυση [15]. Υπάρχει πληθώρα χημειομετρικών μεθόδων, η χρήση των οποίων εξαρτάται από τη μορφή των δεδομένων και τον ερευνητικό στόχο. Τα πιο συνηθισμένα είναι η ανάλυση κύριων συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA), η ανάλυση ομοιομορφίας ομάδων (Hierarchical Cluster Analysis, HCA), η τεχνική μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Regression, PLS), η ανάλυση διακριτότητας (Discriminant Analysis, DA), η ανάλυση κύριων παραγόντων (Parallel Factor Analysis, PARAFAC), καθώς και συνδυασμοί αυτών [16-21].

Κάποιες από τις τεχνικές οι οποίες ακολουθούν την προσέγγιση της *μη στοχευμένης ανάλυσης*, παρά τις υψηλού επιπέδου αναλυτικές τους ικανότητες (όπως αυτές του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού), είναι υψηλού κόστους, χρονοβόρες και απαιτούν προ-επεξεργασία του δείγματος. Αντίθετα κάποιες άλλες είναι χαμηλού κόστους, γρήγορες και βασίζονται στην καταγραφή απλών φαινομένων. Η χρησιμοποίηση πιο απλών αναλυτικών τεχνικών, οι οποίες έχουν τη δυνατότητα με γρήγορο και ακριβή τρόπο να εκτιμήσουν την ποιότητα και να διασφαλίσουν την αυθεντικότητα του οίνου είναι πολλές φορές προτιμότερη. Ο συνδυασμός της απλότητας με την ικανότητα τους για ταυτόχρονη ανάλυση πολλών μεταβλητών, τις ξεχωρίζει από τις υπόλοιπες και ωθεί την επιστημονική έρευνα προς τη διερεύνηση των δυνατοτήτων τους.

Η Φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FT-IR), εγγύς υπερύθρου (Near Infrared Spectroscopy, NIR), υπεριώδους-ορατού (Ultraviolet-Visible Spectroscopy, UV-Vis) και φθορισμού (Fluorescence Spectroscopy, FL) είναι φασματοσκοπικές τεχνικές οι οποίες χαρακτηρίζονται από απλότητα, καμία ή ελάχιστη προ-επεξεργασία του δείγματος, υψηλή ευαισθησία, καθώς και χαμηλό κόστος εξοπλισμού και ανάλυσης. Η εφαρμογή τους στη μελέτη του οίνου είναι ήδη αρκετά διαδεδομένη, με πολλά δημοσιευμένα άρθρα σε έγκυρα επιστημονικά περιοδικά. Παρά ταύτα, υπάρχουν αρκετά περιθώρια βελτιστοποίησης και εντοπισμού νέων δυνατοτήτων. Το κύριο ερευνητικό ενδιαφέρον των περισσοτέρων σχετίζεται με τη διερεύνηση της ικανότητας τους να διαφοροποιούν ή να κατηγοριοποιούν δείγματα οίνου ως προς τη βοτανική τους προέλευση (ποικιλία σταφυλιού), τη γεωγραφική τους προέλευση, το χρόνο παλαίωσης, τη σοδειά, τις οινολογικές διεργασίες οι οποίες προηγήθηκαν, καθώς και την πρόβλεψη ποιοτικών και ποσοτικών χαρακτηριστικών.

Ενδεικτικά παρουσιάζονται κάποιες επιστημονικές εργασίες, οι οποίες σχετίζονται με εφαρμογές των φασματοσκοπικών τεχνικών στη μελέτη του οίνου. Έτσι λοιπόν, λευκοί οίνοι από την Αυστραλία διαφοροποιήθηκαν ως προς τη βοτανική τους προέλευση (ποικιλίες Riesling και Chardonnay) με τη φασματοσκοπία απορρόφησης ορατού (Visible) και εγγύς υπερύθρου (NIR) σε συνδυασμό με τις χημειομετρικές μεθόδους της ανάλυσης κύριων συνιστωσών (PCA), της μείωσης κύριων συνιστωσών (Principal Component Regression, PCR) και της διακριτότητας με την τεχνική μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Discriminant Partial Least Squares,

DPLS) [22]. Σε άλλο επιστημονικό άρθρο, ερυθροί οίνοι προερχόμενοι από την ποικιλία Shiraz διαφοροποιήθηκαν ως προς τη γεωγραφική τους προέλευση (από διαφορετικές περιοχές της Αυστραλίας) με τη φασματοσκοπία απορρόφησης υπεριώδους-ορατού (UV-Visible), εγγύς υπερύθρου (NIR) και υπερύθρου (IR) σε συνδυασμό με τις χημειομετρικές μεθόδους της ανάλυσης κύριων συνιστωσών (PCA), της γραμμικής ανάλυσης διακρίτοτητας (LDA) και της μεθόδου (Soft Independent Modelling of Class Analogy, SIMCA) [23]. Σε μία άλλη μελέτη, οίνοι από την Ισπανία διαχωρίστηκαν με βάση την ονομασία προελεύσεως τους (ΠΟΠ) με τη φασματοσκοπία απορρόφησης υπεριώδους-ορατού (UV-VIS) σε συνδυασμό με τις χημειομετρικές μεθόδους της ανάλυσης κύριων συνιστωσών (PCA) και τη μέθοδο (SIMCA) [24]. Μόνο-ποικιλιακοί λευκοί και ερυθροί οίνοι των ποικιλιών Syrah, Cabernet Sauvignon, Merlot, Chardonnay, Muscat, καθώς και οίνοι προερχόμενοι από γνωστές Τούρκικες ποικιλίες, εξετάστηκαν με τη φασματοσκοπία απορρόφησης υπεριώδους-ορατού μέσω της οποίας συλλέχθηκαν πληροφορίες για τα χρωματικά τους χαρακτηριστικά, ενώ με τη βοήθεια της χημειομετρικής μεθόδου της ορθογώνιας ανάλυσης διακρίτοτητας μερικών ελαχίστων τετραγώνων (OPLS-DA) διαχωρίστηκαν ως προς την ποικιλία και τη σοδειά τους [25]. Με τη φασματοσκοπία απορρόφησης υπεριώδους-ορατού (UV-VIS) και τη χημειομετρική τεχνική των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS), ήταν εφικτή η πρόβλεψη του χρόνου ωρίμανσης και του χρόνου παλαίωσης σε οίνους προερχόμενους από το σύμπλεγμα νήσων Μαδέρα [26]. Με την φασματοσκοπία φθορισμού (FL) και τη χημειομετρική μέθοδο (PARAFAC), επιτεύχθηκε διαχωρισμός ερυθρών οίνων βάσει της ποικιλίας προέλευσης και έγινε μία προσπάθεια εντοπισμού των φθορίζόντων συστατικών, τα οποία ήταν υπεύθυνα για αυτόν τον διαχωρισμό [27]. Ολοκληρώνοντας την παρουσίαση των επιστημονικών εργασιών οι οποίες σχετίζονται με εφαρμογές των φασματοσκοπικών τεχνικών στη μελέτη του οίνου, αναφέρεται μία περίπτωση ικανοποιητικής συσχέτισης οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του οίνου με τη φασματοσκοπία απορρόφησης ορατού (Visible) και εγγύς υπερύθρου (NIR), σε οίνους προερχόμενους από τις ποικιλίες Riesling και Chardonnay [28].

Όπως φαίνεται από τη βιβλιογραφία, η οποία δεν περιορίζεται μόνο στη μελέτη του οίνου, η χρήση οπτικών φασματοσκοπικών τεχνικών είναι ευρεία εδώ και πολλά χρόνια, με επιστημονικά όργανα συνοδευόμενα από φιλικά ως προς τον χρήστη λειτουργικά συστήματα [29,30]. Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί

λογισμικά πακέτα τα οποία επικεντρώνονται στην επεξεργασία των φασματοσκοπικών δεδομένων, παρέχοντας τις απαραίτητες χημειομετρικές μεθόδους [31,32]. Παράλληλα, διατίθενται πολύ-εργαλεία με τα οποία είναι εφικτό να πραγματοποιηθεί ταυτόχρονη καταγραφή φάσματος, επεξεργασία των δεδομένων και παρουσίαση των αποτελεσμάτων δίνοντας τη δυνατότητα της επί τόπου ανάλυσης [33].

Συνήθως τα αποτελέσματα τα οποία προκύπτουν από τις οπτικές φασματοσκοπικές τεχνικές απεικονίζονται με τη μορφή φασμάτων. Τα πιο συνηθισμένα είναι τα φάσματα απορρόφησης, ανάκλασης, εκπομπής, διέγερσης, και χάρτες φθορισμού. Ο τρόπος απεικόνισης εξαρτάται από το φυσικοχημικό φαινόμενο το οποίο καταγράφεται και τον τρόπο καταγραφής του. Τα φάσματα σχετίζονται με τη χημική σύσταση του οίνου και με τη βοήθεια της χημειομετρίας είναι ικανά να μας δώσουν ποιοτικές και ημί-ποσοτικές πληροφορίες για διάφορα χημικά είδη. Πριν την ανάλυση των φασματοσκοπικών δεδομένων πολλές φορές κρίνεται απαραίτητη μία μαθηματική προ-επεξεργασία αυτών με σκοπό είτε την εξάλειψη φαινομένων τα οποία σχετίζονται με την πειραματική διαδικασία και είναι ανεξάρτητα της χημείας του οίνου, είτε την ανάδειξη συγκεκριμένων στοιχείων των δεδομένων τα οποία μπορεί να είναι ιδιαίτερης σημασίας για τον ερευνητικό στόχο. Η διαδικασία της μαθηματικής προ-επεξεργασίας των φασματοσκοπικών δεδομένων αποτελεί μέρος της χημειομετρικής ανάλυσης.

Η φυσικοχημική ερμηνεία των φασματοσκοπικών δεδομένων δίνει πληροφορίες για διάφορα χημικά είδη. Ιδιαίτερου ενδιαφέροντος, είναι η οικογένεια των φαινολικών ενώσεων. Οι ενώσεις αυτές αν και σε χαμηλές συγκεντρώσεις είναι ιδιαίτερα σημαντικές στη διαμόρφωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του οίνου, όπως το χρώμα και η γεύση του [34,35]. Επιπλέον, είναι πολυάριθμες οι επιστημονικές έρευνες οι οποίες συνδέουν την κατανάλωση τροφίμων πλουσίων σε φαινολικά συστατικά με ευεργετικές συνέπειες στην ανθρώπινη υγεία. Αντι-μικροβιακές, αντί-καρκινικές και γενικότερα αντί-ϊικές είναι κάποιες μόνο από τις δράσεις των φαινολικών ενώσεων στον ανθρώπινο οργανισμό [36].

1.2 Στόχος Διδακτορικής Διατριβής

Έχοντας μελετήσει τις ερευνητικές τάσεις οι οποίες είχαν αναπτυχθεί τα τελευταία έτη ως προς την ανάλυση του οίνου, κρίθηκε ωφέλιμη η εκπόνηση μίας

διδασκαρικής διατριβής η οποία θα μελετούσε τη χρησιμοποίηση της φασματοσκοπίας σε Κρητικές ποικιλίες Οίνου. Η βασική ιδέα ήταν η διερεύνηση των δυνατοτήτων των διαθέσιμων φασματοσκοπικών τεχνικών της απορρόφησης στο υπεριώδες, ορατό και εγγύς υπέρυθρο τμήμα του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος αλλά και του φθορισμού. Η εκπόνηση της διατριβής στηρίχθηκε πάνω σε ένα καθορισμένο ερευνητικό πρόγραμμα το οποίο ορίστηκε από το ερευνητικό έργο ΘΑΛΗΣ «Παλαιός Οίνος» [37]. Μελετήθηκαν δείγματα οίνου από γηγενείς Ελληνικές-Κρητικές ποικιλίες (Δαφνί, Βηλάνα, Κοτσιφάλι και Μαντηλάρι) κατά τη διαδικασία της παλαίωσης τους με διαφορετικό τρόπο (ανοξειδωτες δεξαμενές, ανοξειδωτες δεξαμενές με ρινίσματα Γαλλικής δρυός, βαρέλια από ξύλο Αμερικανικής δρυός, βαρέλια από ξύλο ακακίας, βαρέλια από ξύλο Γαλλικής δρυός και βαρέλια από ξύλο καστανιάς). Οι κύριοι ερευνητικοί στόχοι της διδακτορικής διατριβής ήταν:

- Η ανάπτυξη μίας συγκεκριμένης διαδικασίας αποθήκευσης, προεπεξεργασίας και ανάλυσης των δειγμάτων. Κατά τη διαδικασία αυτή ελέγχθηκαν παράγοντες όπως η ακρίβεια, η γραμμικότητα και η επαναληψιμότητα των μετρήσεων. Επιπλέον ελέγχθηκαν παράγοντες όπως το pH του οίνου και η επίδραση της μεταβολής του στα φάσματα απορρόφησης και φθορισμού, η απορρόφηση και ο φθορισμός χημικών ενώσεων οι οποίες εμπεριέχονται στον οίνο, η γραμμικότητα των μετρήσεων και η αναζήτηση της καταλληλότερης διάταξης για τη μέτρηση του φθορισμού. Όσον αφορά στη διάταξη μέτρησης του φθορισμού, αξίζει να αναφερθεί ο σχεδιασμός και η κατασκευή ενός ειδικού εξαρτήματος για την τοποθέτηση του δείγματος κατά τη μέτρηση του φθορισμού σε γεωμετρία εμπρόσθιας όψης (Front-Face).
- Ο επόμενος στόχος ήταν η διαφοροποίηση και η κατηγοριοποίηση των διαθέσιμων δειγμάτων οίνου με βάση τη βοτανική τους προέλευση, το χρόνο και τον τρόπο ωρίμανσης. Για την επίτευξη αυτού του στόχου αναζητήθηκαν χημειομετρικές μέθοδοι οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν στην επεξεργασία και στην αξιοποίηση των φασματοσκοπικών δεδομένων. Προς αυτήν την κατεύθυνση δημιουργήθηκε κώδικας προγραμματισμού σε περιβάλλον Matlab μέσω του οποίου εφαρμόστηκαν οι χημειομετρικές μέθοδοι και παράλληλα χρησιμοποιήθηκαν έτοιμα λογισμικά πακέτα τα οποία προσέφεραν

παρόμοιες και πιο αναβαθμισμένες δυνατότητες χημειομετρικής ανάλυσης.

- Ο τελικός στόχος της διατριβής ήταν η συσχέτιση των φασματοσκοπικών δεδομένων με άλλες αναλυτικές τεχνικές. Πραγματοποιήθηκαν συσχετίσεις και δημιουργήθηκαν μοντέλα πρόβλεψης της φαινολικής σύστασης του οίνου, της συγκέντρωσης συγκεκριμένων φαινολικών ενώσεων, της βαθμολογίας σε γευσιγνωστικές δοκιμές, της ανθοκυανικής και της ταννινικής σύστασης του οίνου. Τέλος δημιουργήθηκε ένα μοντέλο πρόβλεψης του ποσοστού παρουσίας της κάθε ποικιλίας σε ένα μίγμα οίνου προερχόμενο από την ανάμιξη δύο ποικιλιών.

Βιβλιογραφία

1. M. De La Guardia and A. González (Eds), Food Protected Designation of Origin: Methodologies and Applications, *Comprehensive Analytical Chemistry*, **60**, Elsevier Science (2013)
2. L. Holmberg, Wine Fraud. *International Journal of Wine Research*. 2010, **2**, 105-113
3. I. S. Arvanitoyannis, M. N. Katsota, E. P. Psarra, E. H. Soufleros, S. Kallithraka, Application of quality control methods for accessing wine authenticity: Use of multivariate analysis (Chemometrics). *Trends in Food Science & Technology*. 1999, **10**, 321-336
4. C. Proestos, A. Bakogiannis, C. Psarianos, A.A. Koutinas, M. Kanellaki, M. Komaitis, High performance liquid chromatography analysis of phenolic substances in Greek wines,. *Food Control*. 2005, **16** (4), 319-323
5. J. Zhang, L. Li, N. Gao, D. Wang, Q. Gao, S. Jiang, Feature extraction and selection from volatile compounds for analytical classification of Chinese red wines from different varieties. *Analytica Chimica Acta*. 2010, **662**, 137-142
6. E. Marengo and A. Maurizio, Statistical investigation of the differences in the distribution of metals in Nebbiolo based wines. *Food Chemistry*. 2003, **81**, 621-630

7. A. González, A. Llorens, M.L. Cervera, S. Armenta, M. De La Guardia, Elemental fingerprint of wines from the protected designation of origin Valencia. *Food Chemistry*. 2009, **112**, 126-134
8. A. Jos, I. Moreno, A.G. González, G. Repetto, A.M. Cameán, Differentiation of sparkling wines (cava and champagne) according to their mineral content. *Talanta*. 2004, **63**, 377-382
9. M. Anastasiadi, A. Zira, P. Magiatis, S.A. Haroutounian, A.L. Skaltsounis, E. Mikros, ¹H NMR-Based Metabonomics for the classification of Greek Wines According to Variety, Region and Vintage.Comparison with HPLC Data. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009, **57**, 11067-11074
10. D. Cozzolino, W.U. Cynkar, N. Shah, R.G. Damberg, P. A. Smith, A brief introduction to multivariate methods in grape and wine analysis. *International Journal of Wine Research*. 2009, **1**, 123-130
11. C. Martin, J. Bruneel, F. Guyon, B. Médina, M. Jourdes, P. Teissedre, F.Guillaume, Raman Spectroscopy of white wines. *Food Chemistry*. 2015, **181**, 235-240
12. S. Moncayo, J.D. Rosales, R. Izquierdo-Hornillos, J. Anzano, J.O. Caceres, Classification of red wine based on its protected designation of origin (PDO) using Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS). *Talanta*. 2016, **158**, 185-191
13. U. Roessner, A. Nahid, B. Chapman, A. Hunter, M. Bellgard, Metabolomics-The combination of Analytical Biochemistry, Biology and Informatics. *Academic Press*. 2011, 447-459
14. S. Esslinger, J. Riedl, C. Fahl-Hassek, Potential and limitations of non targeted fingerprinting for authentication of food in official control. *Food Research International*. 2014, **60**, 189-204
15. K.R. Beebe and M.B. Seasholtz, Chemometrics: A practical Guide. Wiley (1998)
16. R.Bro and A.K. Smilde, Principal component analysis. *Analytical Methods*. 2014, **6**(9), 2812-2831
17. L.D. Massart, Hierarchical Cluster Analysis. Interpretation of Analytical Chemical Data by the Use of Cluster Analysis. Wiley (1983)

18. S. Wold, M. Sjöström, L. Eriksson, PLS-Regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 2001, **58**, 109-130
19. T. Hastie, R. Tibshirani, J. Friedman, The elements of statistical learning: Data mining, Inference and Prediction - Second Edition. Springer, (2009)
20. R. Bro, Parafac: Tutorial and applications. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 1997, **38**, 149-171
21. D. Ballabio and V. Consonni, Classification tools in chemistry. Part 1: linear models. PLS-DA. *Analytical Methods*. 2013, **5**, 3790-3798
22. D. Cozzolino, H.E. Smyth, M. Gishen, Feasibility study on the use of visible and Near-Infrared Spectroscopy together with Chemometrics to discriminate between commercial white wines of different varietal origins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2003, **51**, 7703-7708
23. R. Riovanto, W. U. Cynkar, P. Berzaghi, D. Cozzolino, Discrimination between Shiraz Wines from different Australian regions: The role of Spectroscopy and Chemometrics. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2011, **59**, 10356-10360
24. M. Urbano, M.D.L. De Castro, P.M. Pérez, J. García-Olmo, M.A. Gomez-Nieto, Ultraviolet-visible spectroscopy and pattern recognition methods for differentiation and classification of wines. *Food Chemistry*. 2005, **97**, 1, 166-175
25. I. Sen and F. Tokatli, Differentiation of wines with the use of combined data of UV-Visible spectra and color characteristics. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2016, **45**, 101-107
26. A.C. Pereira, M.S. Reis, P.M. Saraiva, J.C. Marques, Development of a fast and reliable method for long- and short-term wine age prediction. *Talanta*. 2011, **86**, 293-304
27. D. Airado-Rodríguez, T. Galeano-Díaz, I. Durán Merás, J.P. Wold, Usefulness of Fluorescence Excitation-Emission Matrices in Combination with PARAFAC, as Fingerprints of Red Wines. *J. Agric. Food Chem*. 2009, **57**, 1711-1720
28. D. Cozzolino, H.E. Smyth, K.A. Lattey, W. Cynkar, L. Janik, R.G. Damberg, I.L. Francis, M. Gishen, Relationship between sensory analysis and near infrared

spectroscopy in Australian Riesling and Chardonnay wines. *Analytica Chimica Acta*. 2005, **539**, 341-348

29. LAMBDA 950 UV/Vis/NIR Spectrophotometer. [Online] PerkinElmer.
<http://www.perkinelmer.com/product/lambda-950-uv-vis-nir-spectrophotometer-1950>.

30. Fluoromax Series. [Online] Horiba Scientific.
<http://www.horiba.com/scientific/products/fluorescence-spectroscopy/steady-state/fluoromax/fluoromax-series-524/>.

31. The Unscrambler® X version 10.4. [Online] Camo.
<http://www.camo.com/rt/Products/Unscrambler/unscrambler.html>.

32. PLS_Toolbox. [Online] Eigenvector Research Incorporated.
http://www.eigenvector.com/software/pls_toolbox.htm.

33. JEFFCO BevScan Model BS01 Beverage Analyser. [Online] JEFFRESS Engineering. http://www.jeffress.com.au/products_bs01.htm.

34. C. Gomez-Cordoves and M.L. Gonzalez-SanJose, Interpretation of Color Variables during the Aging of Red Wines: Relationship with Families of Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1995,**43**, 3, 557-561

35. J. Robichaud, and A. Noble, Astringency and Bitterness of Selected Phenolics in Wine. *Journal of Science and Food Agriculture*. 1990, **53**, 343-353

36. B. German, and R. Walzem, The health benefits of wine. *Annual Review of Nutrition*. 2003, **20**, 561-593

37. Old wine - Evaluation and Optimization of the quality factors during wine maturation produced from Cretan red and white grape varieties .[Online]
<http://eilotas.chemistry.uoc.gr/oldwine/index.php/>

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Οίνος

2.1 Ιστορικά Στοιχεία και Οίνος

Ο οίνος είναι αλκοολικό ποτό, προϊόν ζύμωσης των σταφυλιών ή του χυμού τους (μούστος). Η απαρχή της καλλιέργειας του είδους *άμπελος η οινοφόρος Vitis-vinifera* ξεκίνησε πριν περίπου 7000 χρόνια στη γεωγραφική περιοχή που ορίζεται από τον Εύξεινο πόντο, την Κασπία θάλασσα και τη Μεσοποταμία. Η αμπελουργία, η οινολογία, το εμπόριο του οίνου, οι τελετουργίες οι οποίες σχετίζονται με τον οίνο και ο τρόπος κατανάλωσης του, εξελίχθησαν από πολλούς πολιτισμούς, μεταξύ αυτών και τους αρχαίους Έλληνες (**Εικόνα 2.1**).



Εικόνα 2.1. Ευρήματα από την ενασχόληση των αρχαίων με την παραγωγή Οίνου α) Τρύγος-Αττικό αγγείο 6^{ος} αιώνας (π.Χ.) β) Πατητήρι στο Βαθύπετρο Αρχανών 15^{ος} αιώνας (π.Χ.)

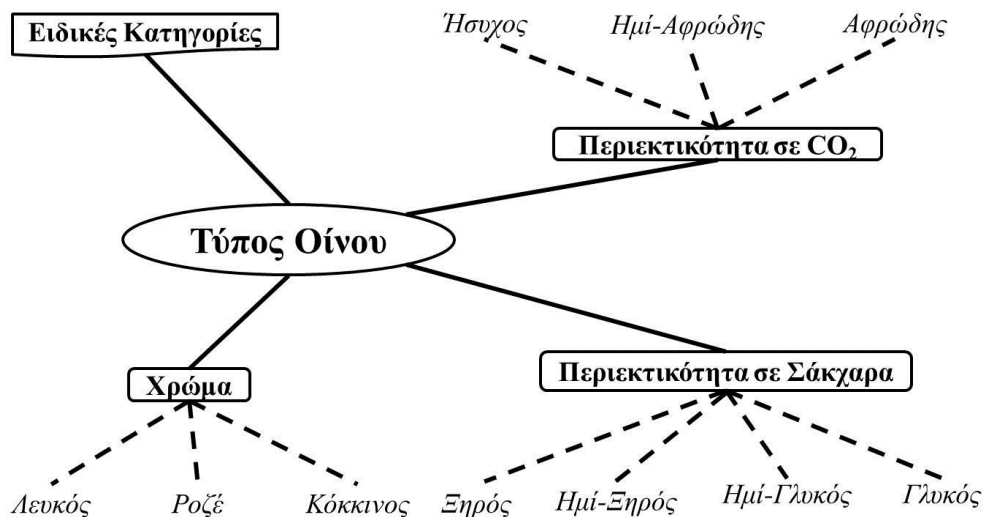
Οι τελευταίοι συνήθιζαν να καταναλώνουν το κρασί αραιωμένο με νερό, σε αναλογία 1:3 (οίνος/νερό). Ήδη από τα αρχαία χρόνια, είχε θεσπιστεί ειδική νομοθεσία σχετικά με την εξασφάλιση της ποιότητας και το εμπόριο του οίνου [1]. Κατά τη διάρκεια των αιώνων η οίνο-παραγωγική διαδικασία πέρασε αρκετές φάσεις ακμής και παρακμής, ενώ από τον 16^ο αιώνα και μετά η παραγωγή κρασιού

εξαπλώθηκε προς τη δύση. Εμφανίζονται νέες τεχνικές ωρίμανσης σε ξύλινα βαρέλια, αλλά και περαιτέρω παλαιώσης με τη χρήση γυάλινης φιάλης και φελλού.

Στις μέρες μας, οι παλαιές τέχνες της αμπελουργίας και της οιολογίας βασίζονται πλέον σε τεχνολογικές και επιστημονικές έρευνες με σκοπό τη βελτιστοποίηση της ποιότητας του οίνου. Η γεωγραφική εξάπλωση των οίνο-παραγωγικών περιοχών είναι παγκόσμια, χιλιάδες ποικιλίες αμπέλου καλλιεργούνται σε όλο τον κόσμο δίνοντας οίνους με στοιχεία από το κλίμα, το έδαφος και την κουλτούρα του εκάστοτε τόπου. Με την παγκόσμια αυτή εξάπλωση της παραγωγής, αναπτύχθηκε η διαφοροποίηση στα λεγόμενα κρασιά του *Παλαιού* και *Νέου κόσμου*. Τα πρώτα καλλιεργούνται στην Ευρωπαϊκή ήπειρο, η οποία παραδοσιακά κατέχει την πρώτη θέση στην παγκόσμια παραγωγή, ενώ τα δεύτερα καλλιεργούνται σε άλλες περιοχές της υφελίου με ένα πιο ελαστικό πλαίσιο όσον αφορά στην οινοποιητική τους διαδικασία και τη νομοθεσία σχετικά με την προέλευση τους.

2.2 Τύποι και Κατηγορίες Οίνων

Οι κύριοι τύποι οίνου (**Εικόνα 2.2**) καθορίζονται με βάση το χρώμα, την περιεκτικότητα σε σάκχαρα και την περιεκτικότητα σε CO₂.



Εικόνα 2.2. Διαγραμματική αναπαράσταση της διάκρισης του οίνου με βάση το χρώμα, την περιεκτικότητα σε σάκχαρα και την περιεκτικότητα σε CO₂ καθώς και ειδικές Κατηγορίες οίνου

Το χρώμα του οίνου δεν ταυτίζεται απαραίτητα με το χρώμα των σταφυλιών, εξαρτάται από το αν και κατά πόσο συμμετέχουν ή όχι τα στερεά μέρη του σταφυλιού στη διαδικασία της ζύμωσης, δίνοντας κόκκινους, ροζέ και λευκούς οίνους. Με βάση την περιεκτικότητα σε σάκχαρα, οι οίνοι κατατάσσονται σε ξηρούς, ημίξηρους, ημίγλυκους και γλυκούς. Με βάση την περιεκτικότητα σε CO₂ διακρίνουμε οίνους ήσυχους, ημιαφρώδεις και αφρώδεις. Η γαλλική σαμπάνια θεωρείται από τους πιο εκλεκτούς εκπρόσωπους της κατηγορίας του αφρώδους οίνου.

Πέραν των κύριων τύπων οίνου, υπάρχουν και αρκετές ειδικές κατηγορίες όπως οι ενισχυμένοι οίνοι, οι οποίοι έχουν υποβληθεί σε ειδική επεξεργασία με σκοπό την αύξηση του αλκοολικού τους βαθμού. Τα φημισμένα πορτογαλικά κρασιά port wines θεωρούνται από τους πιο εκλεκτούς εκπρόσωπους αυτής της κατηγορίας. Μία άλλη ειδική κατηγορία κρασιού είναι η *ρετσίνα*, ένα καθαρά Ελληνικό προϊόν με ιστορία 2000 ετών. Η ρετσίνα είναι ένας λευκός οίνος ο οποίος παρασκευάζεται με την προσθήκη φυσικής ρητίνης πεύκου η οποία προσδίδει στον οίνο μία πολύ ιδιαίτερη γεύση και άρωμα, ενώ ακόμη και σήμερα θεωρείται ένα από τα δημοφιλέστερα ελληνικά προϊόντα. Προέρχεται από μία πρακτική των αρχαίων να σφραγίζουν τους αμφορείς με ρετσίνα από πεύκα με σκοπό την καλύτερη συντήρηση του οίνου.

Περαιτέρω κατηγοριοποίηση του οίνου γίνεται με βάση την ποικιλία αμπέλου από την οποία προήλθε, τη γεωγραφική του προέλευση και την αμπελουργική και την οινοποιητική διαδικασία η οποία επιλέχθηκε. Διεθνείς οργανισμοί όπως η Ευρωπαϊκή Ένωση έχουν θεσπίσει ειδικούς κανονισμούς σχετικά με αυτήν την κατηγοριοποίηση. Κύριος στόχος των κανονισμών είναι η προστασία τόσο των καταναλωτών όσο και των παραγωγών εξασφαλίζοντας την ταυτότητα και την αυθεντικότητα του κάθε προϊόντος [2]. Η Ελλάδα ως χώρα μέλος της Ευρωπαϊκής Ένωσης ταυτίζεται με τις οδηγίες που προέρχονται από την κοινή ευρωπαϊκή πολιτική και έτσι διακρίνονται i) *Οίνοι με Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης ΠΟΠ*, στην κατηγορία αυτή εμπεριέχονται οι παλαιότερες ταξινομήσεις ΟΠΑΠ και ΟΠΕ του διεθνούς οργανισμού Οίνου (ΟΙΒ) ii) *Οίνοι Προστατευόμενης Γεωγραφικής Ένδειξης ΠΓΕ* στην οποία εμπεριέχονται οι παλαιότερες ταξινομήσεις τοπικών οίνων και οίνων ονομασίας κατά παράδοση. Προσφάτως δημιουργήθηκε η κατηγορία *Ποικιλιακοί Οίνοι*. Η δημιουργία αυτής της κατηγορίας έχει ως σκοπό να ενισχύσει τον ανταγωνισμό ως προς οίνους από το *Νέο Κόσμο* των οποίων οι ετικέτες παρέχουν πληροφορίες για την ποικιλία και

τη σοδειά, αλλά δεν αναφέρουν τη γεωγραφική τους προέλευση. Στον **Πίνακα 2.1** απεικονίζονται αναλυτικά όλες οι κατηγορίες οίνου. Σημειώνεται ότι το μεγαλύτερο μερίδιο της Ελληνικής αγοράς κατέχουν οι Επιτραπέζιοι Οίνοι για τους οποίους επικρατεί ένα πιο χαλαρό πλαίσιο ελέγχου, σχετικά με τα ποιοτικά τους χαρακτηριστικά [3].

Πίνακας 2.1. Κατηγορίες Οίνου με βάση τα Ευρωπαϊκά κριτήρια ταξινόμησης

Κατηγορίες Οίνου	Παλαιότερη Ταξινόμηση	Βασικά Κριτήρια Ταξινόμησης
Π.Ο.Π	- ΟΠΑΠ - ΟΠΕ	- Η ποιότητα και τα χαρακτηριστικά του Οίνου είναι αποτέλεσμα των φυσικών και ανθρώπινων πόρων της συγκεκριμένης γεωγραφικής περιοχής. - Όλα τα στάδια της παραγωγής από την καλλιέργεια των σταφυλιών έως την οινοποίηση έχουν λάβει χώρα στη συγκεκριμένη γεωγραφική περιοχή. - Χρησιμοποιούνται μόνο γηγενείς ποικιλίες αμπέλου, οι οποίες ανήκουν στο είδος <i>Vitis-Vinifera</i> . - Η ποιότητα και τα χαρακτηριστικά τους είναι αποτέλεσμα της γεωγραφικής τους προέλευσης.
Π.Γ.Ε	- Τοπικοί Οίνοι	- Η παραγωγή γίνεται στη συγκεκριμένη γεωγραφική περιοχή. - Τουλάχιστον το 85 % των σταφυλιών που συμμετέχουν στην οινοποίηση προέρχεται από τη συγκεκριμένη γεωγραφική περιοχή και οι ποικιλίες πρέπει να ανήκουν στο γένος <i>Vitis</i> .
Ποικιλιακοί Οίνοι	-	- Στην ετικέτα τους αναφέρουν την ποικιλία, τη σοδειά, αλλά όχι τη γεωγραφική τους προέλευση.
Ονομασία Παράδοσης	- Ονομασία Παράδοσης	- Πολύ συγκεκριμένοι κανόνες όσον αφορά την αμπελοργία και την οινοποίηση τους.

2.3 Ελληνικός και Κρητικός Αμπελώνας

Η Ελληνική παραγωγή οίνου κυμαίνεται στο 1% της παγκόσμιας παραγωγής [4], ενώ στους Ελληνικούς αμπελώνες καλλιεργούνται τόσο διεθνείς όσο και γηγενείς ποικιλίες. Αρκετές ποικιλίες έχουν υποτιμηθεί και κινδυνεύουν με αφανισμό αλλά είναι ενθαρρυντικό ότι αυξανόμενος αριθμός οινολόγων και οινοποιών επενδύουν στη

διατήρηση και ανάπτυξη τους. Οι γηγενείς ποικιλίες αριθμούν γύρω στις διακόσιες (200), ενώ είναι σύνηθες το φαινόμενο η ονομασία μίας ποικιλίας να αλλάζει από τόπο σε τόπο. Μόνο πενήντα (50) από αυτές χρησιμοποιούνται συστηματικά για παραγωγή οίνου, ενώ λιγότερες από τριάντα (30) έχουν αποκτήσει παγκόσμια φήμη [5]. Κάποιες από αυτές είναι οι λευκές *Αθήρι*, *Ασύρτικο*, *Βηλάνα*, *Ντεμπίνα*, *Μαλαγουζιά*, *Μοσχάτο*, *Ρόμπολα*, *Σαββατιανό* και οι ερυθρές *Αγιωργήτικο*, *Κοτσιφάλι*, *Μανδηλαριά*, *Λιάτικο*, *Λημνιό*, *Μαυροδάφνη*, *Ξινόμαυρο*. Από τις διεθνείς ποικιλίες οι πιο συνηθισμένες οι οποίες καλλιεργούνται στον Ελληνικό αμπελώνα είναι οι λευκές *Chardonnay*, *Sauvignon Blanc*, *Sémillon* και οι ερυθρές *Cabernet Sauvignon*, *Grenache Rouge*, *Merlot*, *Syrah*.



Εικόνα 2.3. Χαρακτηριστική εικόνα Κρητικού αμπελώνα

Παράγοντες όπως το κλίμα, το ανάγλυφο και το έδαφος είναι ιδιαίτερα καθοριστικοί για την καλλιέργεια και την εξέλιξη μίας ποικιλίας. Το κλίμα της Ελλάδας είναι κυρίως μεσογειακό με δύο κύριες περιόδους i) μία μεγάλης διάρκειας ζεστή και ξηρή και ii) μία μικρότερης διάρκειας ψυχρή και υγρή. Πρέπει να σημειωθεί ότι υπάρχουν διαφοροποιήσεις με το χρόνο, ενώ υπάρχουν περιοχές της χώρας οι οποίες αποκλίνουν από αυτό το μοντέλο, εμφανίζοντας ένα περισσότερο ηπειρωτικό παρά μεσογειακό κλίμα. Το ανάγλυφο της Ελλάδας χαρακτηρίζεται από έντονη ποικιλομορφία με ορεινούς όγκους, πεδιάδες και παραθαλάσσιες περιοχές. Τα Ελληνικά εδάφη είναι ασβεστούχα, αργιλικά, αμμώδη και ηφαιστειακά, ενώ τα περισσότερα από αυτά χαρακτηρίζονται από ξηρότητα και απουσία θρεπτικών συστατικών. Η ποικιλομορφία κλίματος, καιρού, ανάγλυφου και εδάφους δύναται να δώσει τελείως διαφορετικούς οίνους από περιοχή σε περιοχή και από τρύγο σε τρύγο.

Πίνακα 2.2. Γηγενείς ποικιλίες οι οποίες καλλιεργούνται στην Κρήτη και τυπικά χαρακτηριστικά των παραγόμενων Οίνων

Ποικιλία	Τύπος και Χαρακτηριστικά παραγόμενων Οίνων
ΒΗΛΑΝΑ	<ul style="list-style-type: none"> - Οίνος λευκός με άρωμα φρούτων. - Μεσαίου αλκοολικού βαθμού και οξύτητας. - Δεν ενδείκνυται για παλαίωση. - Η πιο διαδεδομένη ποικιλία παραγωγής λευκού οίνου στην Κρήτη. - Συμμετέχει ποσοστιαία στους Οίνους ΠΟΠ (Πεζά 100%, Σητεία 70% και Χάνδακα-Κάντια 85%).
ΔΑΦΝΙ	<ul style="list-style-type: none"> - Οίνος λευκός ξηρός με βοτανικό χαρακτήρα. - Μεσαίου αλκοολικού βαθμού και οξύτητας. - Διαθέτει δυναμικό παλαίωσης. - Ελάχιστα διαδεδομένη, ενώ η οινοποίηση της έχει ξεκινήσει μόλις τα τελευταία χρόνια.
ΚΟΤΣΙΦΑΛΙ	<ul style="list-style-type: none"> - Οίνος ροζέ ή κόκκινος ασταθούς χρώματος. - Υψηλού αλκοολικού βαθμού και χαμηλής οξύτητας. - Μαζί με το Μαντηλάρι των οποίων η συν-οινοποίηση είναι πολύ συνηθισμένη, αποτελούν τις πιο διαδεδομένες ποικιλίες παραγωγής ερυθρού οίνου στην Κρήτη. - Συμμετέχει ποσοστιαία στους Οίνους ΠΟΠ (Πεζά 70% , Αρχάνες 70%, και Χάνδακα-Κάντια 70%).
ΜΑΝΤΗΛΑΡΙ ή ΜΑΝΔΗΛΑΡΙΑ	<ul style="list-style-type: none"> - Οίνος με πολύ βαθύ κόκκινο χρώμα. - Υψηλή οξύτητα, χαμηλό αλκοολικό βαθμό και έντονες ταννίνες. - Μαζί με το Κοτσιφάλι των οποίων η συν-οινοποίηση είναι πολύ συνηθισμένη, αποτελούν τις πιο διαδεδομένες ποικιλίες παραγωγής ερυθρού οίνου στην Κρήτη. - Συμμετέχει ποσοστιαία στους Οίνους ΠΟΠ (Πεζά 30% , Αρχάνες 30%, και Χάνδακα-Κάντια 30%).

Η Κρήτη με μακράιωνη παράδοση στην παραγωγή οίνου, συμβάλλει στο 20% της Ελληνικής παραγωγής με μια μέση ποσότητα η οποία εκτιμάται γύρω στα 90 εκατομμύρια λίτρα τον χρόνο [6]. Οι Κρητικοί αμπελώνες είναι παρόντες σε όλο το νησί με πιο έντονη παρουσία στο βόρειο και κεντρικό του τμήμα. Περιοχές του νομού Ηρακλείου όπως οι Αρχάνες, οι Δαφνές και τα Πεζά, αλλά και του νομού Λασιθίου όπως η Σητεία, φημίζονται για τους αμπελώνες τους, παράγοντας οίνους με

προστατευόμενη ονομασία προέλευσης. Στην Κρήτη καλλιεργούνται τόσο γηγενείς όσο και διεθνείς ποικιλίες. Στον **Πίνακα 2.2** απεικονίζονται τέσσερις γηγενείς ποικιλίες, με πληροφορίες για τον τύπο και τα χαρακτηριστικά του οίνου, ο οποίος προκύπτει από την οινοποίηση τους. Άλλες Ελληνικές ποικιλίες οι οποίες καλλιεργούνται στην Κρήτη είναι το *Αγιωργήτικο*, το *Αηδάνι*, το *Αθήρι*, το *Βιδιανό*, το *Λημιό*, η *Μαυροδάφνη*, το *Μοσχάτο*, το *Πλυτό*, το *Ρωμέϊκο* και το *Φωκιανό*, καθώς και οι διεθνείς *Sauvignon blanc*, *Cabernet Sauvignon*, *Grenache Rouge*, *Merlot* και *Syrah*.

2.4 Χημική Σύσταση

Η χημική σύσταση του οίνου εξαρτάται από τα σταφύλια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για οινοποίηση, την οινοποιητική διαδικασία η οποία επιλέχθηκε, τις οινολογικές διεργασίες οι οποίες ακολουθήθηκαν (συμπεριλαμβανομένης της παλαίωσης), καθώς και τις συνθήκες αποθήκευσης της φιάλης μέχρι την τελική κατανάλωση του. Από καθαρά χημικής απόψεως, ο οίνος είναι ένα όξινο υδατικό-αλκοολικό διάλυμα με τιμές pH στην περιοχή 2.8 – 4, αποτελούμενο από πληθώρα οργανικών και ανόργανων συστατικών. Το νερό κυριαρχεί με περιεκτικότητα από 80-85 (v/v) %, ακολουθεί η αιθανόλη με την περιεκτικότητα της να κυμαίνεται από 10-15 (v/v) %, ενώ το τρίτο σε συγκέντρωση χημικό συστατικό είναι η γλυκερόλη. Ο συνολικός αριθμός των χημικών συστατικών που εμπεριέχονται υπερβαίνει τα 1000 με κατηγορίες και οικογένειες ενώσεων όπως **Σάκχαρα**, **Αλκοόλες**, **Οργανικά Οξέα**, **Ανόργανα Συστατικά**, **Αζωτούχες Ενώσεις**, **Πτητικά Συστατικά** και **Φαινολικές Ενώσεις** να συνθέτουν το πολύπλοκο αυτό μίγμα.

2.4.1 Σάκχαρα

Τα σάκχαρα, τα οποία δημιουργούνται στους κλώνους του σταφυλιού μέσω της διεργασίας της φωτοσύνθεσης, χημική αντίδραση (1), αποτελούν τις πρόδρομες ενώσεις στις οποίες βασίζεται ολόκληρη η οινοποιητική διαδικασία. Η βασική βιοχημική διεργασία που λαμβάνει χώρα κατά την παραγωγή οίνου είναι η αλκοολική ζύμωση, χημική αντίδραση (2), κατά την οποία τα σάκχαρα του χυμού των σταφυλιών μετατρέπονται σε αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα.



Τα σάκχαρα τα οποία συμμετέχουν στην αλκοολική ζύμωση είναι η γλυκόζη και η φρουκτόζη. Μετά την αλκοολική ζύμωση, η υπολειμματική συγκέντρωση αυτών αλλά και άλλων σακχάρων, καθορίζουν τον χαρακτηρισμό ενός οίνου ως ξηρό (<2 g/L), ημίξηρο (2-18 g/L), ημίγλυκο (18-40 g/L) ή γλυκό (>40 g/L). Σημαντικά παράγωγα των σακχάρων είναι οι γλυκοζίδες, οι οποίοι ενώνονται με άγλυκα τμήματα άλλων ενώσεων όπως π.χ. οι ανθοκυανιδίνες, μεταβάλλοντας τη χημεία τους [7].

2.4.2 Αλκοόλες

Ο οίνος θεωρείται ύδρο-αλκοολικό διάλυμα με δύο από τα κυρίαρχα χημικά του συστατικά την αιθανόλη και τη γλυκερόλη να ανήκουν στην κατηγορία των αλκοολών (**Εικόνα 2.4**). Η γλυκερόλη η οποία ανήκει στην κατηγορία των πολύ-αλκοολών αποτελεί παρά-προϊόν της αλκοολικής ζύμωσης και η συγκέντρωσή της κυμαίνεται από 5-20 g/L [8].



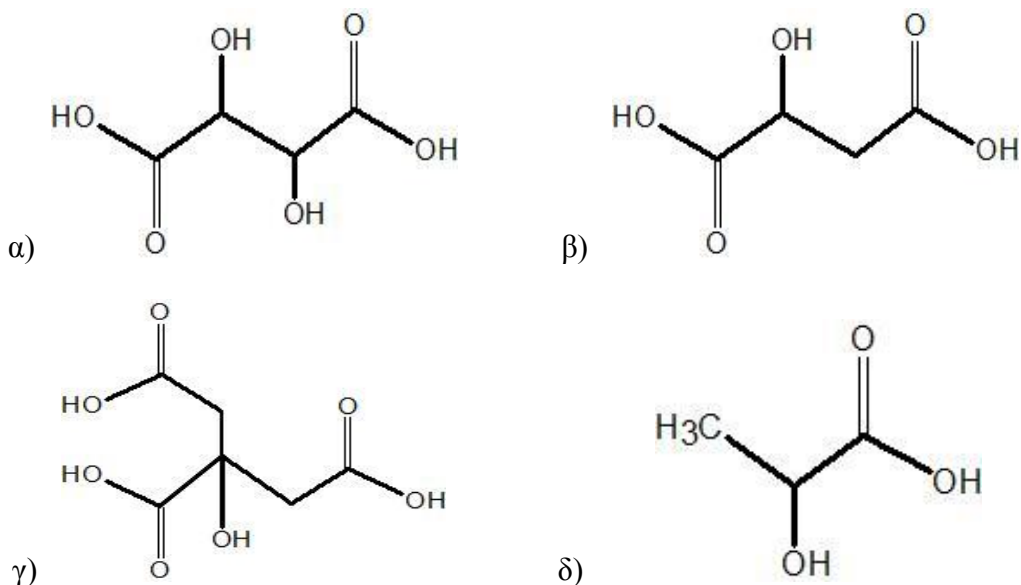
Εικόνα 2.4. Οι δύο κύριες αλκοολικές ενώσεις του Οίνου α) Αιθανόλη β) Γλυκερόλη

Από πλευράς γευσιγνωσίας οίνοι με υψηλό αλκοολικό βαθμό και υψηλή συγκέντρωση γλυκερόλης, χαρακτηρίζονται ως οίνοι με γεμάτο σώμα και αυξημένη γλυκύτητα. Άλλες μικρότερης συγκέντρωσης αλκοόλες, είναι η 1-προπανάλη, η 2-προπανόλη, η ίσο-βουτανόλη, η 2-μεθυλο-2-προπανόλη, η ίσο-άμυλο-αλκοόλη κ.ά.. Κάποιες από αυτές προσδίδουν στον οίνο ιδιαίτερα αρωματικά χαρακτηριστικά.

2.4.3 Οργανικά Οξέα

Η παρουσία των οργανικών οξέων σχετίζεται με την οξύτητα, η οποία και ενισχύει τη φυσικοχημική και μικροβιολογική σταθερότητα του οίνου, προσδίδοντας του ένα υψηλό δυναμικό παλαίωσης. Η χημική δομή κάποιων από τα κύρια οργανικά οξέα τα οποία εμπεριέχονται στον οίνο, φαίνεται στην **Εικόνα 2.5**. Τα οργανικά οξέα έχουν διπλή προέλευση, κάποια προ-υπάρχουν στα σταφύλια και μεταφέρονται στον οίνο (όπως το τρυγικό, το μηλικό και το κιτρικό οξύ), ενώ άλλα δημιουργούνται μέσω βιοχημικών διεργασιών κατά τη διάρκεια της οινοποίησης. Για παράδειγμα, η μηλογαλακτική ζύμωση, μία βίο-χημική διεργασία η οποία ακολουθεί την αλκοολική

ζύμωση και είναι επιθυμητή στην οινοποίηση κυρίως ερυθρών ποικιλιών, μετατρέπει το μηλικό σε γαλακτικό οξύ, προσδίδοντας στον οίνο ηπιότερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά.



Εικόνα 2.5. Οργανικά Οξέα Οίνου α) Τρυγικό Οξύ β) Μηλικό Οξύ γ) Κιτρικό Οξύ δ) Γαλακτικό Οξύ

Κατά την οργανοληπτική εξέταση αναγνωρίζονται διαφορετικοί τύποι οξύτητας, έτσι για την πλήρη περιγραφή αυτής της ιδιότητας, χρησιμοποιούνται ταυτόχρονα η ολική οξύτητα ή αλλιώς ογκομετρούμενη οξύτητα η οποία συνδέεται με το σύνολο των οξέων του οίνου, το pH το οποίο δείχνει τη δραστικότητα των οξέων και την πτητική οξύτητα η οποία συνδέεται με τη συγκέντρωση του οξικού οξέος (αυξημένη πτητική οξύτητα θεωρείται ελάττωμα). Σε γενικές γραμμές, ο οίνος θεωρείται μίγμα ασθενών οξέων, τα οποία συν τοις άλλοις συμμετέχουν σε χημικές αντιδράσεις με ανόργανα συστατικά σχηματίζοντας άλατα, προσδίδοντας σε αυτόν οξεό-βασικές ιδιότητες ρυθμιστικού διαλύματος [9].

2.4.4 Ανόργανα Συστατικά

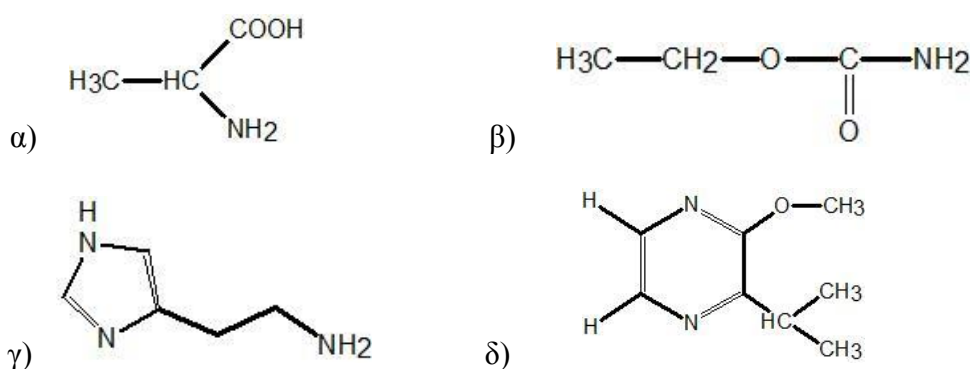
Μεταλλικά ή μη μεταλλικά στοιχεία, ανιόντα, κατιόντα και ελεύθερες ρίζες συνιστούν το σύνολο των ανόργανων συστατικών του οίνου. Η προέλευση τους μπορεί να είναι καθαρά αμπελουργική εξαρτώμενη από παράγοντες όπως το έδαφος, το κλίμα, η ποικιλία και οι τρόποι καλλιέργειας αλλά και οινολογική εξαρτώμενη από διαδικασίες οινοποίησης και τρόπους παλαίωσης του οίνου [10]. Ιδιαίτερο

ενδιαφέρον υπάρχει για τα μεταλλικά στοιχεία, τα οποία και συναντώνται με μορφή κατιόντων.

Το κάλιο κυριαρχεί σε συγκεντρώσεις τουλάχιστον μίας τάξης μεγέθους πάνω από τα υπόλοιπα, ενώ ακολουθούν στοιχεία όπως το ασβέστιο, το νάτριο και το μαγνήσιο σε συγκεντρώσεις 10-10³ μg/L. Άλλα στοιχεία όπως το αλουμίνιο, ο σίδηρος, ο χαλκός και το μαγγάνιο εντοπίζονται σε ακόμη χαμηλότερες συγκεντρώσεις [11]. Τα άκρως επικίνδυνα για την ανθρώπινη υγεία βαρέα μέταλλα αρσενικό, κάδμιο, υδράργυρος, μόλυβδος και ψευδάργυρος εντοπίζονται ως ιχνοστοιχεία σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Η νομοθεσία ορίζει ανώτατες τιμές συγκέντρωσης και ως εκ τούτου υπέρβαση των ορίων καθιστά τον οίνο ακατάλληλο προς κατανάλωση.

2.4.5 Αζωτούχες Ενώσεις

Το άζωτο ένα από τα πιο αδρανή χημικά στοιχεία στην φύση, εντοπίζεται στον οίνο σε επίπεδα συγκέντρωσης της τάξεως των μερικών εκατοντάδων mg/L. Η προέλευση του από τα στερεά μέρη του σταφυλιού και η συμμετοχή των στερεών μερών στην ερυθρή οινοποίηση εξηγεί τη μεγαλύτερη συγκέντρωση αζώτου στο κόκκινο κρασί. Το άζωτο συναντάται σε διάφορα χημικά είδη σε οργανική αλλά και σε ανόργανη μορφή [12]. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχουν οι οργανικές του μορφές οι οποίες και τελικά επικρατούν κατά την οινοποίηση. Οι κυριότερες από αυτές είναι τα αμινοξέα, τα αμίδια, οι βιογενείς αμίνες και οι πυραζίνες. Στην **Εικόνα 2.6** απεικονίζονται χαρακτηριστικές ενώσεις αυτών των μορφών.



Εικόνα 2.6. Αζωτούχες ενώσεις στον οίνο α) Αλανίνη β) Καρβαμιδικός Αιθυλεστέρας γ) Ισταμίνη δ) Μέθοξυ-ίσο-προ-Πυραζίνη

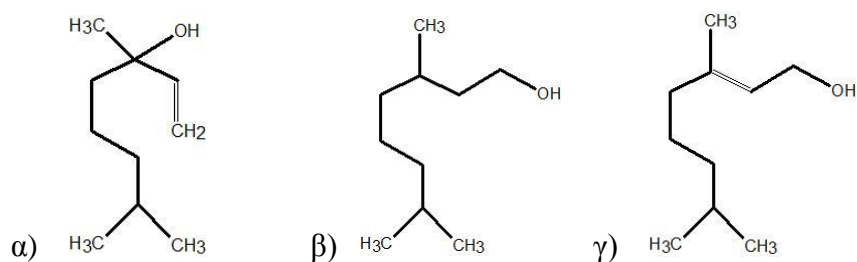
Η παρουσία αμιδίων και βιογενών αμινών ελέγχεται εξαιτίας των βλαβερών τους επιδράσεων στην ανθρώπινη υγεία. Οι πυραζίνες θεωρείται ότι συνεισφέρουν στο άρωμα του οίνου, ενώ από τη συνένωση των αμινοξέων σχηματίζονται μεγαλύτερου μεγέθους μόρια, τα οποία και δομούν τις διάφορες πρωτεΐνες οι οποίες εμπεριέχονται στον οίνο.

2.4.6 Πτητικά Συστατικά

Η οσμή ενός οίνου είναι αποτέλεσμα του συνδυασμού πολλών αρωμάτων, προερχόμενα από εκατοντάδες πτητικά συστατικά, με συγκεντρώσεις από λίγα ng/L έως και κάποια mg/L. Πολλές φορές η συνεισφορά ενός πτητικού συστατικού με ελάχιστη συγκέντρωση μπορεί να είναι μεγαλύτερη από τη συνεισφορά ενός άλλου πτητικού συστατικού μεγαλύτερης συγκέντρωσης. Για το χαρακτηρισμό ενός πτητικού συστατικού του οίνου, διακρίνουμε την οριακή συγκέντρωση πάνω από την οποία αντιλαμβανόμαστε την παρουσία του, την οριακή συγκέντρωση για την πλήρη αναγνώριση του (κατώφλι αντίληψης) και την ανώτατη συγκέντρωση πάνω από την οποία η οσμή του παύει να είναι ευχάριστη [13].

Η προέλευση των πτητικών συστατικών χαρακτηρίζεται ως πρωτογενής, δευτερογενής και τριτογενής. Η πρωτογενής προέλευση σχετίζεται με τα πτητικά συστατικά τα οποία προ-υπάρχουν στην ποικιλία του σταφυλιού αλλά και με συστατικά τα οποία δημιουργούνται κατά τη διάρκεια χημικών και βιοχημικών διεργασιών οι οποίες λαμβάνουν χώρα πριν την αλκοολική ζύμωση. Η δευτερογενής προέλευση συνδέεται με παραπροϊόντα της αλκοολικής και της μηλογαλακτικής ζύμωσης, ενώ η τριτογενής προέλευση σχετίζεται με διεργασίες οι οποίες λαμβάνουν χώρα κατά την παλαίωση του οίνου [14].

Διάφορες χημικές ενώσεις όπως αλκοόλες, οξέα, αλδεΐδες, εστέρες και κετόνες, συνιστούν το σύνολο των πτητικών συστατικών ενός οίνου. Τα πλέον μελετημένα πτητικά συστατικά είναι οι χημικές ενώσεις της οικογένειας των τερπενίων. Η χημική αυτή οικογένεια εντοπίζεται σε υψηλές συγκεντρώσεις σε αρωματικές ποικιλίες σταφυλιού, όπως η ποικιλία μοσχάτο, καθώς και στους οίνους οι οποίοι προκύπτουν από αυτές. Από τα πιο αρωματικά μόνο-τερπένια είναι οι αλκοόλες λιναλοόλη, κιτρονελλόλη και η γερανιόλη, η χημική δομή των οποίων απεικονίζονται στην (Εικόνα 2.7).



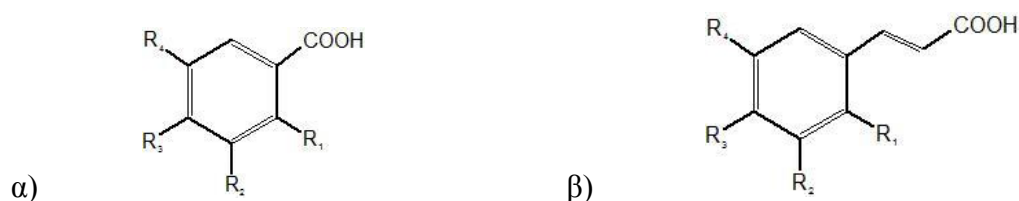
Εικόνα 2.7. Αλκοολικά μονοτερπένια α) Λιναλοόλη β) Κιτρονελλόλη γ) Γερανόλη.

2.4.7 Φαινολικές Ενώσεις

Οι Φαινολικές ενώσεις αποτελούν ίσως την πιο ενδιαφέρουσα κατηγορία. Οι ενώσεις αυτές είναι πολύ σημαντικές για την οινολογία, καθορίζουν ποιοτικά χαρακτηριστικά όπως το χρώμα και τη γεύση του οίνου [15,16], επιπρόσθετα φημίζονται για τη θετική τους επίδραση στην ανθρώπινη υγεία [17]. Προέρχονται από διάφορα μέρη του σταφυλιού, η δομή τους διαμορφώνεται κατά την οινοποίηση, ενώ η εξέλιξη τους εξαρτάται από την παλαίωση, διαδικασία μέσω της οποίας νέα είδη εμφανίζονται. Διακρίνονται οι εξής κατηγορίες τα **Φαινολικά οξέα**, τα **Φλαβονοειδή**, οι **Ανθοκυάνες** και οι **Ταννίνες**.

Φαινολικά Οξέα

Υπάρχουν δύο κατηγορίες φαινολικών οξέων ανάλογα με τη χημική τους δομή, τα βενζοϊκά και τα κινναμωμικά (**Εικόνα 2.8**).



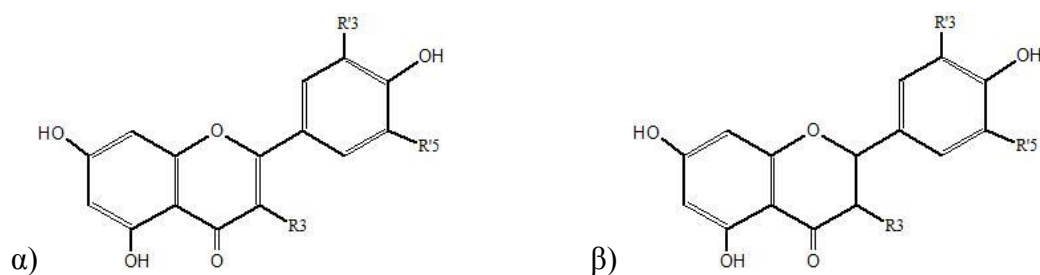
Εικόνα 2.8. Δομή Φαινολικών οξέων α) Βενζοϊκά, β) Κινναμωμικά, (R₁-R₄) (Μέθοξυ και Υδροξυ υποκαταστάτες)

Μέθοξυ και ύδροξυ υποκαταστάτες του βενζοϊκού δακτυλίου καθορίζουν την περαιτέρω ονομασία τους. Το γαλλικό, το βανιλικό, το φερουλλικό και το καφεϊκό οξύ, είναι από τα πιο συνηθισμένα φαινολικά οξέα με παρουσία τόσο σε λευκούς όσο και σε ερυθρούς οίνους, σε συγκεντρώσεις από μερικές δεκάδες έως και μερικές εκατοντάδες mg/L, αντίστοιχα. Τα φαινολικά οξέα εντοπίζονται ελεύθερα

μέσα στον οίνο, αλλά κυρίως συμμετέχουν σε χημικές αντιδράσεις σχηματίζοντας νέες μορφές όπως π.χ. το Καφταρικό οξύ. Στην ελεύθερη τους μορφή και στο ύδρο-αλκοολικό διάλυμα του κρασιού είναι άχρωμα, άοσμα και άγευστα. Οι νέες τους μορφές δύναται να διαθέτουν χρώμα, οσμή και γεύση. Η βανιλίνη μία ιδιαίτερα πτητική ένωση με ευχάριστη οσμή όταν οξειδωθεί δίνει βανιλλικό οξύ. Άλλα παραδείγματα ενώσεων με ανεπιθύμητες πτητικές ιδιότητες, οι οποίες προκύπτουν από διάσπαση φαινολικών οξέων είναι οι πτητικές φαινόλες αίθυλ-φαινόλη και η αίθυλ-γουαϊκόλη [18].

Φλαβονοειδή

Τα Φλαβονοειδή είναι μια μεγάλη κατηγορία χημικών ενώσεων, οι οποίες απορροφούν στο υπεριώδες και ορατό τμήμα του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος προσδίδοντας στις ενώσεις αυτές χρωστικές ιδιότητες. Η βασική τους δομή αποτελείται από ένα βενζοπυράνιο με ύδροξυ υποκαταστάτες ενωμένο με ένα επιπλέον βενζολικό δακτύλιο. Χαρακτηριστικές μονομερείς τους μορφές είναι οι φλαβόνες, οι φλαβονόλες, οι φλαβανόνες και οι φλαβανόλες (**Εικόνα 2.9**). Η κατεχίνη, η επικατεχίνη, η κερκετίνη, η μυρικετίνη και η καμφερόλη είναι τα πιο συνηθισμένα φλαβονοειδή με παρουσία κυρίως σε ερυθρούς οίνους.

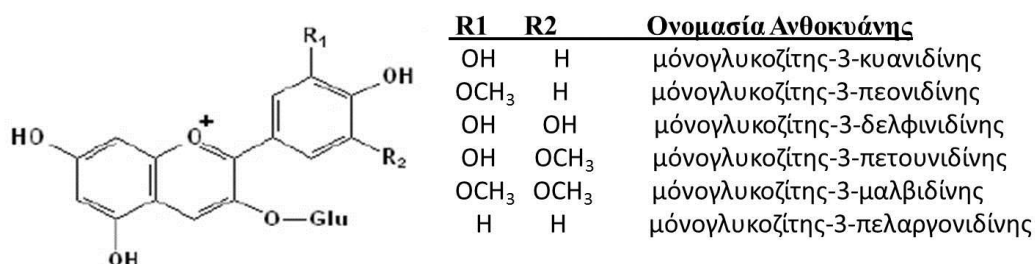


Εικόνα 2.9. Φλαβονοειδή α) Φλαβόνη (R3=H), Φλαβονόλη (R3=OH) β) Φλαβανόνη (R3=H), Φλαβανόλη (R3=OH)

Μικρότερες συγκεντρώσεις κερκετίνης και καμφερόλης εντοπίζονται και σε λευκούς οίνους [19]. Οι ανθοκυάνες και οι ταννίνες ανήκουν στην ευρύτερη κατηγορία των φλαβονοειδών.

Ανθοκυάνες

Οι ανθοκυάνες θεωρούνται από τις κυριότερες χρωστικές ουσίες στη φύση και υπεύθυνες για το κόκκινο χρώμα του οίνου. Οι ενώσεις αυτές είναι υδατοδιαλυτές και χημικά ασταθείς. Παράγοντες όπως το pH, η θερμοκρασία, η συγκέντρωση και η παρουσία άλλων χημικών ειδών καθορίζουν τη χημική τους μορφή. Συμμετέχουν σε διάφορες χημικές διεργασίες σχηματίζοντας σύμπλοκα, παράγωγα και πολυμερείς ενώσεις [20]. Η βασική χημική δομή των μονομερών τους μορφών αποτελείται από δύο βενζολικούς δακτύλιους ενωμένους με έναν ακόρεστο οξυγανομένο ετέροκυκλικό δακτύλιο και συναντώνται σαν μόνο-γλυκοζίτες ή δι-γλυκοζίτες των ανθοκυανιδίων (κυανιδίνη, πεονιδίνη, πελαργονιδίνη, δελφινιδίνη, πετουνιδίνη και μαλβιδίνη) (Εικόνα 2.10). Στους οίνους οι οποίοι προέρχονται από το είδος *άμπελος η οиноφόρος Vitis Vinifera* δεν υπάρχουν δι-γλυκοζιτικές μορφές παρά μόνο σε ίχνη. Η συνολική συγκέντρωση των ανθοκυανών στα κόκκινα κρασιά κυμαίνεται από 500-2000 mg/l. Κατά την παλαίωση του οίνου η συγκέντρωση των μονομερών τους μορφών ελαττώνεται, παράλληλα όμως νέα είδη ανθοκυανών, αλλά και πολυμερείς μορφές δημιουργούνται [21].

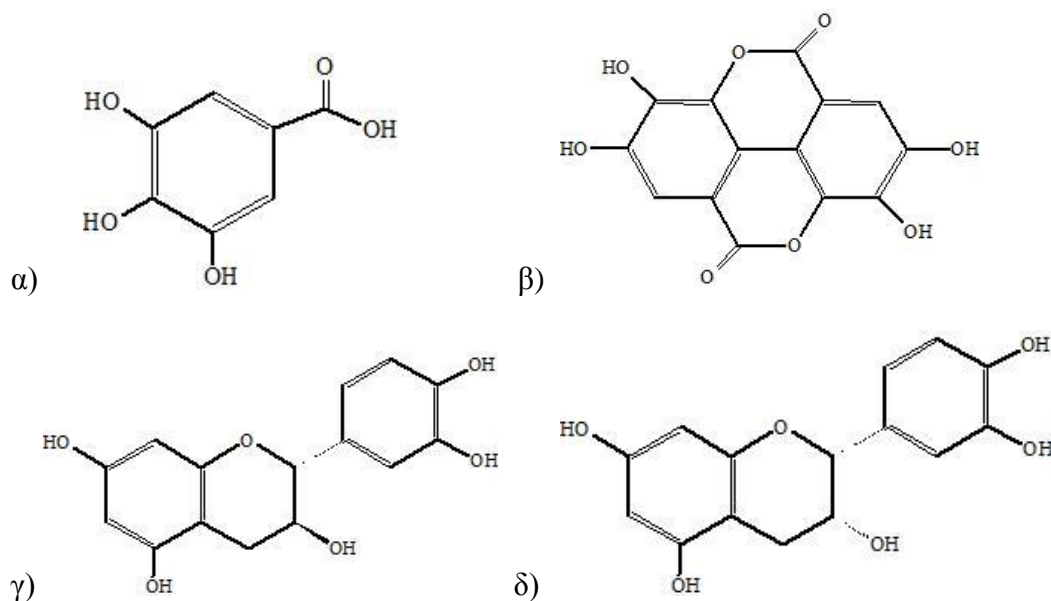


Εικόνα 2.10. Χημική δομή ανθοκυανών και οι έξι κύριες μορφές τους

Ταννίνες

Οι ταννίνες είναι πολυμερείς ενώσεις με μεγάλο μοριακό βάρος (600-3500) αποτέλεσμα συνένωσης μικρότερων φαινολικών δομών. Το κύριο χαρακτηριστικό αυτών των ενώσεων είναι η αλληλεπίδραση τους με πρωτεΐνες και άλλα μεγάλα μόρια, ενώ είναι υπεύθυνες για την αίσθηση στυφού. Στον οίνο συναντώνται δύο είδη ταννινών, οι υδρολυόμενες και οι συμπυκνωμένες. Οι υδρολυόμενες ταννίνες δεν προέρχονται από τα σταφύλια, αλλά προστίθενται στον οίνο τεχνητά κατά την οινοποιητική διαδικασία, εντοπίζονται επίσης σε παλαιωμένους οίνους προερχόμενες από ξύλινα βαρέλια τα οποία χρησιμοποιούνται για την παλαίωση. Οι συμπυκνωμένες ταννίνες αντίθετα, προυπάρχουν σε διάφορα μέρη των σταφυλιών

(φλοιοί και γίγαρτα) και ανάλογα με τον τρόπο οινοποίησης, συναντώνται ή όχι στον οίνο.



Εικόνα 2.11. Φαινολικές δομές Ταννινών α) Γαλλικό οξύ β) Ελλαγικό οξύ γ) Κατεχίνη δ) Επικατεχίνη

Από τον συνδυασμό των φαινολικών δομών προκύπτουν διμερή, τριμερή και πολυμερή είδη. Οι κύριες φαινολικές δομές των υδρολυόμενων ταννινών είναι το ελλαγικό και το γαλλικό οξύ (**Εικόνα 2.11**), τα οποία και απελευθερώνονται με υδρόλυση παρουσία οξέος. Η χημική δομή των συμπυκνωμένων ταννινών είναι αποτέλεσμα του πολυμερισμού των φλαβονοειδών ενώσεων κατεχίνη και επικατεχίνη (**Εικόνα 2.11**), ενώ θέρμανση αυτών σε μετρίου βαθμού οξύτητας διάλυμα δίνει την χημική ένωση κυανιδίνη, εξαιτίας αυτής της ιδιότητας ονομάζονται και προκυανιδίνες. Τα συνηθισμένα επίπεδα συγκέντρωσης ταννινών σε κόκκινους οίνους κυμαίνονται από 1-4 g/L, με τα αντίστοιχα επίπεδα στους λευκούς οίνους να κυμαίνονται από 100-300 mg/L [22].

2.5 Χρώμα και Όψη

Το χρώμα ενός οίνου τον χαρακτηρίζει ως λευκό, ροζέ ή κόκκινο. Πέραν του βασικού αυτού χαρακτηρισμού, μια πιο λεπτομερής μελέτη του χρώματος και της γενικότερης όψης του οίνου αποτελεί σημαντικό κριτήριο για την ποιότητα του. Η οπτική φασματοσκοπία δεν δύναται να είναι απύσα από μία τέτοια μελέτη. Ήδη εδώ και αρκετά χρόνια έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι προς αυτήν την κατεύθυνση [23-25].

Κάποιες από αυτές βασίζονται στη μέτρηση των τιμών απορρόφησης στα μήκη κύματος 420, 520 και 620 nm όπως αυτές προκύπτουν από το νόμο Beer-Lambert [26]. Από αυτές τις τιμές ορίζονται έννοιες όπως η ένταση του χρώματος (CI, Color Intensity), η απόχρωση (T, Hue), η περιεκτικότητα (%) σε κάποιο χρώμα και η λαμπρότητα dA (%).

Πιο συγκεκριμένα η έννοια της *έντασης χρώματος* αντιπροσωπεύει τη συνολική ποσότητα του χρώματος ενός ερυθρού οίνου, υπολογιζόμενη από τη σχέση (1), όπου OD η τιμή της οπτικής απορρόφησης στο αντίστοιχο μήκος κύματος.

$$CI = OD\ 420 + OD\ 520 + OD\ 620 \quad (1)$$

Η *απόχρωση*, μία ποιοτική παράμετρος, προκύπτει από τη σχέση (2) και ουσιαστικά δείχνει την αναλογία του καφέ έναντι του κόκκινου χρώματος. Μικρότερες τιμές εμφανίζονται σε νεαρούς οίνους και μεγαλύτερες σε παλαιωμένους.

$$T = \frac{OD\ 420}{OD\ 520} \quad (2)$$

Η *περιεκτικότητα* ενός οίνου σε κίτρινο, ερυθρό και κυανό, προκύπτει αντίστοιχα από τις σχέσεις (3-5), και ουσιαστικά δείχνει τη συνεισφορά του καθενός από τα τρία αυτά χρώματα στο συνολικό χρώμα του οίνου.

$$Κιτρινο\ \% = \frac{OD\ 420}{CI} * 100 \quad (3)$$

$$Κόκκινο\ \% = \frac{OD\ 520}{CI} * 100. \quad (4)$$

$$Κυανό\ \% = \frac{OD\ 620}{CI} * 100 \quad (5)$$

Η λαμπρότητα ενός κόκκινου οίνου δείχνει την επικράτηση του κόκκινου χρώματος έναντι μίας καφέ ή κυανής απόχρωσης, και προκύπτει από τη σχέση (6).

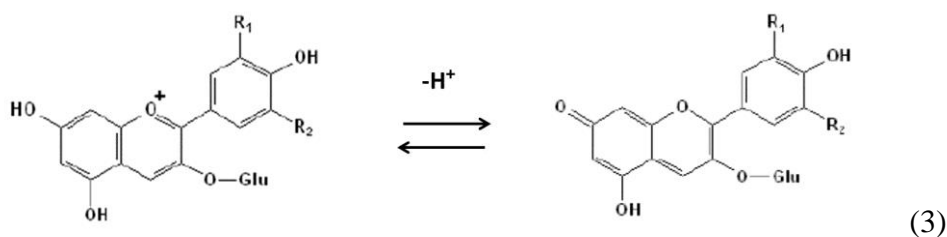
$$dA\ \% = \left(\frac{OD\ 420 + OD\ 620}{2 * OD\ 520} \right) * 100 \quad (6)$$

Οι σχετικά απλή αυτή προσέγγιση με τις προαναφερθείσες έννοιες, δίνει μία αρκετά ικανοποιητική περιγραφή του χρώματος. Το βασικό της όμως μειονέκτημα είναι ότι βασίζεται μόνο σε τρία μήκη κύματος, ενώ η απορρόφηση των χρωστικών ενώσεων, οι οποίες είναι υπεύθυνες για το χρώμα του οίνου, δεν περιορίζεται μόνο σε αυτά τα μήκη κύματος. Τα τελευταία χρόνια και ταυτόχρονα με την εξέλιξη της

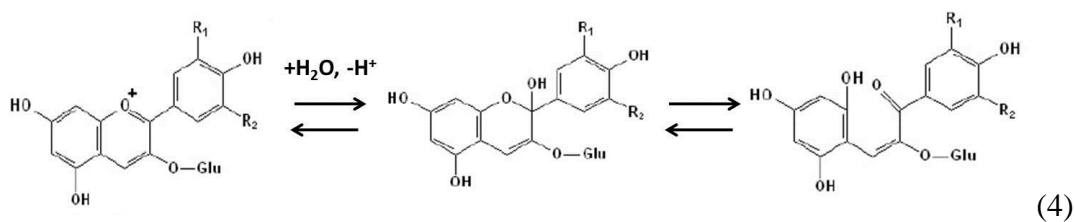
οπτικής φασματοσκοπίας, έχουν αναπτυχθεί πιο καινοτόμες τεχνικές προσέγγισης, οι οποίες χρησιμοποιούν όλο το εύρος των μηκών κύματος της ορατής ακτινοβολίας, όπως π.χ. η μέθοδος CIE Lab.

Όσον αφορά στους νεαρούς ερυθρούς οίνους, οι μονομερείς ανθοκυάνες θεωρούνται οι κύριες χρωστικές ενώσεις. Οι ενώσεις αυτές απορροφούν τόσο στο ορατό όσο και στο υπεριώδες τμήμα του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Το μέγιστο της απορρόφησης τους στην περιοχή 500-530 nm, είναι αυτό το οποίο προσδίδει στον οίνο το χαρακτηριστικό κόκκινο χρώμα. Ανάλογα με τους μέθοξυ και ύδροξυ υποκαταστάτες στο αρωματικό σύστημα (**Εικόνα 2.10**), η θέση της μέγιστης απορρόφησης μετατοπίζεται. Ο 3-μόνο-γλυκοζίτης της κυανιδίνης (η πιο συνηθισμένη ανθοκυάνη στη φύση) απορροφά στα 515 nm (λ_{\max}), ο 3-μόνο-γλυκοζίτης της μαλβιδίνης (η επικρατέστερη ανθοκυάνη του οίνου) απορροφά στα 530 nm (λ_{\max}), ενώ και οι υπόλοιπες τέσσερις μονομερείς μορφές εμφανίζουν μέγιστα (λ_{\max}) γύρω στα 520 nm.

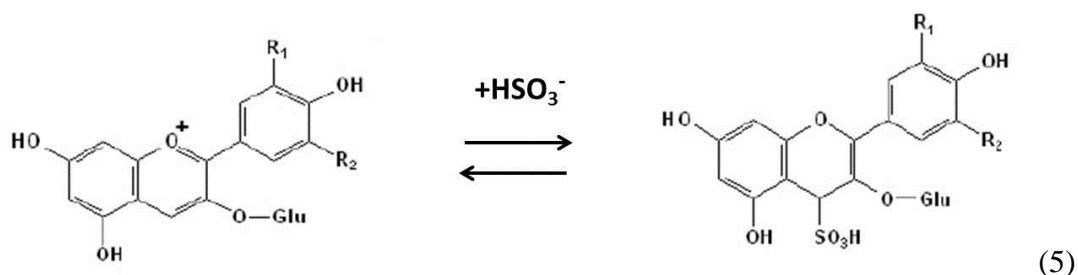
Άλλοι παράγοντες οι οποίοι καθορίζουν το χρώμα ενός νεαρού οίνου και σχετίζονται με την υψηλή χημική αστάθεια των μονομερών ανθοκυανών είναι το pH και η ποσότητα του SO₂ [27]. Σε συνήθεις τιμές pH, της τάξεως 2.5-4.5, η μορφή του φλαβονοειδούς κατιόντος (φλαβύλιο) είναι η κύρια έγχρωμη μορφή υπεύθυνη για το κόκκινο χρώμα. Το κατιόν του φλαβυλίου ευρίσκεται σε ισορροπία με μία άνυδρη βάση κυανού χρώματος, χημική αντίδραση (3), προσδίδοντας στους νεαρούς οίνους μία κυανή απόχρωση.



Αυξανόμενου του pH η μορφή του φλαβυλίου υδρολύεται προς την άχρωμη ψευδοβάση καρβινόλη (ένυδρη μορφή), η οποία βρίσκεται σε ισορροπία με την ταυτομερή της ένωση χαλκόνη, κίτρινου χρώματος, χημική αντίδραση (4).



Αυξημένες συγκεντρώσεις SO_2 σε σύνηθες για τον οίνο pH ευνοούν την ύπαρξη του θειώδους ανιόντος HSO_3^- , η οποία πρωτονιώνει το κατιόν του φλαβυλίου δημιουργώντας μία άχρωμη μορφή, χημική αντίδραση (5).



Εξαιτίας της μεγάλης χημικής τους αστάθειας και με σκοπό την προστασία της χημικής τους δομής, οι ανθοκυάνες συμμετέχουν σε διάφορες χημικές διεργασίες ενδομοριακής και διαμοριακής σύγχρωσης, συμπλοκοποίησης και αυτοδιεθύτησης. Οι νέες χημικές δομές που δημιουργούνται συνεισφέρουν και αυτές στο χρώμα του οίνου. Με την πάροδο του χρόνου και την παλαίωση του οίνου, οι μονομερείς ανθοκυάνες ελαττώνονται, παραταύτα η σταθερότητα του χρώματος διατηρείται με την εμφάνιση όμως μίας πιο καφέ απόχρωσης. Η χρωματική αυτή σταθερότητα οφείλεται στο γεγονός ότι οι μονομερείς μορφές των ανθοκυανών, μετατρέπονται σε νέες μορφές, οι οποίες διαθέτουν εξίσου ισχυρές χρωστικές ιδιότητες. Τα νέα χημικά αυτά είδη δύναται να είναι πολύμερείς μορφές από τη συνένωση τους με άλλα φλαβονοειδή αλλά και ενώσεις, όπως οι πυρανοανθοκυάνες οι οποίες διαθέτουν έναν επιπλέον ετεροκυκλικό δακτύλιο [28]. Πέραν των ανθοκυανών και άλλα χημικά είδη συμμετέχουν στη διαμόρφωση του χρώματος και της όψης ενός οίνου. Αυτό γίνεται ευκολότερα αντιληπτό στη περίπτωση του λευκού οίνου. Μία κίτρινη απόχρωση που συχνά εμφανίζουν είναι αποτέλεσμα οξείδωσης των φαινολικών οξέων, αλλά πιθανότατα οφείλεται στη παρουσία φλαβονοειδών ενώσεων οι οποίες απορροφούν στο υπεριώδες.

Άλλα φαινόμενα τα οποία σχετίζονται περισσότερο με την όψη και λιγότερο με το χρώμα, είναι η θολερότητα και η παρουσία κρυστάλλων. Η παρουσία θολερότητας σχετίζεται με την αστάθεια κάποιων πρωτεϊνών σε υψηλές

θερμοκρασίες. Το φαινόμενο αυτό δεν είναι τόσο έντονο στους ερυθρούς οίνους, εξαιτίας της παρουσίας μεγάλων συγκεντρώσεων από ταννίνες οι οποίες δεσμεύουν αυτές τις πρωτεΐνες. Το φαινόμενο της παρουσίας κρυστάλλων παρατηρείται κατά τη ψύξη του οίνου και συνδέεται με την παρουσία τρυγικών αλάτων του καλίου (K^+T) και του ασβεστίου ($Ca^{2+}T$), τα οποία καθιζάνουν στα τοιχώματα και στον πυθμένα των φιαλών.



Εικόνα 2.12. Κρύσταλλοι τρυγικών αλάτων σε φιάλη και ποτήρι οίνου

Η δημιουργία και η καθίζηση αυτών των κρυστάλλων οφείλεται στη χαμηλή τους διαλυτότητα σε χαμηλές θερμοκρασίες. Η παρουσία τους σε μία εμπορική φιάλη θεωρείται ελάττωμα παρά το γεγονός ότι δεν σχετίζονται με κάποια βλαβερή συνέπεια στην ανθρώπινη υγεία. Στην **Εικόνα 2.12** απεικονίζεται η παρουσία κρυστάλλων τρυγικών αλάτων σε έναν εμπορικό οίνο. Διάφορες οινολογικές τεχνικές όπως το φιλτράρισμα και η προσθήκη του ορυκτού μπετονίτη χρησιμοποιούνται για την αφαίρεση των κρυστάλλων και της θολερότητας, αντίστοιχα.

2.6 Παλαίωση

Η παλαίωση του οίνου είναι μία διαδικασία η οποία έχει ως σκοπό τη βελτίωση των οργανοληπτικών του χαρακτηριστικών. Το αρχικό στάδιο της ωρίμανσης του οίνου πραγματοποιείται σε ξύλινα βαρέλια, ενώ η διαδικασία της παλαίωσης συνεχίζεται στη φιάλη. Με την παλαίωση επιτυγχάνεται σταθεροποίηση χρώματος, βελτίωση της διαύγειας και εμπλουτισμός σε γεύσεις και αρώματα. Το δυναμικό παλαίωσης του κάθε οίνου είναι διαφορετικό, ενώ κάποιοι δεν ενδείκνυνται προς παλαίωση. Στο παρελθόν το πιο διαδεδομένο ξύλο για την κατασκευή βαρελιών ήταν η καστανιά, ενώ σήμερα βαρέλια κατασκευασμένα από ξύλο δρυός θεωρούνται τα πιο ενδεδειγμένα [29]. Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον στρέφεται και προς άλλα είδη όπως η καστανιά, η κερασιά, η ακακία και η μουριά [30], ενώ

εναλλακτικές τεχνικές παλαίωσης έχουν αναπτυχθεί. Οι νέες αυτές τεχνικές δεν χρησιμοποιούν ξύλινα βαρέλια, αλλά δεξαμενές από ανοξείδωτο σίδηρο, μέσα στις οποίες εναποτίθενται ρινίσματα ξύλου [31].

Δύο κύρια φαινόμενα τα οποία λαμβάνουν χώρα κατά την παλαίωση του οίνου είναι η οξυγόνωση του μέσω των πόρων του βαρελιού (ή με κάποιο άλλο τεχνητό μέσο, στις πιο καινοτόμες τεχνικές) και η εκχύλιση χημικών συστατικών από το ξύλο. Το χημικό αποτύπωμα του ξύλου έχει την ικανότητα να προσδώσει ιδιαίτερα χαρακτηριστικά στον οίνο, ενώ ταυτόχρονα δύναται να χρησιμοποιηθεί κατά την ανάλυση ως δείκτης για τον εντοπισμό του τρόπου παλαίωσης. Ο εντοπισμός του ξύλου έχει ιδιαίτερη σημασία, κατά τον διεθνή οργανισμό οίνου (International Organisation of Vine and Wine, OIV) αποδεκτοί τρόποι παλαίωσης είναι εκείνοι κατά τους οποίους η παλαίωση πραγματοποιείται μόνο σε βαρέλια προερχόμενα από ξύλο δρυός και καστανιάς. Τα κυριότερα χημικά συστατικά τα οποία εκχυλίζονται στον οίνο ανήκουν στην κατηγορία των φαινολικών ενώσεων και των πτητικών συστατικών. Τα δρύινα βαρέλια χαρακτηρίζονται από μεγάλες συγκεντρώσεις υδρολυόμενων ταννινών, βαρέλια προερχόμενα από ξύλο καστανιάς εμφανίζουν ακόμα υψηλότερες τιμές συγκεντρώσεων. Άλλα είδη ξύλου όπως η ακακία, η κερασιά και το μούρο διαφέρουν ως προς το φαινολικό τους δυναμικό, εμπλουτίζοντας τους οίνους με φλαβονοειδείς ενώσεις [32].

Βιβλιογραφία

1. Γ. Βαρουφάκης, Ο έλεγχος ποιότητας των προϊόντων και η προστασία του καταναλωτή στην αρχαιότητα. *Αρχαιολογία και Τέχνες*. 2005, **95**, 81-87
2. M. De La Guardia and A. González (Eds), Food Protected Designation of Origin: Methodologies and Applications, *Comprehensive Analytical Chemistry*, **60**, Elsevier Science (2013)
3. E-Bacchus, 2016. <http://ec.europa.eu/agriculture/markets/wine/e-bacchus/index.cfm?event=searchPEccgis&language=EN>.
4. EXPO HELLAS Foods & Drinks Exhibition part of Analyst.gr <http://expohellas.analyst.gr/articles-el/top-10-megaliteres-oinopiies-2014-2015/>.
5. K. Lazarakis, A guide to the wines of Greece.(2005)

6. ALEXAKIS Wines. <http://alexakiswines.com/istoria-tou-krasiou/>.
7. P. Ribéreau-Gayon, Y. Glories, A. Maujean, D. Dubourdieu, Handbook of Enology Vol. 2: The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments. Wiley (2006), pp. 66-90.
8. P. Ribéreau-Gayon, Y. Glories, A. Maujean, D. Dubourdieu, Handbook of Enology, Vol. 2: The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments. Wiley (2006), pp. 51-64.
9. P. Ribéreau-Gayon, Y. Glories, A. Maujean, D. Dubourdieu, Handbook of Enology Vol. 2: The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments. Wiley (2006), pp. 4-49.
10. P. Ribéreau-Gayon, Y. Glories, A. Maujean, D. Dubourdieu, Handbook of Enology Vol. 2: The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments. Wiley (2006), pp. 92-108.
11. P. Pohl, What do metals tell us about wine? *Trends in Analytical Chemistry* 2007, **26** (9), 941-949
12. P. Ribéreau-Gayon, Y. Glories, A. Maujean, D. Dubourdieu, Handbook of Enology Vol. 2: The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments. Wiley (2006), pp. 109-139.
13. P. Ribéreau-Gayon, Y. Glories, A. Maujean, D. Dubourdieu, Handbook of Enology Vol. 2: The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments. Wiley (2006), pp. 205-228.
14. Μ. Λιούνη, Σημειώσεις και εργαστηριακές ασκήσεις χημείας και τεχνολογίας οίνου και άλλων αλκοολούχων ποτών. Αθήνα (2010)
15. C. Gomez-Cordoves and M.L. Gonzalez-SanJose, Interpretation of Color Variables during the Aging of Red Wines: Relationship with Families of Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1995, **43**(3), 557-561
16. J. Robichaud, and A. Noble, Astringency and Bitterness of Selected Phenolics in Wine. *Journal of Science and Food Agriculture* 1990, **53**, 343-353
17. B. German, and R. Walzem, The health benefits of wine. *Annual Review of Nutrition*. 2003, **20**, 561-593

18. P. Ribéreau-Gayon, Y. Glories, A. Maujean, D. Dubourdieu, Handbook of Enology Vol. 2: The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments. Wiley (2006), pp. 205-228.
19. P. Ribéreau-Gayon, Y. Glories, A. Maujean, D. Dubourdieu, Handbook of Enology Vol. 2: The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments. Wiley (2006), pp. 144-145.
20. A. Castañeda-Ovando, M. de Lourdes Pacheco-Hernández, M.E. Páez-Hernández, J.A. Rodríguez, C.A. Galán-Vidal, Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry* 2009, **13**, 859-871
21. F. He, N.N. Liang, L. Mu, Q.H. Pan, J. Wang, M.J. Reeves, C.Q. Duan, Anthocyanins and their variation in red Wines I. Monomeric anthocyanins and their color expression. *Molecules*. 2012, **17**, 1571-1601
22. P. Ribéreau-Gayon, Y. Glories, A. Maujean, D. Dubourdieu, Handbook of Enology Vol. 2: The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments. Wiley (2006), pp. 147-152.
23. T.C. Somers and M.E. Evans, Wine Quality: Correlations with colour density and anthocyanin equilibria in a group of young red wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1974, **25**(11), 1369-1379
24. Y. Glories, La couleur des vins rouges 1e partie. Les equilibres des anthocyanes et des tanins. *Connaiss. Vigne Vin*. 1984a, **18**(3), 195-217
25. Y. Glories, La couleur des vins rouges, 2e partie. Mesure, origine et interpretation. *Connaiss Vigne Vin*. 1984b, **18**(4), 253-271
26. D.C. Harris, Quantitative Chemical Analysis. Macmillan (2010)
27. P. Ribéreau-Gayon, Y. Glories, A. Maujean, D. Dubourdieu, Handbook of Enology Vol. 2: The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments. Wiley (2006), pp. 145-147.
28. F. He, N.N. Liang, L. Mu, Q.H. Pan, J. Wang, M.J. Reeves, C.Q. Duan, Anthocyanins and their variation in red wines II. Anthocyanin derived pigments and their color evolution. *Molecules*. 2012, **17**, 1483-1519

29. M. Sanz, B.F. De Simón, E. Cadahía, E. Esteruelas, A.M. Muñoz, M.T. Hernández, I. Estrella, Polyphenolic profile as a useful tool to identify the wood used in wine aging. *Analytica Chimica Acta*. 2012, **732**, 33-45
30. M. De Rosso, A. Panighel, A. Dalla Vedova, L. Stella, R. Flamini, Changes in chemical composition of a red wine aged in acacia, cherry, chestnut, mulberry and oak wood barrels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009, **57**, 1915-1920
31. P. Arapitsas, A. Antonopoulos, E. Stefanou, V.G. Dourtoglou, Artificial aging of wines using oak chips. *Food Chemistry*. 2004, **86**, 563-570
32. B.F. De Simón, M. Sanz, E. Cadahía, J. Martinez, 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 Chemistry*. 2014, **143**, 66-76

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Φασματοσκοπία

3.1 Ηλεκτρομαγνητική Ακτινοβολία

Η φασματοσκοπία μελετά την αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με την ύλη. Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία έχει τόσο κυματική όσο και σωματιδιακή φύση. Με βάση την κυματική της φύση, αποτελείται από κύματα ηλεκτρικού και μαγνητικού πεδίου [1]. Τα κύματα αυτά διαδίδονται με την ταχύτητα του φωτός $c = 3 \times 10^8$ m/s, ενώ η συχνότητα τους καθορίζει την ενέργεια την οποία μεταφέρουν.

Υψηλή Ενέργεια			Χαμηλή Ενέργεια		
10^{20} Hz	10^{17} Hz	10^{16} - 10^{15} Hz	10^{12} Hz	10^{10} Hz	10^8 Hz (Συχνότητα)
ακτίνες-γ	ακτίνες-χ	υπεριώδες-ορατό	υπέρυθρο	μικροκύματα	ραδιοκύματα
10^{-4} nm	10^{-1} nm	10^3 nm	10^5 nm	10^8 nm	(Μήκος Κύματος)

Εικόνα 3.1. Περιοχές ηλεκτρομαγνητικού φάσματος και σχέσεις μήκους κύματος-συχνότητας

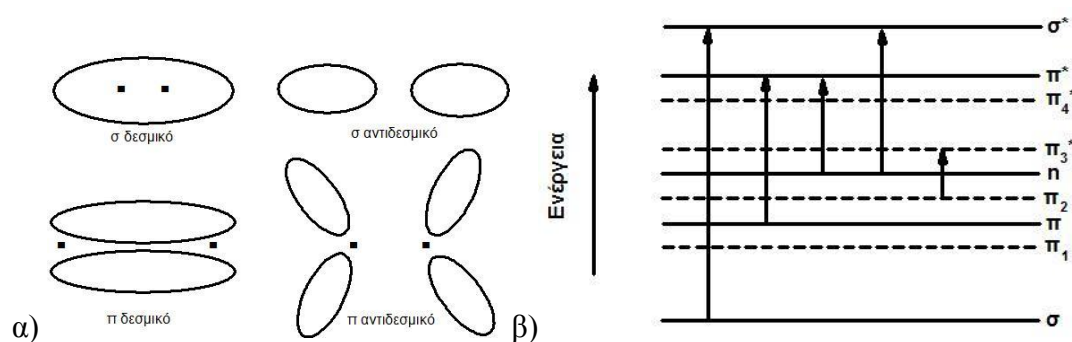
Με βάση τη σωματιδιακή της φύση, η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία συνίσταται από φωτόνια και η ενέργεια τους υπολογίζεται από τη σχέση (1). Με βάση την ενέργεια, το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα χωρίζεται σε περιοχές, εκτεινόμενο από τις υψηλής συχνότητας (10^{20} Hz) ακτίνες-γ μέχρι και τα χαμηλής συχνότητας (10^8 Hz) ραδιοκύματα.

$$E = h \nu, \text{ όπου } h = 6.626 \times 10^{-34} \text{ J s (σταθερά του Planck) (1)}$$

Χαρακτηριστικές περιοχές του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος και τα όρια μεταξύ αυτών απεικονίζονται στην **Εικόνα 3.1**. Οι διάφοροι τύποι φασματοσκοπίας χρησιμοποιούν σχεδόν όλες τις περιοχές του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος και συνδέονται με διεργασίες διαφορετικού ενεργειακού περιεχομένου που λαμβάνουν χώρα στην ύλη (άτομα, μόρια, υλικά).

3.2 Φασματοσκοπία Απορρόφησης Υπεριώδους- Ορατού (UV-VIS)

Ως απορρόφηση περιγράφεται η δέσμευση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας από την ύλη. Μελετώντας το φαινόμενο σε μοριακό επίπεδο, η απορρόφηση οφείλεται σε διεργασίες των μορίων κατά την αλληλεπίδραση τους με την ακτινοβολία. Στο υπεριώδες-ορατό τμήμα του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, οι διεργασίες είναι κυρίως ηλεκτρονικής φύσεως αλλά υπάρχει συνεισφορά και από δονητικό-περιστροφικές κινήσεις των μορίων. Με βάση τη θεωρία της κβαντομηχανικής, τα ηλεκτρόνια εντοπίζονται σε μοριακά τροχιακά. Τα μοριακά τροχιακά περιγράφονται ως κατάλληλοι συνδυασμοί ατομικών τροχιακών. Ανάλογα με τους δεσμούς μεταξύ των ατόμων και τον τρόπο συνένωσης των ατομικών τροχιακών, τα μοριακά τροχιακά διακρίνονται σε δεσμικά και αντι-δεσμικά (**Εικόνα 3.2α**). Τα δεσμικά μοριακά τροχιακά (σ, π) συγκεντρώνουν τη μέγιστη ηλεκτρονιακή πυκνότητα μεταξύ των συνδεόμενων ατόμων διατηρώντας παράλληλα τη χαμηλότερη ενέργεια του συστήματος (θεμελιώδης κατάσταση), ενώ τα αντιδεσμικά μοριακά τροχιακά (σ^*, π^*) παρουσιάζουν χαμηλή ηλεκτρονιακή πυκνότητα στην περιοχή του χημικού δεσμού και χαρακτηρίζονται από υψηλή ενέργεια (διεγερμένη κατάσταση). Μία τρίτη κατηγορία μοριακών τροχιακών είναι τα μη δεσμικά (n), τα οποία δεν συμμετέχουν στους δεσμούς μεταξύ των ατόμων και διαθέτουν ασύζευκτα ηλεκτρόνια [2].



Εικόνα 3.2. Μοριακά τροχιακά (Δεσμικά και Αντιδεσμικά) α) Δομή στον χώρο β) Ηλεκτρονικές μεταβάσεις

Το φαινόμενο της απορρόφησης στο υπεριώδες-ορατό τμήμα του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος λαμβάνει χώρα όταν ένα ηλεκτρόνιο από δεσμικό ή μη δεσμικό τροχιακό μεταβαίνει σε αντιδεσμικό μοριακό τροχιακό (**Εικόνα 3.2β**). Η πιο πιθανή ηλεκτρονική μετάβαση είναι αυτή από το υψηλότερο ενεργειακά

κατειλημμένο μοριακό τροχιακό (Highest Occupied Molecular Orbital, HOMO) στο χαμηλότερο ενεργειακά μη κατειλημμένο μοριακό τροχιακό (Lowest Unoccupied Molecular Orbital). Η ενεργειακή διαφορά μεταξύ των δύο αυτών τροχιακών (HOMO-LUMO) αντιστοιχεί σε επίπεδα ενέργειας του υπεριώδους-ορατού τμήματος της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Η μοριακή δομή η οποία φιλοξενεί τέτοια τροχιακά ονομάζεται χρωμοφόρα ομάδα. Οι χρωμοφόρες ομάδες είναι συνήθως μοριακές δομές με διπλούς δεσμούς και ασύζευκτα ηλεκτρόνια, ενώ η παρατηρούμενη απορρόφηση οφείλεται σε ηλεκτρονικές μεταβάσεις από μη δεσμικά n και δεσμικά π μοριακά τροχιακά σε π^* αντιδεσμικά μοριακά τροχιακά ($n \rightarrow \pi^*$ και $\pi \rightarrow \pi^*$). Συζυγιακοί διπλοί δεσμοί, δηλαδή εναλλαγή διπλών μονών δεσμών $-C=C-C=C-C-$ μειώνουν την ενεργειακή διαφορά μεταξύ π δεσμικών και π^* αντιδεσμικών μοριακών τροχιακών [3].

Για τη μέτρηση και την ποσοτικοποίηση του φαινομένου της απορρόφησης χρησιμοποιείται η έννοια της διαπερατότητας, η οποία υπολογίζεται από τη σχέση (2) όπου I_0 η αρχική ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και I η ένταση της ακτινοβολίας μετά τη διέλευση της από το μέσο απορρόφησης.

$$T = I/I_0 \quad (2)$$

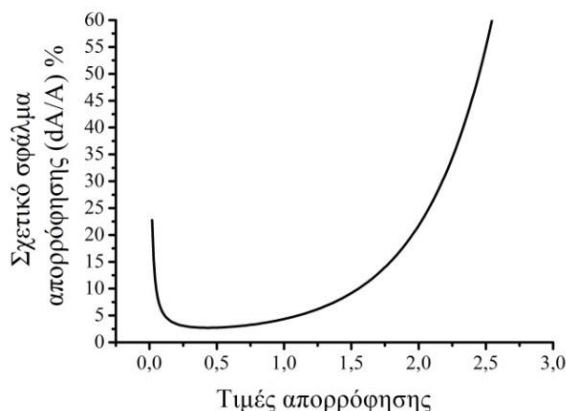
Εάν θεωρηθεί ότι η απορρόφηση είναι το μοναδικό φαινόμενο το οποίο είναι υπεύθυνο για τη μείωση της έντασης της αρχικής ακτινοβολίας (η σκέδαση του φωτός θεωρείται αμελητέα), τότε ισχύει ο νόμος Beer-Lambert, βάσει του οποίου η απορρόφηση ισούται με τον αρνητικό δεκαδικό λογάριθμο της διαπερατότητας, σχέση (3).

$$A = -\log(T) = -\log(I/I_0) \quad (3)$$

Για τιμή απορρόφησης $A=1$ το 1/10 της αρχικής ακτινοβολίας διέρχεται από το μέσο απορρόφησης, για τιμή $A=2$ μόνο το 1/100, ενώ για τιμή $A=3$ μόλις το 1/1000. Παραγωγίζοντας τη σχέση (3), λύνοντας ως προς το σχετικό σφάλμα της απορρόφησης και αναπαριστώντας διαγραμματικά τη σχέση (4), διαπιστώνεται ότι τιμές απορρόφησης στο εύρος 0.1 - 1 ελαχιστοποιούν το φωτομετρικό σφάλμα (Εικόνα 3.3).

$$A = -\log T \Leftrightarrow T = 10^{-A} \Leftrightarrow \frac{dT}{dA} = \ln 10 \times 10^{-A} \Leftrightarrow dA = \frac{1}{\ln 10 \times 10^{-A}} dT$$

$$\text{Εν τέλει,} \quad \frac{dA}{A} = \frac{1}{A \times \ln 10 \times 10^{-A}} dT \quad (4)$$



Εικόνα 3.3. Σχετικό σφάλμα απορρόφησης $\frac{dA}{A}$ έναντι της τιμής της απορρόφησης A

Όταν το μέσο απορρόφησης είναι κάποιο διάλυμα χημικής ουσίας η οποία απορροφά ακτινοβολία, ο νόμος Beer-Lambert εκφράζεται μέσω της σχέσης (5).

$$A = \epsilon c \ell \quad (5)$$

όπου A : η τιμή της απορρόφησης, ϵ : η γραμμομοριακή απορροφητικότητα της χημικής ουσίας σε $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$, c : η συγκέντρωση της χημικής ουσίας σε M και ℓ : το μήκος του οπτικού δρόμου εντός της κυψελίδας, σε cm [4]. Όπως φαίνεται από τη σχέση (5), η απορρόφηση είναι αδιάστατο μέγεθος και ανάλογη της συγκέντρωσης της χημικής ουσίας, της γραμμομοριακής της απορροφητικότητας και της απόστασης την οποία διένυσε η ακτινοβολία στο διάλυμα. Σε διαλύματα με περισσότερες από μία χημικές ουσίες, ισχύει η αρχή της προσθετικότητας, με τη συνολική απορρόφηση να προκύπτει από το αλγεβρικό άθροισμα των επιμέρους απορροφήσεων, σχέση (6).

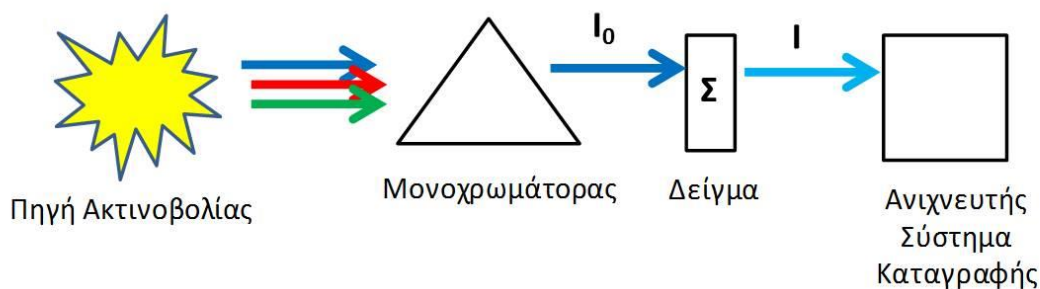
$$A = A_1 + A_2 + \dots + A_n = (\epsilon_1 c_1 + \epsilon_2 c_2 + \dots + \epsilon_n c_n) * \ell \quad (6)$$

Η αρχή της προσθετικότητας ισχύει με την προϋπόθεση ότι δεν υπάρχουν χημικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων (πυκνά διαλύματα), παρεμποδίσεις από τον διαλύτη ή άλλα τέτοια φαινόμενα. Η απεικόνιση του φαινομένου της απορρόφησης γίνεται με τη μορφή φασμάτων, τα οποία ουσιαστικά είναι γραφικές παραστάσεις της ενέργειας της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας η οποία απορροφήθηκε (άξονας- X) προς την απορρόφηση ή τη διαπερατότητα (άξονας- Y) του εκάστοτε υλικού. Πέραν από την ατομική και τη μοριακή σύσταση ενός υλικού, η μορφή ενός φάσματος εξαρτάται και από άλλους παράγοντες όπως ο διαλύτης, το pH και η θερμοκρασία.

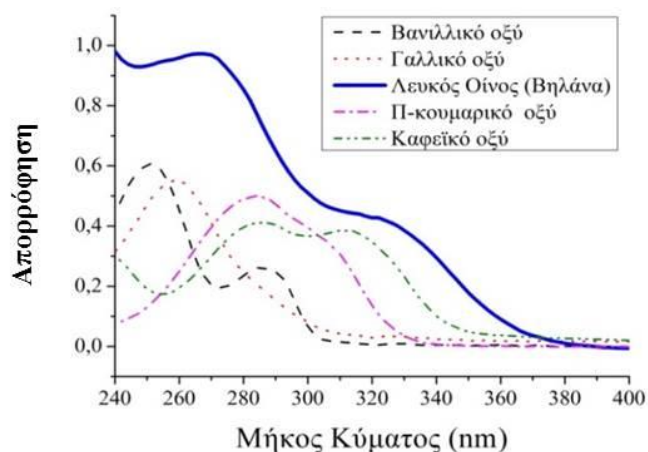
Η συνήθης οργανολογία για τη μέτρηση του φαινομένου της απορρόφησης είναι το φασματοφωτόμετρο. Το φασματοφωτόμετρο αποτελείται από α) μία λυχνία δευτερίου ως πηγή ακτινοβολίας για το υπεριώδες και μία λυχνία αλογόνου για το ορατό και το εγγύς-υπέρυθρο, β) ένα μονοχρωμάτορα που επιτρέπει την ανάλυση του φωτός στις διάφορες συχνότητες (ή μήκη κύματος) και η λειτουργία του βασίζεται στη χρήση πρίσματος ή φράγματος περίθλασης (ως στοιχεία διασποράς), γ) μία κυψελίδα (από χαλαζία που δεν απορροφά στο UV) για την τοποθέτηση των υγρής μορφής δειγμάτων, δ) έναν φωτοπολλαπλασιαστή ή κάποιο φωτοαγωγίμο υλικό που λειτουργεί ως ανιχνευτής της ακτινοβολίας, δηλαδή ένας μετατροπέας του οπτικού σήματος σε ηλεκτρικό, και ε) ένα σύστημα καταγραφής των δεδομένων, όπως απεικονίζεται σχηματικά στην **Εικόνα 3.4**.

Όσον αφορά στην απορρόφηση υπεριώδους-ορατού στον οίνο, ένα τυπικό φάσμα εμφανίζει δύο κορυφές στο υπεριώδες και μία στο ορατό τμήμα. Το μέγιστο (λ_{\max}) της πρώτης κορυφής εμφανίζεται στα 280 nm, το μέγιστο (λ_{\max}) της δεύτερης κορυφής στα 320 nm ενώ το μέγιστο (λ_{\max}) της τρίτης κορυφής στα 520 nm. Οι κορυφές αυτές προκύπτουν από τη συνεισφορά της απορρόφησης φαινολικών ενώσεων [5]. Η μοριακή δομή όλων των φαινολικών ενώσεων αποτελείται από βενζολικούς δακτυλίους, ενώ το φαινόμενο της απορρόφησης οφείλεται στην εκτεταμένη συζυγία των δακτυλίων αυτών (π -δεσμικά και π^* -αντιδεσμικά μοριακά τροχιακά).

Η μέση τιμή των συντελεστών γραμμομοριακής απορροφητικότητας κυμαίνεται στα $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Οι πιο συνηθισμένες οικογένειες φαινολικών ενώσεων είναι 1) τα Βενζοϊκά οξέα, τα οποία συνδέονται περισσότερο με την κορυφή στα 280 nm 2) τα Κιναμωμικά οξέα, τα οποία συνδέονται με την κορυφή στα 320 nm 3) τα Φλαβονοειδή (φλαβονόλες ή φλαβανόλες), τα οποία συνδέονται με τις κορυφές στα 280 nm και στα 320 nm και 4) οι ανθοκυάνες, οι οποίες συνδέονται με τις κορυφές στα 280 nm και στα 520 nm. Στην **Εικόνα 3.5** φαίνεται μια τυπική περίπτωση φάσματος οίνου στο υπεριώδες 240-400 nm, καθώς και τέσσερα φάσματα φαινολικών ενώσεων (Βανιλλικό οξύ, Γαλλικό οξύ, Π-κουμαρικό οξύ και Καφεϊκό οξύ) τα οποία εμπεριέχονται στον οίνο. Η **Εικόνα 3.5** δείχνει την μορφή του φάσματος και πως αυτή συνδέεται με την συνισταμένη συνεισφορά των τεσσάρων φαινολικών ενώσεων.



Εικόνα 3.4. Τυπική διάταξη για τη μέτρηση του φαινομένου της απορρόφησης

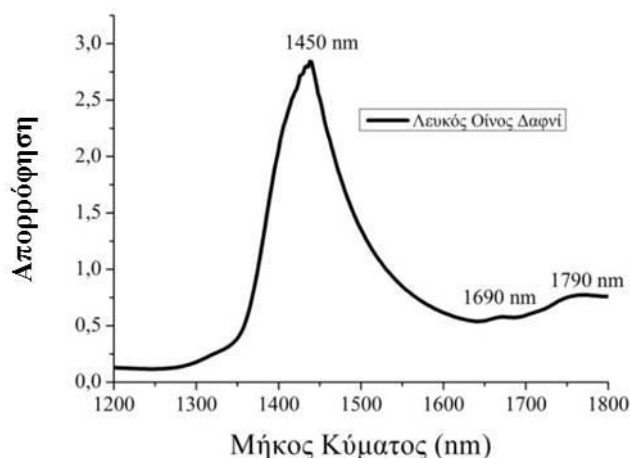


Εικόνα 3.5. Φάσμα απορρόφησης στο υπεριώδες 400-240 nm τεσσάρων φαινολικών οξέων μαζί με το φάσμα απορρόφησης ενός τυπικού λευκού οίνου

3.3 Εγγύς Υπέρυθρο (NIR)

Η απορρόφηση στο υπέρυθρο τμήμα του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος IR (4000-400 cm^{-1} ή 2500-25000 nm) οφείλεται σε δονητικές κινήσεις των ατόμων ενός μορίου (εκτάσεις ή κάμψεις), οι οποίες μεταβάλλουν τη συνολική του διπολική ροπή [6]. Η κάθε κορυφή αντιστοιχεί σε συγκεκριμένη δονητική κίνηση συγκεκριμένου δεσμού ή δεσμών μεταξύ ατόμων. Η απορρόφηση στο εγγύς υπέρυθρο NIR (800-2500 nm) μία περιοχή υψηλότερης ενέργειας από το IR, συνδέεται με τις δονητικές μεταβάσεις στο IR. Οι παρατηρούμενες κορυφές στα φάσματα NIR, είναι αποτέλεσμα του συνδυασμού των μικρότερης ενέργειας θεμελιωδών ταλαντωτικών μεταβάσεων, αλλά και των υπέρτονων αυτών (1^{ης}, 2^{ης}, 3^{ης} τάξης). Οι πλέον συνηθισμένες κορυφές αποδίδονται σε δεσμούς C-C, C-H, N-H, O-H και C=O. Η φασματοσκοπία εγγύς υπέρυθρου αποτελεί μία γρήγορη, μη-καταστρεπτική και

χαμηλού κόστους μέθοδο και κατά τα τελευταία χρόνια έχει ευρεία εφαρμογή στον ποιοτικό και ποσοτικό έλεγχο του οίνου.



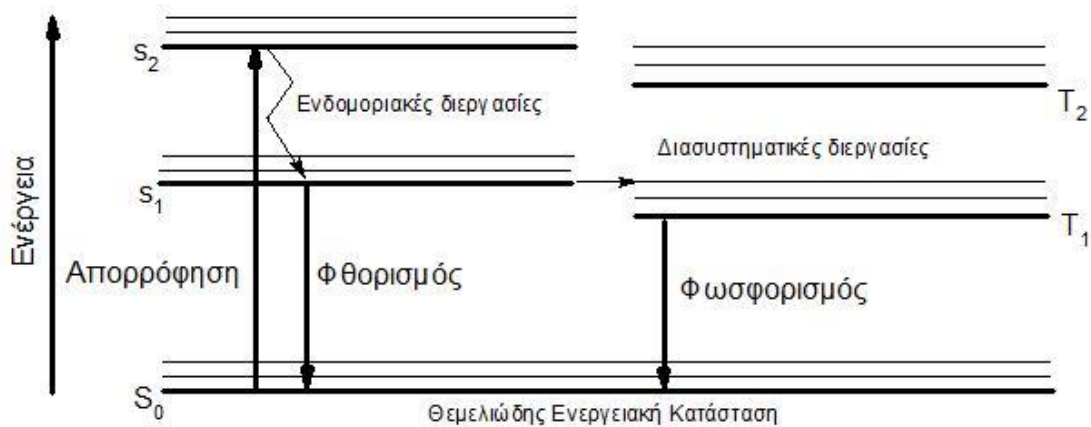
Εικόνα 3.6. Φάσμα απορρόφησης NIR δείγματος Οίνου

Οι κορυφές του φάσματος απορρόφησης του οίνου στο εγγύς υπέρυθρο οφείλονται σε δονητικές κινήσεις των μορίων του νερού, της αιθανόλης και άλλων οργανικών ενώσεων οι οποίες εμπεριέχονται σε αυτόν [7]. Η κύρια κορυφή στα 1450 nm αποδίδεται στην 2^η υπέρτονο έκτασης του δεσμού O-H στο μόριο του νερού και της αιθανόλης, ενώ οι κορυφές στα 1690 nm και στα 1790 nm στην 1^η υπέρτονο δεσμών C-H (Εικόνα 3.6).

3.4 Φασματοσκοπία Φθορισμού

Ως φθορισμός, περιγράφεται το φαινόμενο της εκπομπής υπεριώδους ή ορατής ακτινοβολίας από μία χημική ένωση ή υλικό (φθορίζον υλικό). Το φαινόμενο αυτό έπεται του φαινομένου της απορρόφησης, ενώ οφείλεται στη διέγερση και την αποδιέγερση των μορίων τα οποία συνθέτουν την ύλη [8]. Στο διάγραμμα Jablonski (Εικόνα 3.7), περιγράφεται ο μηχανισμός διέγερσης και αποδιέγερσης ενός μορίου. Το φαινόμενο του φθορισμού λαμβάνει χώρα σε τρία στάδια, στο 1^ο στάδιο έχουμε απορρόφηση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας ($h\nu$) η οποία συνοδεύεται από την ηλεκτρονική και δονητική διέγερση του μορίου, στο 2^ο στάδιο το μόριο που βρίσκεται στη διεγερμένη ηλεκτρονική και δονητική κατάσταση υπόκειται σε διάφορες διεργασίες μερικής αποδιέγερσης (δονήσεις ή άλλες ενδομοριακές διεργασίες) μέσω των οποίων επιστρέφει στο χαμηλότερο δονητικό επίπεδο της πρώτης ηλεκτρονικά διεγερμένης κατάστασης, και τέλος στο 3^ο στάδιο το μόριο

επιστρέφει στη θεμελιώδη ενεργειακή του κατάσταση εκπέμποντας ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία ($h\nu$) χαμηλότερης ενέργειας από αυτήν που αρχικά απορροφήθηκε, η οποία αποτελεί το φθορισμό [9].



Εικόνα 3.7. Διάγραμμα Jablonski - Μηχανισμός διέγερσης και αποδιέγερσης ενός μορίου

Ο χρόνος ζωής του φαινομένου του φθορισμού είναι της τάξεως των 10^{-9} s. Ο φωσφορισμός ένα παρόμοιο αλλά αρκετά πιο αργό φαινόμενο, 10^{-4} s, συνδέεται και αυτός με την επιστροφή του μορίου στη θεμελιώδη ενεργειακή κατάσταση, στην περίπτωση όμως αυτή το ηλεκτρόνιο προέρχεται από μία διαφορετικού τύπου (triplet) ηλεκτρονική διεγερμένη κατάσταση, ενώ για την παρατήρηση του απαιτείται συνήθως διεξαγωγή της μέτρησης σε χαμηλή θερμοκρασία.

Η φασματοσκοπία φθορισμού θεωρείται μία από τις πιο ευαίσθητες αναλυτικές τεχνικές. Σε περιπτώσεις υγρών διαλυμάτων, η ένταση του φθορισμού I_F υπολογίζεται από την σχέση (7).

$$I_F = I_0 \Phi_F (1 - e^{-\epsilon c l}) \quad (7)$$

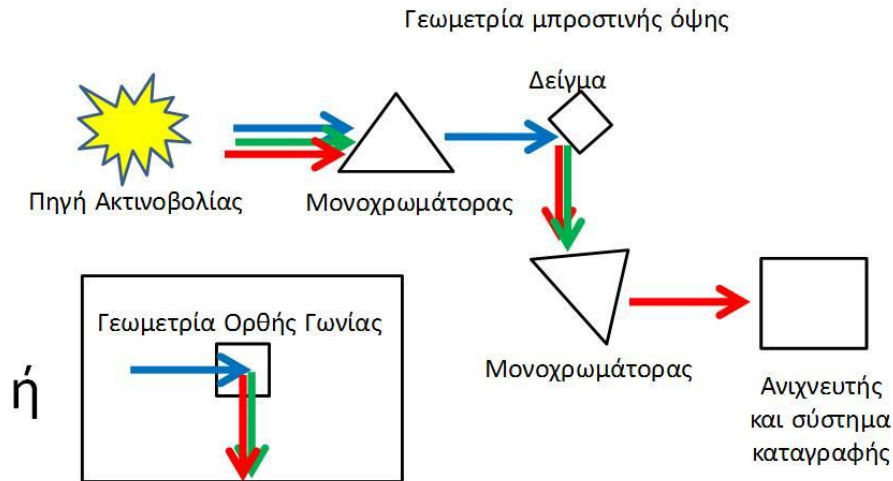
$$I_F = 2.3 I_0 \Phi_F \epsilon c l \quad (8)$$

όπου I_0 : η ένταση της ακτινοβολίας διέγερσης, Φ_F : η κβαντική απόδοση φθορισμού της φθορίζουσας ουσίας, ϵ : η γραμμομοριακή απορροφητικότητα της φθορίζουσας ουσίας, l : το μήκος της οπτικής διαδρομής και c : η συγκέντρωση της φθορίζουσας ουσίας. Για τιμές απορρόφησης $A = \epsilon c l < 0.05$, το φαινόμενο γίνεται γραμμικό και η ένταση του φθορισμού υπολογίζεται από την σχέση (8). Σε αυτήν την περίπτωση, ισχύει η αρχή της προσθετικότητας με τη συνολική ένταση του

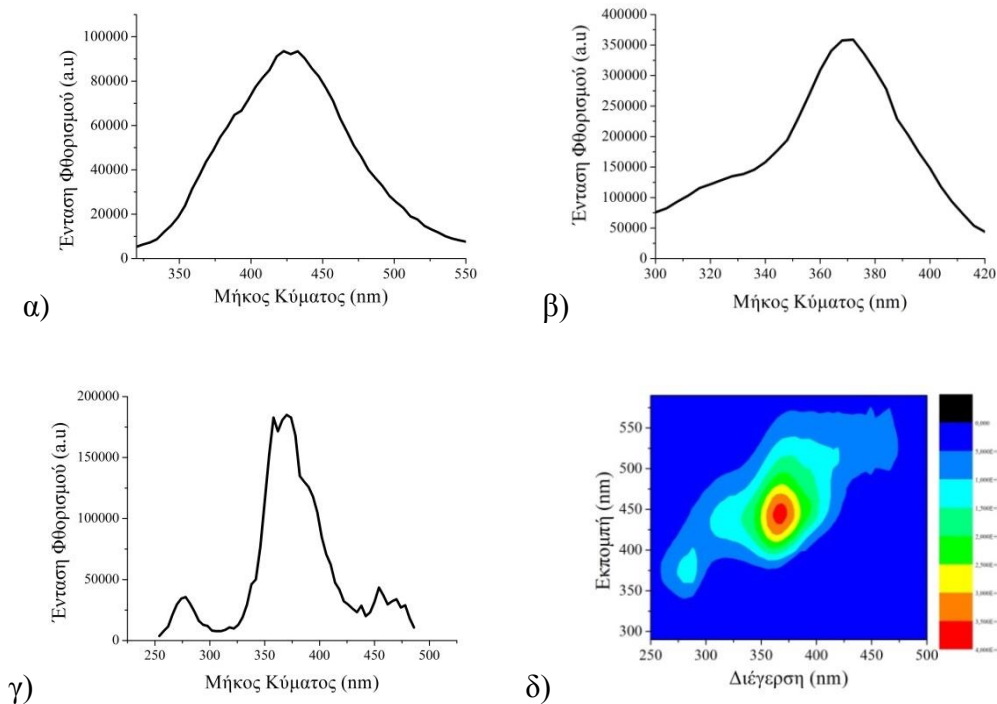
φθορισμού ενός διαλύματος, να προκύπτει από το άθροισμα των εντάσεων του φθορισμού όλων των φθορίζουσών ουσιών που εμπεριέχονται. Κατά τη μέτρηση του φθορισμού σε πολύπλοκα χημικά συστήματα υπάρχουν φαινόμενα τα οποία θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν. Τα φαινόμενα αυτά συνδέονται με ενδομοριακές αντιδράσεις (Quenching) των φθορίζουσών ουσιών, σκέδαση του φωτός και με αλληλεπιδράσεις των φθορίζουσών ουσιών με το μοριακό περιβάλλον. Παράγοντες όπως η συγκέντρωση, ο διαλύτης και ο τρόπος μέτρησης του φαινομένου, είναι ιδιαίτερα κρίσιμοι για την ορθότητα των μετρήσεων.

Η συνήθης οργανολογία για τη μέτρηση του φθορισμού είναι το φασματοφθορισμόμετρο το οποίο αποτελείται από α) μία λυχνία ξένου ή λυχνία υδραργύρου ως πηγή ακτινοβολίας για το υπεριώδες και ορατό τμήμα του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, β) έναν μονοχρωμάτορα ο οποίος ρυθμίζει το μήκος κύματος διέγερσης και έναν δεύτερο μονοχρωμάτορα ο οποίος ρυθμίζει το μήκος κύματος εκπομπής, γ) μία κυψελίδα για τα υγρής μορφής δείγματα, δ) έναν φωτοπολλαπλασιαστή για την ανίχνευση του οπτικού σήματος και ε) ένα σύστημα καταγραφής των δεδομένων. Η πιο συνηθισμένη γεωμετρία για τη μέτρηση του εκπομπής φθορισμού είναι αυτή της ορθής γωνίας (Right-Angle), κατά την οποία σχηματίζεται μία γωνία 90^0 μεταξύ της δέσμης ακτινοβολίας διέγερσης και της παρατήρησης της ακτινοβολίας εκπομπής. Η γεωμετρία αυτή είναι κατάλληλη για τη μέτρηση του φθορισμού σε αραιά διαλύματα φθορίζουσών ουσιών, τα οποία δεν εμφανίζουν έντονα φαινόμενα απορρόφησης, ενώ σε αυτήν τη γωνία ελαχιστοποιούνται φαινόμενα σκέδασης (ελαστική Rayleigh ή ανελαστική Raman) και ανάκλασης.

Σε περιπτώσεις δειγμάτων στερεάς μορφής ή σε πυκνά διαλύματα με έντονα φαινόμενα απορρόφησης, χρησιμοποιείται η γεωμετρία της εμπρόσθιας όψης (Front-Face). Στη γεωμετρία αυτή το φθορίζον υλικό ακτινοβολείται υπό γωνία $30^0 - 60^0$ ως προς την κάθετο της όψης του. Η παρατήρηση και ανίχνευση του φθορισμού πραγματοποιείται υπό γωνία 90^0 σε σχέση με την δέσμη της διεγείρουσας ακτινοβολίας. Στην **Εικόνα 3.8** φαίνεται μία τυπική διάταξη για τη μέτρηση του φαινομένου, με την απεικόνιση τόσο της γεωμετρίας της ορθής γωνίας όσο και της γεωμετρίας της εμπρόσθιας όψης [10].



Εικόνα 3.8. Τυπική διάταξη για τη μέτρηση του φαινομένου του φθορισμού



Εικόνα 3.9. Τρόποι απεικόνισης του Φθορισμού α) Φάσμα Εκπομπής β) Φάσμα Διέγερσης γ) Φάσμα Σύγχρονης Σάρωσης δ) Χάρτης Διέγερσης-Εκπομπής Φθορισμού

Η απεικόνιση του φαινομένου του φθορισμού γίνεται και αυτή με τη μορφή φασμάτων. Διακρίνουμε τρεις κατηγορίες φασμάτων 1) φάσματα εκπομπής, όταν κατά τη μέτρηση το μήκος κύματος διέγερσης, λ_{exc} , παραμένει σταθερό, ενώ μεταβάλλεται το μήκος κύματος εκπομπής, λ_{em} 2) φασμάτα διέγερσης, όταν το μήκος κύματος εκπομπής, λ_{em} , παραμένει σταθερό, ενώ μεταβάλλεται το μήκος κύματος διέγερσης, λ_{exc} 3) φάσματα σύγχρονης σάρωσης, όταν μεταβάλλεται τόσο το μήκος

κύματος εκπομπής όσο και το μήκος κύματος διέγερσης διατηρώντας μια σταθερή διαφορά μεταξύ τους (Δλ). Μία άλλη μορφή απεικόνισης του φαινομένου του φθορισμού, η οποία συνηθίζεται σε περιπτώσεις δειγμάτων με περισσότερα από ένα φθορίζοντα συστατικά είναι αυτή των χαρτών φθορισμού (Excitation Emission Matrices, EEM). Οι χάρτες αυτοί προκύπτουν από την προβολή φασμάτων εκπομπής σε διαφορετικά μήκη κύματος διέγερσης ή από την προβολή φασμάτων διέγερσης σε διαφορετικά μήκη κύματος εκπομπής. Μέσω αυτών των χαρτών λαμβάνουμε μία πλήρη εικόνα για τον συνολικό φθορισμό του εκάστοτε δείγματος. Με αυτήν την απεικόνιση και εξαιτίας του χαρακτηριστικού φασματοσκοπικού αποτυπώματος του κάθε δείγματος, αυξάνεται η εκλεκτικότητα της μεθόδου. Στην **Εικόνα 3.9** φαίνονται οι τέσσερις τρόποι απεικόνισης του φαινομένου του φθορισμού για το ίδιο δείγμα οίνου.

Όσον αφορά στη μοριακή δομή των φθορίζουσών ουσιών συνήθως χαρακτηρίζεται από την παρουσία κάποιου δύσκαμπτου μοριακού σκελετού. Τα μόρια αυτά στερούνται δονητικής ελευθερίας, η οποία θα επέτρεπε τη συνεισφορά ταλαντωτικών κινήσεων για την αποδέσμευση της ενέργειας η οποία έχει απορροφηθεί. Επιπλέον, η διαφορά μεταξύ του ενεργειακού επιπέδου της θεμελιώδους και της πρώτης ηλεκτρονιακής διεγερμένης κατάστασης κυμαίνεται μεταξύ τιμών οι οποίες επιτρέπουν τη δημιουργία του φαινομένου. Οι φθορίζουσες ουσίες του οίνου, ανήκουν στις οικογένειες των φαινολικών ενώσεων, των αμινοξέων και των πρωτεϊνών. Στους χάρτες φθορισμού του οίνου εντοπίζονται δύο κύριες επιφάνειες φθορισμού 1) η πρώτη με διέγερση στην ευρύτερη περιοχή γύρω από τα 280 nm και εκπομπή στην ευρύτερη περιοχή γύρω από τα 360 nm και 2) η δεύτερη με διέγερση γύρω στα 330 nm και εκπομπή γύρω στα 450 nm.

Βιβλιογραφία

1. Αθ. Βαλαβανίδης, Βασικές Αρχές Μοριακής Φασματοσκοπίας και Εφαρμογές στην Οργανική Χημεία: Αλληλεπίδραση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας και ύλης ΣΥΓΧΡΟΝΑ ΘΕΜΑΤΑ (2008), σσ. 19-22.
2. Αθ. Βαλαβανίδης, Βασικές Αρχές Μοριακής Φασματοσκοπίας και Εφαρμογές στην Οργανική Χημεία: Υπεριώδης και ορατή Φασματοσκοπία. ΣΥΓΧΡΟΝΑ ΘΕΜΑΤΑ (2008), σσ. 217-218.

3. Αθ. Βαλαβανίδης, Βασικές Αρχές Μοριακής Φασματοσκοπίας και Εφαρμογές στην Οργανική Χημεία: Υπεριώδης και ορατή Φασματοσκοπία. ΣΥΓΧΡΟΝΑ ΘΕΜΑΤΑ (2008), σσ. 223-226.
4. D.C. Harris, Quantitative Chemical Analysis. Macmillan (2010)
5. R. Sanna, C. Piras, F.C. Marincola, V. Lecca, S. Maurichi, P.Scano, Multivariate Statistical Analysis of the UV-Vis Profiles of Wine Polyphenolic Extracts during Vinification. *Journal of Agricultural Science*. 2014, **6** (12), 152-162
6. B. Stuart, Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications. John Wiley & Sons (2004)
7. D. Cozzolino, H.E. Smyth, M. Gishen, Feasibility study on the use of visible and Near-Infrared Spectroscopy together with Chemometrics to discriminate between commercial white wines of different varietal origins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2003, **51**, 7703-7708
8. J. R. Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy. Springer (2006)
9. J. Christensen, L. Nørgaard, R. Bro, S. B. Engelsen, Multivariate Autofluorescence of Intact Food Systems. *Chemical Reviews*. 2005, **106** (6), 1979-1994
10. J. R. Lakowicz, Instrumentation for Fluorescence Spectroscopy, in Principles of Fluorescence Spectroscopy, Ch. 2, Springer (2006)

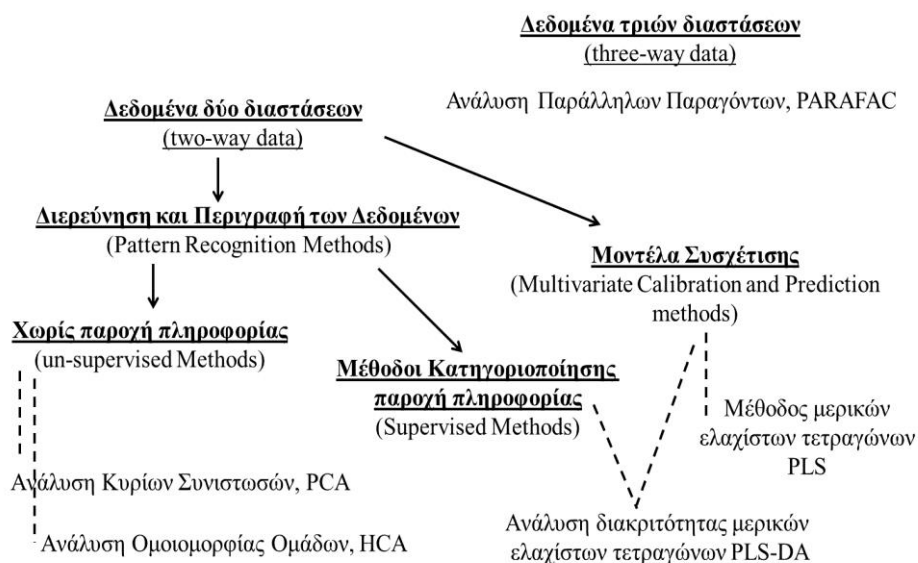
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Χημειομετρία

4.1 Χημειομετρικές Μέθοδοι

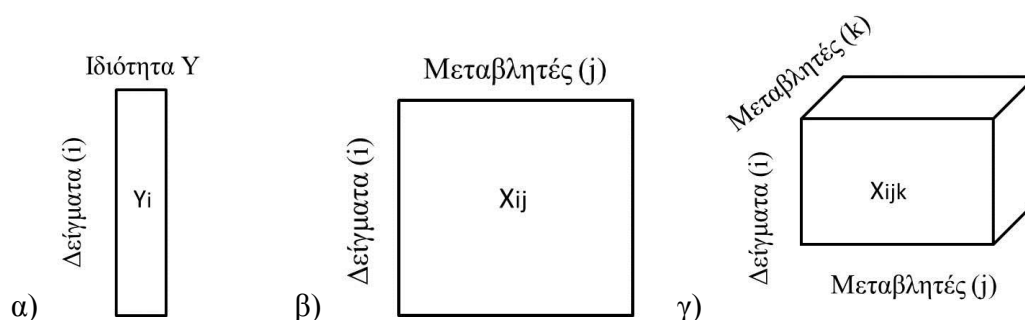
Η Χημειομετρία ορίζεται ως το επιστημονικό πεδίο το οποίο χρησιμοποιεί τη στατιστική, τα μαθηματικά και την επιστήμη των υπολογιστών με σκοπό τον βέλτιστο σχεδιασμό μίας πειραματικής διαδικασίας και τη βέλτιστη αξιολόγηση των δεδομένων τα οποία προκύπτουν από αυτή. Αφ' ενός, η εξέλιξη των αναλυτικών τεχνικών με την επίτευξη χαμηλού κόστους, γρήγορης και ταυτόχρονης ανάλυσης πολλών μεταβλητών και αφ' ετέρου η διαδεδομένη χρήση των ηλεκτρονικών υπολογιστών, βοήθησαν την ανάπτυξη και την εξέλιξη αυτού του επιστημονικού πεδίου. Ήδη από τη δεκαετία του 1970, πρωτοπόροι του είδους αλλά και δημιουργοί της διεθνούς χημειομετρικής κοινότητας, ήταν ο Σουηδός **Svante Wold** και ο Αμερικάνος **Bruce Kowalski** [1].

Χημειομετρικές Μέθοδοι



Εικόνα 4.1. Χημειομετρικές μέθοδοι οι οποίες χρησιμοποιούνται στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή

Σήμερα, απαντώνται χημειομετρικές μέθοδοι με εφαρμογές σε διάφορους τομείς της χημείας όπως η βιοχημεία, η χημική μηχανική και η χημεία των τροφίμων. Οι μέθοδοι με σκοπό τη βέλτιστη αξιολόγηση των πειραματικών δεδομένων, διακρίνονται σε δύο κύριες κατηγορίες (**Εικόνα 4.1**). Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει αυτές οι οποίες στοχεύουν στη μελέτη και στην περιγραφή των δεδομένων (Pattern Recognition Methods) και υποδιαιρούνται σε αυτές στις οποίες παρέχεται κάποια αρχική πληροφορία για τα δεδομένα (Supervised Methods) και σε αυτές στις οποίες δεν παρέχεται καμία απολύτως πληροφορία (un-Supervised Methods), αλλά η πιθανή πληροφορία προκύπτει μετά τη διερευνητική χημειομετρική τους ανάλυση. Στη δεύτερη κατηγορία μεθόδων τα δεδομένα χρησιμοποιούνται με σκοπό τη δημιουργία μοντέλων συσχέτισης τα οποία έχουν τη δυνατότητα να προβλέπουν ιδιότητες ή φυσικοχημικά χαρακτηριστικά αγνώστων δειγμάτων (Multivariate Calibration and Prediction Methods). Βασικό στοιχείο μίας ορθής χημειομετρικής ανάλυσης, είναι η επιλογή της κατάλληλης χημειομετρικής μεθόδου (διαχωρισμός, πρόβλεψη, κατηγοριοποίηση κ.ο.κ) [2].



Εικόνα 4.2. Τρόποι απεικόνισης των πειραματικών δεδομένων α) Ιδιότητα Y β) Δισδιάστατος πίνακας X γ) Τρισδιάστατος πίνακας X

Οι χημειομετρικές μέθοδοι βασίζονται στην αριθμητική γραμμική άλγεβρα και στα μαθηματικά πινάκων. Στις περισσότερες των περιπτώσεων, τα δεδομένα είναι δύο διαστάσεων και αποτελούνται από φάσματα απορρόφησης ή φθορισμού, τα οποία συνήθως απεικονίζονται με τη μορφή πινάκων $X(i, j)$ όπου i : ο αριθμός των δειγμάτων και j : ο αριθμός των μεταβλητών (μήκη κύματος) (**Εικόνα 4.2β**). Διανύσματα της μορφής $Y(i)$ χρησιμοποιούνται για να αναπαραστήσουν ιδιότητες ή φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων (**Εικόνα 4.2α**). Σε κάποιες περιπτώσεις όπως στους χάρτες φθορισμού τα δεδομένα είναι τριών διαστάσεων, ενώ για την

απεικόνιση τους απαιτείται μία κυβική δομή $X(i, j, k)$ όπου k : ο αριθμός των μεταβλητών σε μία 3^η διάσταση (**Εικόνα 4.2γ**).

Ακολουθεί μία συνοπτική περιγραφή των μεθόδων οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή. Αυτές είναι η ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA), η τεχνική μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS), η διακριτική ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA) και η ανάλυση παράλληλων παραγόντων (PARAFAC). Παράλληλα με αυτές δοκιμάστηκαν και άλλες μέθοδοι, όπως η γραμμική διακριτική ανάλυση (Linear Discriminant Analysis, LDA), η μέθοδος (Soft Independent Modeling of Class Analogies, SIMCA) και η μέθοδος (K Nearest Neighbors, K-NN) με παρόμοια ή υποδεέστερα αποτελέσματα.

4.2 Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών

Η Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA) ανήκει στην κατηγορία των διερευνητικών μεθόδων στις οποίες δεν παρέχεται κάποια αρχική πληροφορία (Un-Supervised Pattern Recognition Method). Αποτελεί μία από τις παλαιότερες και πιο διαδεδομένες μεθόδους για την αρχική διερεύνηση δεδομένων με πολλές μεταβλητές, στοχεύει στη μείωση των αρχικών μεταβλητών και στον εντοπισμό γραμμικών συνδυασμών τους (Κύριες Συνιστώσες). Η διαδικασία γίνεται με τέτοιο τρόπο, ώστε οι κύριες συνιστώσες να περιγράφουν το μέγιστο ποσοστό της διακύμανσης των δεδομένων. Η μέθοδος βασίζεται στην αποσύνθεση του πίνακα X μέσω της επίλυσης ενός προβλήματος γραμμικής άλγεβρας (ίδιο-τιμών και ίδιο-διανυσμάτων).

$$\begin{array}{|c|} \hline j \\ \hline \mathbf{X} \\ \hline i \end{array} = \begin{array}{|c|} \hline k \\ \hline \mathbf{T} \\ \hline i \end{array} \begin{array}{|c|} \hline j \\ \hline \mathbf{P} \\ \hline k \end{array} + \begin{array}{|c|} \hline j \\ \hline \mathbf{E} \\ \hline i \end{array}$$

Εικόνα 4.3. Σχηματική αναπαράσταση του μαθηματικού μοντέλου της ανάλυσης κύριων συνιστωσών

Τελικά, τα δεδομένα του πίνακα X περιγράφονται από ένα γινόμενο πινάκων TP και έναν υπολειμματικό πίνακα E , όπως φαίνεται στην **Εικόνα 4.3**. Ο πίνακας T ή πίνακας συντεταγμένων αντιστοιχεί στις τιμές των δειγμάτων στις κύριες συνιστώσες

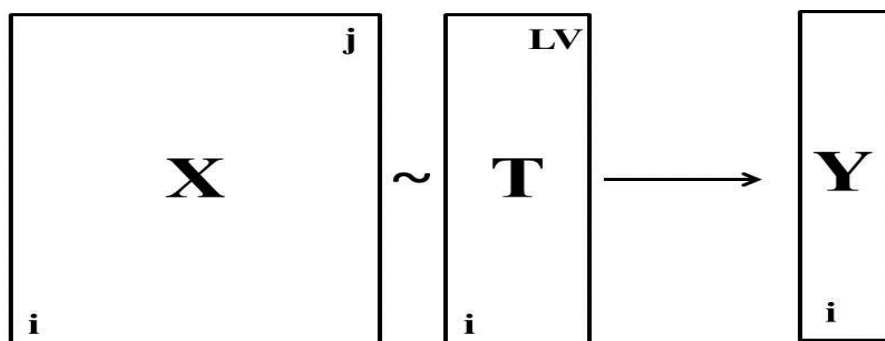
(k). Ο συνολικός αριθμός των κύριων συνιστωσών μπορεί να είναι μέχρι και ίσος με τον αρχικό αριθμό των μεταβλητών, αλλά συνήθως οι πρώτες κύριες συνιστώσες, περιγράφουν το μεγαλύτερο ποσοστό της διακύμανσης των δεδομένων. Η προβολή των τιμών των πρώτων κύριων συνιστωσών σε ένα σύστημα αξόνων δημιουργεί τα λεγόμενα Score Plots. Με τα Score Plots επιτυγχάνεται η απεικόνιση των δειγμάτων ως σημεία σε ένα μονοδιάστατο $k=1$, δισδιάστατο $k=2$ ή και τρισδιάστατο χώρο $k=3$. Μέσω αυτής της απεικόνισης είναι δυνατόν να αναδειχθούν ενδιαφέρουσες πληροφορίες για τα δείγματα, όπως ομοιότητες ή διαφορές μεταξύ αυτών, ομαδοποιήσεις και εντοπισμός δειγμάτων με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά (Outliers).

Ο πίνακας \mathbf{P} ή πίνακας φορτίων αντιστοιχεί στη συνεισφορά των αρχικών μεταβλητών (j) στις κύριες συνιστώσες. Η προβολή της συνεισφοράς γίνεται με τα λεγόμενα Loading Plots. Τα Loading Plots των φασματοσκοπικών δεδομένων συνηθίζεται να προβάλλονται σε μία διάσταση έχοντας τη μορφή φάσματος. Η συγκεκριμένη μορφή απεικόνισης προσφέρει τη δυνατότητα χημικής ερμηνείας των διαφορών τάσεων που έχουν ήδη εντοπιστεί από τα Score Plots. Πέραν από τα Score και τα Loading Plots, η ανάλυση κύριων συνιστωσών συνοδεύεται από άλλα διαγνωστικά τεστ (παραμετρικά ή διαγραμματικά), τα οποία αξιολογούν την ικανότητα της μεθόδου όσον αφορά στη μοντελοποίηση των δεδομένων (Scree Plot, Explained Variance, Residual Information κ.ά.) [3].

4.3 Τεχνική Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων

Η Τεχνική Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (PLS) χρησιμοποιεί δεδομένα με σκοπό τη δημιουργία μοντέλων πρόβλεψης και ανήκει στις πολυπαραμετρικές μεθόδους βαθμονόμησης (Multivariate Calibration Methods). Η τεχνική λειτουργεί με παρόμοιο τρόπο όπως η ανάλυση κύριων συνιστωσών, στοχεύοντας στη μείωση των αρχικών μεταβλητών και στον εντοπισμό γραμμικών συνδυασμών τους, οι οποίοι σε αυτήν την περίπτωση ονομάζονται λανθάνουσες μεταβλητές (Latent Variables). Η διαφοροποίηση όσον αφορά στη διαδικασία εντοπισμού των γραμμικών συνδυασμών σε αυτήν τη μέθοδο σε σχέση με την ανάλυση κύριων συνιστωσών έγκειται στο γεγονός ότι ο εντοπισμός γίνεται με τέτοιο τρόπο ώστε να περιγράφεται το μέγιστο της συνδιακύμανσης (και όχι μόνο της διακύμανσης του πίνακα X) μεταξύ των δεδομένων του αρχικού πίνακα X και ενός διανύσματος Y το οποίο περιγράφει κάποια ζητούμενη ιδιότητα, η οποία έχει προκύψει από μία μέθοδο αναφοράς. Οι

μεταβλητές του πίνακα X ονομάζονται (ανεξάρτητες μεταβλητές), ενώ οι μεταβλητές του πίνακα Y (εξαρτημένες μεταβλητές).



Εικόνα 4.4. Σχηματική αναπαράσταση του μαθηματικού μοντέλου της τεχνικής μερικών ελαχίστων τετραγώνων

Μετά την αποσύνθεση του πίνακα X σε ένα πίνακα T (λανθάνουσες μεταβλητές), ο πίνακας T συμμετέχει στην επίλυση ενός προβλήματος ελαχίστων τετραγώνων με πολλές μεταβλητές (**Εικόνα 4.4**). Από την επίλυση του προβλήματος προκύπτει η σχέση (1), η οποία συνδέει τις λανθάνουσες μεταβλητές των φασματοσκοπικών δεδομένων με τη ζητούμενη ιδιότητα. Σε μεταγενέστερο στάδιο και αφού προηγηθεί η πιστοποίηση του μοντέλου πρόβλεψης, η σχέση (1) μπορεί να χρησιμοποιήσει τις ανεξάρτητες μεταβλητές αγνώστων δειγμάτων με σκοπό τον προσδιορισμό της ζητούμενης ιδιότητας.

$$y_i = T_i \mathbf{b} + e_i \quad (1)$$

y_i : η τιμή της ζητούμενης ιδιότητας για το κάθε δείγμα i ,

\mathbf{b} : διανύσματα με τη συνεισφορά τους στην κάθε λανθάνουσα μεταβλητή [4].

Για την αξιολόγηση της ικανότητας της μεθόδου στη μοντελοποίηση και στη συσχέτιση των δεδομένων, χρησιμοποιούνται δείκτες όπως ο συντελεστής συσχέτισης r^2 , το σφάλμα πρόβλεψης μετά την εσωτερική αξιολόγηση (Root Mean Square Error of Cross Validation, RMSECV ή Standard Error of Cross Validation, SECV) και το σφάλμα πρόβλεψης σε άγνωστα δείγματα (Root Mean Square Error of Prediction, RMSEP ή Standard Error of Prediction, SEP). Ο συντελεστής r^2 παίρνει τιμές στο εύρος από 0 έως 1, το RMSECV ή SECV και το RMSEP ή SEP υπολογίζονται σε ίδιες μονάδες με αυτές της ζητούμενης ιδιότητας. Τιμές r^2 κοντά στη μονάδα θεωρούνται ιδανικές, ενώ όσο μικρότερη η τιμή των σφαλμάτων πρόβλεψης τόσο καλύτερη η προβλεπτική ικανότητα του μοντέλου.

Εκτός από τους προαναφερθέντες στατιστικούς δείκτες αξιολόγησης, ένας άλλος δείκτης ο οποίος συνδέει τα πειραματικά δεδομένα της μεθόδου αναφοράς με την προβλεπτική ικανότητα του μοντέλου είναι η υπολειπόμενη απόκλιση πρόβλεψης (Residual Predictive Deviation, RPD). Ο δείκτης RPD προκύπτει αριθμητικά από τη διαίρεση της τυπικής απόκλισης (Standard Deviation, SD) της μέσης τιμής των δειγμάτων στη μετρούμενη ιδιότητα (μέθοδος αναφοράς) με το σφάλμα πρόβλεψης RMSECV ή SECV, το οποίο προκύπτει από την τεχνική των μερικών ελαχίστων τετραγώνων. Τιμές RPD μικρότερες από < 1 χαρακτηρίζουν ένα μη αξιόπιστο μαθηματικό μοντέλο, τιμές RPD από 1 έως 1.4 χαρακτηρίζουν ένα μη αξιόπιστο μαθηματικό μοντέλο πρόβλεψης, το οποίο όμως μπορεί να χρησιμοποιηθεί ενδεικτικά για να δείξει μία τάση συσχετισμού μεταξύ των μεθόδων (εφόσον αυτή υπάρχει). Τιμές RPD μεταξύ των τιμών 1.4 - 2.0 χαρακτηρίζουν ένα αξιόπιστο μοντέλο ικανό να προβλέψει με επιτυχία τη μετρούμενη παράμετρο, ενώ τιμές RPD μεγαλύτερες από 2.0 χαρακτηρίζουν ένα εξαιρετικό μαθηματικό μοντέλο πρόβλεψης [5].

4.4 Μέθοδοι Κατηγοριοποίησης

Οι μέθοδοι κατηγοριοποίησης ανήκουν στις περιγραφικές μεθόδους στις οποίες παρέχονται πληροφορίες για τα δεδομένα (Supervised Pattern Recognition Methods). Οι πληροφορίες αυτές μπορεί να είναι η ομάδα στην οποία ανήκει το κάθε δείγμα (γεωγραφική προέλευση, βοτανική προέλευση, διαφορετικός τρόπος επεξεργασίας κ.ά.). Οι παρεχόμενες πληροφορίες δύναται να έχουν προκύψει μετά από μία αρχική χημειομετρική διερεύνηση ή να είναι προκαθορισμένες με κριτήρια ανεξάρτητα της πειραματικής διαδικασίας. Σκοπός των μεθόδων κατηγοριοποίησης, είναι η αξιολόγηση των δεδομένων, όσον αφορά στην ικανότητα τους ή όχι, να κατατάσσουν τα δείγματα στις προκαθορισμένες ομάδες. Ο τρόπος με τον οποίο γίνεται αυτή η κατάταξη βασίζεται σε κάποιο μοντέλο συσχέτισης και διαφέρει από μέθοδο σε μέθοδο. Διακρίνονται μέθοδοι με πιο απλά (LDA, SIMCA, KNN) ή πιο πολύπλοκα μοντέλα (PLS-DA) [6]. Η λογική σε όλες τις μεθόδους είναι παρόμοια και στοχεύει στην κατασκευή ενός μοντέλου, το οποίο θα συσχετίζει τον πίνακα X (training set) των ανεξάρτητων μεταβλητών με έναν άλλο πίνακα ο οποίος αντιπροσωπεύει την ομάδα των δειγμάτων. Για την αξιολόγηση του μοντέλου χρησιμοποιούνται τεχνικές οι οποίες ακολουθούν την εξής διαδικασία 1) διασταυρωτικός αποκλεισμός δειγμάτων (Cross Validation) 2) κατασκευή μοντέλου με τα υπολειπόμενα δείγματα 3) έλεγχος της ικανότητας του μοντέλου ως προς την

ορθή κατηγοριοποίηση των αποκλεισθέντων δειγμάτων 4) επανάληψη των βημάτων 1-3 σε διαφορετικά δείγματα του αρχικού πίνακα X. Μετά την πιστοποίηση του, το μοντέλο χρησιμοποιείται για την πρόβλεψη της ομάδας αγνώστων δειγμάτων. Ο συνήθης τρόπος παρουσίασης των αποτελεσμάτων τα οποία προκύπτουν από αυτές τις μεθόδους γίνεται μέσω τετραγωνικών πινάκων (Confusion Matrices). Οι πίνακες αυτοί αποτελούνται από σειρές που αναπαριστούν την πραγματική ομάδα στην οποία ανήκουν τα δείγματα και στήλες που αναπαριστούν την προβλεπόμενη ομάδα (Εικόνα 4.5).

Προβλεπόμενη Ομάδα \ Πραγματική Ομάδα	A	B	C
	A	N_A	0
B	0	N_B	0
C		0	N_C

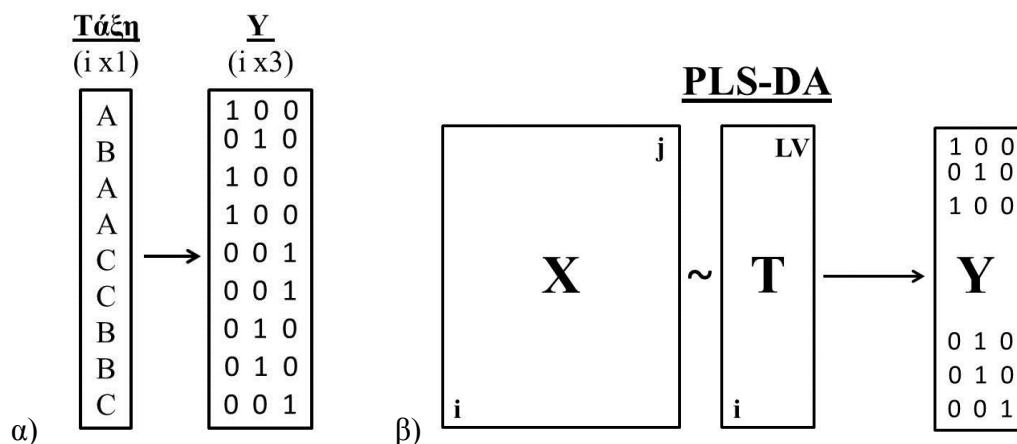
Εικόνα 4.5. Μορφή απεικόνισης τετραγωνικού πίνακα αναπαράστασης (Confusion Matrix) αποτελεσμάτων μεθόδων κατηγοριοποίησης σε μία ιδανική περίπτωση κατηγοριοποίησης

Σε μία ιδανική περίπτωση κατηγοριοποίησης, ένας τέτοιος πίνακας εμπεριέχει μηδενικές τιμές για όλα τα στοιχεία του, εκτός από αυτά που βρίσκονται στη διαγώνιο (όπου N_A ή N_B ή N_C : ο αριθμός των δειγμάτων που ανήκουν στην κατηγορία A, B ή C, αντίστοιχα). Η ευαισθησία (Sn-sensitivity), η επιλεκτικότητα (Sp-specificity), η ακρίβεια (accuracy) και το σφάλμα (Error Rate) είναι στατιστικοί δείκτες οι οποίοι δύναται να προκύψουν από τέτοιους πίνακες. Στη συνέχεια περιγράφεται η μέθοδος της ανάλυσης διακριτότητας μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA).

4.4.1 Ανάλυση Διακριτότητας Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων

Η ανάλυση διακριτότητας μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA) είναι μία γραμμική μέθοδος κατηγοριοποίησης, η οποία χρησιμοποιεί την τεχνική μερικών ελαχίστων τετραγώνων με σκοπό τη διάκριση δειγμάτων βάσει της προκαθορισμένης τους ομάδας. Οι προκαθορισμένες ομάδες αναπαρίστανται μέσω ενός πίνακα Y (Dummy Matrix) ο οποίος προκύπτει από τη μαθηματική αναπαράσταση της ομάδας στην οποία ανήκει το κάθε δείγμα (Εικόνα 4.6α). Ο πίνακας Y συσχετίζεται με έναν

πίνακα T (λανθάνουσες μεταβλητές) ο οποίος έχει προκύψει από την αποσύνθεση του αρχικού πίνακα X των ανεξάρτητων μεταβλητών (Εικόνα 4.6β).



Εικόνα 4.6. Περιγραφή PLS-DA α) Μετατροπή διανύσματος ομάδων σε μαθηματικό πίνακα Y β) Αποσύνθεση πίνακα X , δημιουργία πίνακα T και συσχέτιση με πίνακα Y

Η αποσύνθεση του πίνακα X και η αντικατάσταση του από τον πίνακα T των λανθάνουσων μεταβλητών γίνεται με τέτοιο τρόπο ώστε να περιγράφεται το μέγιστο της συνδιακύμανσης μεταξύ των δεδομένων του αρχικού πίνακα X και του πίνακα Y όπως ακριβώς και στην περίπτωση της τεχνικής των μερικών ελαχίστων τετραγώνων. Σε αντίθεση με άλλες μεθόδους κατηγοριοποίησης, οι οποίες πολλές φορές αδυνατούν να κατατάξουν όλα τα δείγματα σε κάποια συγκεκριμένη ομάδα, η μέθοδος της ανάλυσης διακρίτοτητας μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA), κατατάσσει όλα ανεξαιρέτως τα δείγματα σε κάποια ομάδα. Επιπλέον πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι 1) η γραφική αναπαράσταση των δειγμάτων σε έναν υπερχώρο που ορίζεται από τις λανθάνουσες μεταβλητές (Score Plots) καθώς και 2) η γραφική αναπαράσταση της συσχέτισης των αρχικών ανεξάρτητων μεταβλητών με τις λανθάνουσες μεταβλητές (Loading Plots) [7].

4.5 Δεδομένα Πολλών Διαστάσεων

Ο μεγάλος όγκος δεδομένων από πλειάδα αναλυτικών τεχνικών, σε συνδυασμό με την αυξανόμενη ανάγκη παράλληλης μελέτης τους, καθώς και η ραγδαία ανάπτυξη των ηλεκτρονικών υπολογιστών, δημιουργούν τις συνθήκες για την επεξεργασία δεδομένων σε πολλές διαστάσεις (Multiway Data). Τα δεδομένα αυτά μπορούν να προκύψουν από πολλά παράλληλα πειράματα ή από απλά μία πολύπλοκη πειραματική διαδικασία [8]. Η μελέτη χαρτών φθορισμού (Excitation

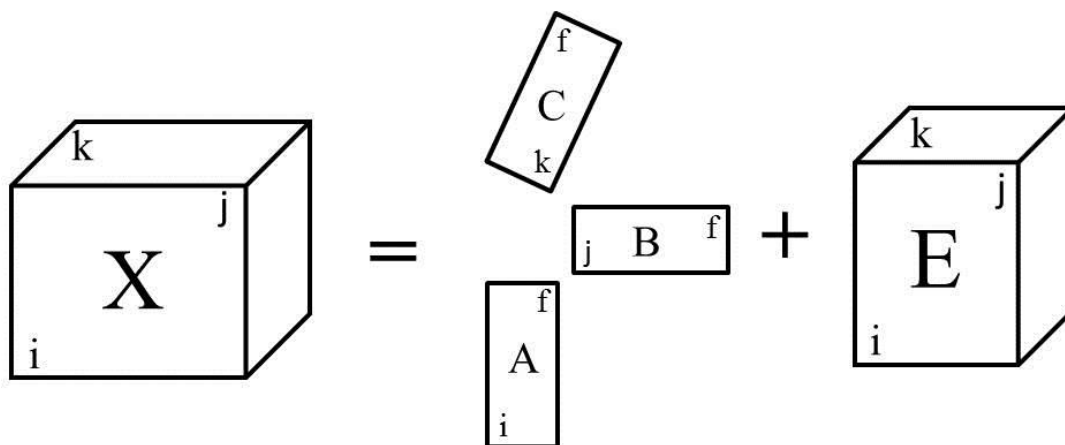
Emission Matrices, EEM) διαφορετικών δειγμάτων, οι οποίοι προκύπτουν από τη μέτρηση φασμάτων εκπομπής σε διαφορετικά μήκη κύματος διέγερσης, θεωρείται μία κλασσική περίπτωση δεδομένων πολλών διαστάσεων. Τα δεδομένα αυτά είναι τριών διαστάσεων (three way data) και αναπαρίστανται μέσω μίας κυβικής δομής X . Το κάθε στοιχείο x_{ijk} αυτής της δομής αντιστοιχεί στην ένταση του φθορισμού, ενώ χαρακτηρίζει το δείγμα (i), το μήκος κύματος διέγερσης (j) και το μήκος κύματος εκπομπής (k) (**Εικόνα 4.2γ**).

Για τη χημειομετρική ανάλυση τέτοιου είδους δεδομένων υπάρχουν οι εξής δύο προσεγγίσεις 1) η εκδίπλωση της κυβικής διάταξης X_{ijk} από την οποία προκύπτει ένας δισδιάστατος πίνακας $X_{i(jk)}$ και η περαιτέρω χημειομετρική του ανάλυση μέσω της ανάλυσης κύριων συνιστωσών (U-PCA) 2) η χημειομετρική ανάλυση της κυβικής διάταξης X_{ijk} (χωρίς τη μετατροπή της αρχικής δομής των δεδομένων) μέσω μίας χημειομετρικής μεθόδου πολλών διαστάσεων, όπως η μέθοδος ανάλυσης παράλληλων παραγόντων (PARAFAC). Τόσο η πρώτη όσο και η δεύτερη προσέγγιση είναι αποδεκτές και εφαρμόσιμες [9]. Χαρακτηριστικά της δεύτερης προσέγγισης όπως η χρησιμοποίηση λιγότερων παραμέτρων, η μοναδικότητα των λύσεων και η μικρότερη ευαισθησία (αποφυγή περιγραφής θορύβου) οδηγεί σε πιο ακριβή, αξιόπιστα και ευκολότερα στην ερμηνεία μοντέλα [10].

4.5.1 Ανάλυση Παράλληλων Παραγόντων

Η ανάλυση παράλληλων παραγόντων (PARAFAC) είναι μία μέθοδος ανάλυσης δεδομένων πολλών διαστάσεων (Multi-Way Method), θεωρείται ως μία γενίκευση της μεθόδου ανάλυσης κύριων συνιστωσών (PCA), αν και ο τρόπος λειτουργίας του μαθηματικού μοντέλου είναι διαφορετικός. Η μέθοδος βασίζεται σε μαθηματικά τα οποία σχετίζονται με πράξεις μεταξύ τανυστών (Tensors). Όπως και στην περίπτωση της ανάλυσης κύριων συνιστωσών, η περιγραφή των δεδομένων γίνεται μέσω πινάκων οι οποίοι έχουν προκύψει από την αποσύνθεση της αρχικής δομής X η οποία τα περιγράφει. Ο αριθμός των πινάκων ισούται με τις αρχικές διαστάσεις των δεδομένων. Όταν οι διαστάσεις είναι τρεις, η κυβική πλέον διάταξη X των αρχικών δεδομένων, περιγράφεται από το γινόμενο πινάκων A , B και C (**Εικόνα 4.7**). Ο πίνακας τιμών A ή πίνακας συντεταγμένων αντιστοιχεί στις τιμές των δειγμάτων στους κύριους παράγοντες με τη γραφική τους αναπαράσταση να δίνει τα γνωστά Score Plots, ενώ οι πίνακες B και C (πίνακες φορτίου) αντιστοιχούν στη

συνεισφορά των μεταβλητών στους κύριους παράγοντες με τη γραφική τους αναπαράσταση να δίνει τα γνωστά Loading Plots.



Εικόνα 4.7. Σχηματική αναπαράσταση του μαθηματικού μοντέλου της ανάλυσης παράλληλων παραγόντων

Το κάθε στοιχείο x_{ijk} της αρχικής κυβικής διάταξης X προκύπτει από τη σχέση (2).

$$x_{ijk} = \sum_{f=1}^k a_{if} b_{jf} c_{kf} + e_{ijk} \quad (2)$$

Το συγκεκριμένο μοντέλο σε αντίθεση με την περίπτωση της ανάλυσης κύριων συνιστωσών, δεν περιορίζεται από το κριτήριο ότι οι παράγοντες (κύριες συνιστώσες) θα πρέπει να είναι κάθετοι μεταξύ τους. Αυτή η μοναδικότητα στη λύση του μαθηματικού προβλήματος (Uniqueness), προσφέρει στο συγκεκριμένο μοντέλο τη δυνατότητα μίας καλύτερης χημικής ερμηνείας των αποτελεσμάτων. Έτσι κατά τη μοντελοποίηση των χαρτών φθορισμού, τα Loading Plots του κάθε παράγοντα μπορούν να ταυτιστούν πλήρως με το φάσμα διέγερσης και εκπομπής φθορίζουσών ουσιών οι οποίες εμπεριέχονται στα δείγματα, ενώ οι τιμές στα Score Plots αντικατοπτρίζουν τη σχετική συγκέντρωση των φθορίζουσών ουσιών στο κάθε δείγμα. Για την επίτευξη μίας τέτοιας επιτυχημένης χημικής ερμηνείας, απαιτείται η γνώση του αριθμού των φθορίζουσών ουσιών, οι οποίες εμπεριέχονται στα δείγματα και με βάση αυτό να γίνει μία εύστοχη επιλογή του αριθμού των παράλληλων παραγόντων, οι οποίοι περιγράφουν το μελετώμενο σύστημα. Άλλα απαραίτητα στοιχεία είναι η πολύ καλή γνώση της χημείας των δειγμάτων και της αλληλεπίδρασης τους με την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, η απαλλαγή των δεδομένων από πληροφορία η οποία δεν σχετίζεται με αυτό καθ' αυτό το φαινόμενο

του φθορισμού και η δημιουργία ενός αξιόπιστου μοντέλου προσαρμοσμένο στο μελετώμενο χημικό σύστημα. Για την αξιολόγηση της αξιοπιστίας και της αποδοτικότητας του μοντέλου της ανάλυσης παράλληλων παραγόντων χρησιμοποιούνται τεχνικές και παράμετροι όπως οι τεχνικές Split Half Analysis, Core Consistency, Residual Analysis κ.ά.

4.6 Προ-Επεξεργασία Δεδομένων

Η προ-επεξεργασία των δεδομένων έχει ως σκοπό είτε την εξάλειψη φαινομένων τα οποία δεν σχετίζονται με το προς μελέτη φαινόμενο (απορρόφηση ή φθορισμός), είτε την ανάδειξη συγκεκριμένων στοιχείων των δεδομένων που δύναται να έχουν κάποια ιδιαίτερη σημασία. Οι τρόποι προ-επεξεργασίας των δεδομένων διακρίνονται σε εκείνους οι οποίοι εφαρμόζονται ως προς το κάθε δείγμα (κατά μήκος των σειρών (i) του πίνακα X(i,j)) και σε εκείνους οι οποίοι εφαρμόζονται ως προς την κάθε μεταβλητή (κατά μήκος των στηλών (j) του πίνακα X(i,j)). Όσον αφορά στην προ-επεξεργασία ως προς το δείγμα, διακρίνονται οι περιπτώσεις της κανονικοποίησης (Normalization), της ανάδειξης της σημαντικότητας κάποιων δειγμάτων (Sample Weighting), της ομαλοποίησης του φάσματος (Smoothing) και της διόρθωσης πιθανού θορύβου υποβάθρου (Baseline Correction). Όσον αφορά στην προ-επεξεργασία ως προς τη μεταβλητή, διακρίνονται οι περιπτώσεις της επικέντρωσης στο μέσο όρο (Mean Centering) και της προσαρμογής όλων των δεδομένων σε μία μοναδιαία κλίμακα (Autoscaling). Η επιλογή του τρόπου προ-επεξεργασίας εξαρτάται από τη φύση των δεδομένων, τη χημειομετρική μέθοδο που θα χρησιμοποιηθεί και τον στόχο της χημειομετρικής ανάλυσης. Στη συνέχεια περιγράφονται τέσσερις βασικοί τρόποι προ-επεξεργασίας οι οποίες εφαρμόζονται σε φασματοσκοπικά δεδομένα.

4.6.1 Μέθοδος Mean Centering

Αυτή η μέθοδος εφαρμόζεται ως προς τη μεταβλητή (κατά μήκος των στηλών (j) του πίνακα X(i,j)) και ουσιαστικά προκύπτει από την αφαίρεση του μέσου όρου της τιμής της μεταβλητής \bar{X} από την τιμή της ίδιας μεταβλητής X_i για κάθε δείγμα (i), όπως φαίνεται στη σχέση (3).

$$X(i) = \sum_{i=1}^n (X(i) - \bar{X}) \quad (3)$$

Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται ο καθορισμός ενός κοινού σημείου αναφοράς για όλες τις μεταβλητές όλων των δειγμάτων. Η διαδικασία αυτή είναι θεωρείται απαραίτητη πριν την εισαγωγή των δεδομένων σε πολλές χημειομετρικές μεθόδους.

4.6.2 Μέθοδος Standard Normal Variate

Η μέθοδος εφαρμόζεται ως προς το δείγμα (κατά μήκος των σειρών (i) του πίνακα X(i,j)) και έχει ως στόχο την κανονικοποίηση των δεδομένων (δηλαδή τον καθορισμό μίας κοινής κλίμακας για όλες τις μεταβλητές). Προκύπτει από την αφαίρεση του μέσου όρου της τιμής \bar{X} του εκάστοτε δείγματος από την τιμή X_j για κάθε μεταβλητή (j) και την διαίρεση με την τυπική απόκλιση S του εκάστοτε δείγματος. Η εξίσωση από την οποία προκύπτει φαίνεται στη σχέση (4).

$$X_i(j) = \sum_{j=1}^n \frac{(X(j) - \bar{X})}{S} \quad (4)$$

Η διαδικασία αυτή θεωρείται ιδανική σε περιπτώσεις στις οποίες είναι επιθυμητή η ανάδειξη διαφοροποιήσεων μεταξύ των δειγμάτων, οι οποίες οφείλονται σε διαφορετική απόκριση μεταξύ των μεταβλητών και όχι σε διαφορετική απόκριση ως προς την ίδια μεταβλητή [11].

4.6.3 Μέθοδος Savitzky Golay

Η μέθοδος Savitzky Golay εφαρμόζεται ως προς το δείγμα (κατά μήκος των σειρών (i) του πίνακα X(i,j)) και έχει ως στόχο την ομαλοποίηση των δεδομένων. Προκύπτει από την προσαρμογή (fitting) των τιμών των μεταβλητών (j) σε πολυώνυμα νιοστού βαθμού μεταξύ προ-καθορισμένου αριθμού μεταβλητών (window width) για το εκάστοτε δείγμα. Με αυτόν τον τρόπο εξαιρείται πιθανό τυχαίο σφάλμα (θόρυβος) στα δεδομένα, ενώ θεωρείται απαραίτητη διαδικασία πριν την περαιτέρω παραγωγή των δεδομένων [12].

4.6.4 Μέθοδος Παραγωγίσις Δεδομένων

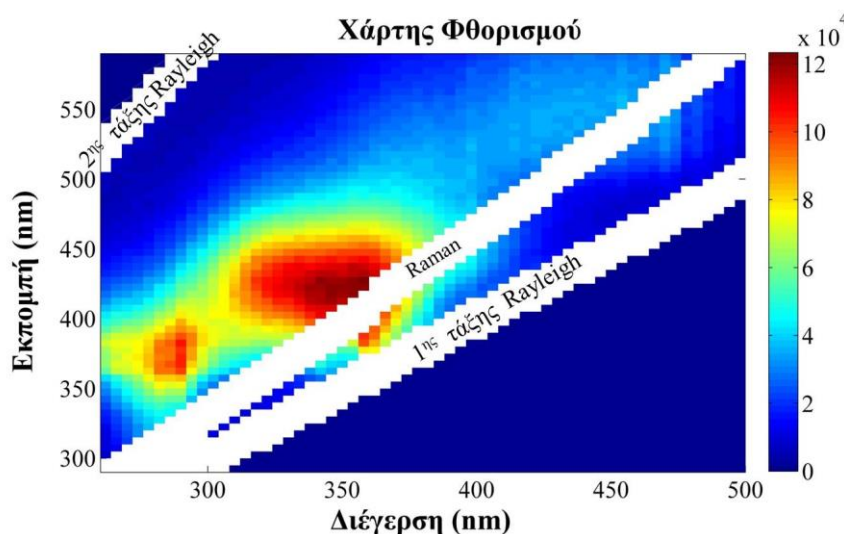
Η μέθοδος εφαρμόζεται ως προς το δείγμα (κατά μήκος των σειρών (i) του πίνακα X(i,j)) και προκύπτει από την παραγωγή 1^{ου} βαθμού και 2^{ου} βαθμού των πολυωνυμικών συναρτήσεων πάνω στις οποίες έχουν προσαρμοστεί τα δεδομένα όπως φαίνεται στη σχέση (5).

$$\frac{dX_i(j)}{dj} \quad \text{ή} \quad \frac{d^2X_i(j)}{dj^2} \quad (5)$$

Με αυτόν τον τρόπο αναδεικνύονται κάποιες μικρές, αλλά σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των δειγμάτων, ενώ εξαλείφεται και πιθανό συστηματικό σφάλμα, όπως για παράδειγμα ο θόρυβος υποβάθρου (Baseline Correction).

4.7 Προ-επεξεργασία Χαρτών Φθορισμού

Η προ-επεξεργασία των χαρτών φθορισμού στοχεύει κυρίως στην εξάλειψη φαινομένων όπως η ελαστική (Rayleigh) και η ανελαστική (Raman) σκέδαση της διεγείρουσας ακτινοβολίας. Τα φαινόμενα αυτά οφείλονται στον διαλύτη (νερό και αιθανόλη) και εμφανίζονται είτε σε φασματικές περιοχές που αντιστοιχούν στην περίθλαση 1^{ης} τάξης του περιθλαστικού φράγματος, είτε σε περιοχές περίθλασης 2^{ης} τάξης [13]. Η πιο συνηθισμένες διαδικασίες είναι 1) η αντικατάσταση των διαγωνίων γραμμών των δεδομένων τα οποία σχετίζονται με αυτά τα φαινόμενα με μηδενικές τιμές ή η πλήρης απαλοιφή αυτών των διαγωνίων γραμμών και 2) η καταγραφή φασμάτων εκπομπής σε μεγαλύτερα μήκη κύματος από το μήκος κύματος διέγερσης (εξάλειψη ελαστικής σκέδασης Rayleigh) (Εικόνα 4.8).



Εικόνα 4.8. Απαλοιφή διαγωνίων γραμμών των δεδομένων τα οποία συνδέονται με φαινόμενα σκέδασης

Ένα άλλο απαραίτητο βήμα πριν την κατασκευή ενός επιτυχημένου μαθηματικού μοντέλου, το οποίο θα είναι ικανό να δώσει μία χημική ερμηνεία του φαινομένου του φθορισμού στο μελετώμενο χημικό σύστημα, είναι ο περιορισμός των λύσεων του (πίνακες συντεταγμένων/πίνακες φόρτου) σε μη αρνητικές τιμές (non-negativity). Αυτό γίνεται δεδομένης της φυσικής σημασίας των μετρούμενων

μεγεθών (συγκέντρωση φθορίζουσών ουσιών και ένταση φθορισμού), τα οποία δεν είναι δυνατό να περιγραφούν μέσω μίας αρνητικής κλίμακας.

Βιβλιογραφία

1. M. Forina, S. Lanteri, C. Armanino, Chemometrics in Food Chemistry. *Chemometrics and species identification*. 1987, 91-143
2. K.R. Beebe and M.B. Seasholtz, Chemometrics: A practical Guide. Wiley (1998)
3. R. Bro and A.K. Smilde, Principal component analysis. *Analytical Methods*. 2014, **6**(9), 2812-2831
4. S. Wold, M. Sjöstöm, L. Eriksson, PLS-Regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 2001, **58**, 109-130
5. M.J. Martelo-Vidal and M. Vázquez, Determination of polyphenolic compounds of red wines by UV-VIS-NIR spectroscopy and chemometrics tools. *Food Chemistry*. 2014, **158**, 28-34
6. T. Hastie, R. Tibshirani, J. Friedman, The elements of statistical learning: Data mining, Inference and Prediction - Second Edition. Springer (2009)
7. D. Ballabio and V. Consonni, Classification tools in chemistry. Part 1: linear models. PLS-DA. *Analytical Methods*. 2013, **5**, 3790-3798
8. A. Evrim and B. Yener, Unsupervised Multiway Data Analysis: A Literature Survey. *IEEE Transactions on Knowledge and Data Engineering*. 2009, **21**(1), 6-20
9. F. Guimet, J. Ferré, R. Boqué, F.X. Rius, Application of unfold principal component analysis and parallel factor analysis to the exploratory analysis of olive oils by means of excitation–emission matrix fluorescence spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*. 2004, **515** (1), 75-85
10. R. Bro, Parafac Tutorial and applications. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 1997, **38** (2), 149-171
11. R.J. Barnes, M.S. Dhanoa, S.J. Lister, Standard normal variate transformation and de-trending of near-infrared diffuse reflectance spectra. *Applied Spectroscopy*. 1989, **43** (5), 772-777

12. A. Savitzky and M. J. Golay, Smoothing and differentiation of data by simplified squares procedures. *Analytical Chemistry*. 1964, **36**, 1627-1639
13. C. M. Andersen, R. Bro, Practical aspects of PARAFAC modelling of fluorescence excitation-emission data. *Journal of Chemometrics*. 2003, **17**, 200-215

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Δείγματα και Μέθοδοι

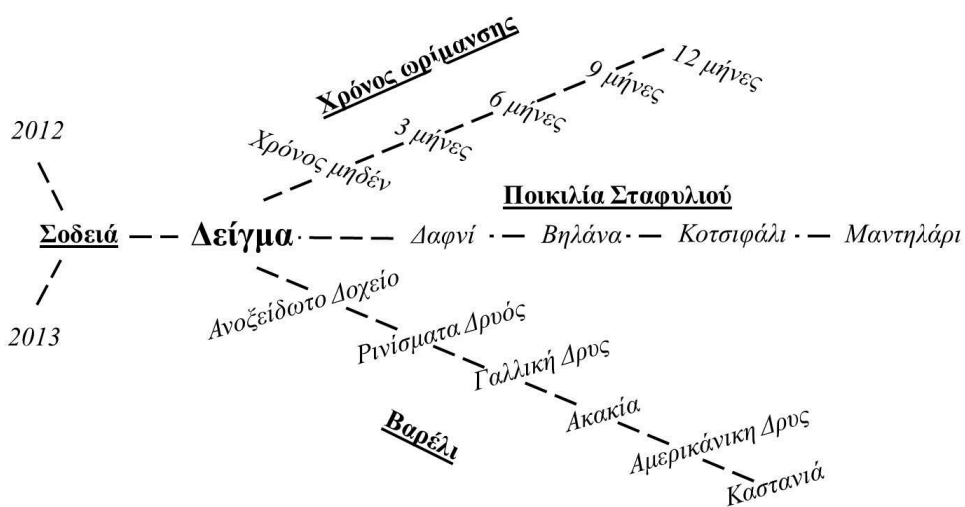
5.1 Πειραματικός Σχεδιασμός και Δειγματοληψία

Ο σχεδιασμός των πειραματικών μελετών που διενεργήθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής προσδιορίστηκε σύμφωνα με τους στόχους του ερευνητικού έργου ΘΑΛΗΣ «Παλαιός Οίνος» [1]. Ειδικότερα ο κύριος ερευνητικός στόχος του έργου ήταν η μελέτη του Κρητικού οίνου ως προς τρεις παραμέτρους α) τη βοτανική του προέλευση (ποικιλία σταφυλιού) β) τον τρόπο ωρίμανσης γ) το χρόνο ωρίμανσης. Τα δείγματα τα οποία εξετάστηκαν αποτελούνται από τέσσερις Ελληνικές-Κρητικές ποικιλίες των οποίων η οινοποίηση δίνει δύο λευκούς (Δαφνί, Βηλάνα) και δύο ερυθρούς οίνους (Μαντηλάρι, Κοτσιφάλι), ενώ η επιλογή τους πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με Κρητική οίνο-παραγωγική εταιρεία η οποία συμμετείχε στο εν λόγω έργο (Lyrarakis-Wines) [2].

Όσον αφορά στη διαδικασία της ωρίμανσης εφαρμόστηκαν έξι διαφορετικοί τρόποι i) ωρίμανση σε ανοξειδωτες δεξαμενές ii) σε ανοξειδωτες δεξαμενές με την προσθήκη δρύινων ρινισμάτων iii) σε βαρέλι από ξύλο Γαλλικής δρυός, iv) σε βαρέλι από ξύλο ακακίας v) σε βαρέλι από ξύλο Αμερικανικής δρυός vi) σε βαρέλι από ξύλο καστανιάς. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιούνταν ανά τρεις μήνες ωρίμανσης στους 3, 6, 9 και 12 μήνες. Σε κάποιες περιπτώσεις, τα ίδια δείγματα μελετήθηκαν ως προς την παλαίωση τους μετά από δώδεκαμηνη (12) εμφιάλωση. Η διαδικασία της δειγματοληψίας πραγματοποιήθηκε τόσο για τη σοδειά του 2012, όσο και για τη σοδειά του 2013.

Στην **Εικόνα 5.1** παρουσιάζεται σχηματικά μία πλήρης περιγραφή των παραμέτρων βάσει των οποίων συλλέχθηκαν τα δείγματα. Η συνολική διάρκεια των πειραματικών διαδικασιών ήταν τρία (3) έτη, με το σύνολο των μελετώμενων δειγμάτων να υπερβαίνει τα διακόσια (200). Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε ομάδες των είκοσι δύο (22) δειγμάτων ανά τρεις (3) μήνες ωρίμανσης, ενώ η προ-

επεξεργασία και οι πειραματικές συνθήκες παρέμειναν σταθερές για την κάθε παρτίδα. Στον **Πίνακα 5.1** παρουσιάζονται οι ποικιλίες και τα βαρέλια με τον αντίστοιχο συμβολισμό τους. Σημειώνεται ότι η φασματοσκοπική μελέτη του Κρητικού οίνου επεκτάθηκε και πέραν των στόχων του ερευνητικού έργου ΘΑΛΗΣ «Παλιός Οίνος» και έτσι μελετήθηκαν δείγματα οίνου προερχόμενα από άλλες ποικιλίες σταφυλιού, καθώς και μίγματα αυτών.



Εικόνα 5.1. Πειραματικοί παράμετροι

Πίνακας 5.1. Ποικιλίες σταφυλιών και περιέκτες ανά ομάδα

Ποικιλία σταφυλιού Περιέκτης	Δαφνί	Βηλάνα	Κοτσιφάλι	Μαντηλάρι
Ανοξειδωτη Δεξαμενή	D1	V1	K1	M1
Ρινίσματα Γαλλικής δρυός,	D2	V2	K2	M2
Αμερικάνικη δρυς	D3	V3	K3	M3
Ακακία	D4	V4	K4	M4
Γαλλική δρυς	D5	V5	K5	M5
Καστανιά			K6	M6

5.2 Προετοιμασία Δειγμάτων

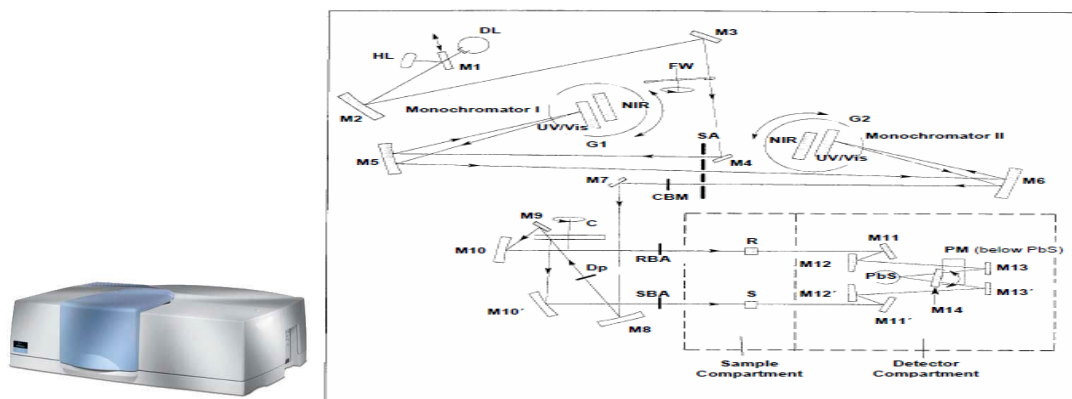
Η διαδικασία της προετοιμασίας των προς ανάλυση δειγμάτων έχει ως εξής 1) παραλαβή δειγμάτων οίνου σε φιάλες των 350 ml 2) φιλτράρισμα με φίλτρα των 0.2 μm 3) μετάγγιση σε φιαλίδια των 20 ml 4) αποθήκευση σε θερμοκρασία 4° c βαθμών κελσίου 5) εξισορρόπηση σε θερμοκρασία δωματίου και μετάγγιση αυτών σε κυψελίδες από χαλαζία με σκοπό τη φασματοσκοπική ανάλυση. Για την περίπτωση της ανάλυσης στο υπεριώδες, αλλά και στην περίπτωση μέτρησης του φθορισμού σε γεωμετρία ορθής γωνίας (Right-Angle), οι οίνοι αραιώνονται με υπέρ-καθαρό νερό σε μία αναλογία (1:20 για τους λευκούς Δαφνί-Βηλόνα) και (1:100 για τους ερυθρούς Κοτσιφάλι- Μαντηλάρι). Η αραιώση γίνεται αφενός για τη διατήρηση της τιμής της απορρόφησης σε ένα εύρος τιμών από 0-1.5 (για τις οποίες ελαχιστοποιείται το σφάλμα μέτρησης (**Εικόνα 3.3, Κεφ. 3**) και αφετέρου για τη διασφάλιση της γραμμικότητας στη μελέτη του φθορισμού. Στις περιπτώσεις ανάλυσης στο ορατό, εγγύς υπέρυθρο και στη μέτρηση του φθορισμού σε γεωμετρία εμπρόσθια όψης (Front-Face), η αραιώση των δειγμάτων δεν θεωρείται απαραίτητη.

5.3 Μέτρηση Απορρόφησης

Για τη μέτρηση της απορρόφησης χρησιμοποιείται ένα υψηλής διακριτικής ικανότητας φασματοφωτόμετρο (Perkin Elmer-Lambda 950) (**Εικόνα 5.2**), το οποίο καλύπτει τις περιοχές του υπεριώδους, ορατού και εγγύς υπέρυθρου με ένα εύρος σάρωσης από τα 175 έως 3300 nm [3]. Το συγκεκριμένο όργανο αποτελείται από ένα οπτικό σύστημα διπλής δέσμης, δύο πηγές ακτινοβολίας (λυχνία δευτερίου και βολφραμίου), δύο μονοχρωμάτορες, ένα φωτοπολλαπλασιαστή R6872 για την ανίχνευση στο UV/VIS και ένα αισθητήρα PbS για την ανίχνευση στο NIR. Οπτικά εξαρτήματα όπως φίλτρα, σχισμές, φακοί και κάτοπτρα συνθέτουν ένα πλήρες οπτικό σύστημα. Η διακριτική του ικανότητα είναι ≤ 0.05 nm στο UV/VIS και ≤ 0.20 nm στο NIR.

Η μέτρηση της απορρόφησης πραγματοποιείται με ένα βήμα σάρωσης 2 nm. Το βήμα αυτό θεωρείται κατάλληλο για τη μέτρηση της απορρόφησης στον οίνο, ο οποίος χαρακτηρίζεται από φασματικές ταινίες εύρους της τάξεως των 10-100 nm. Για το υπεριώδες τμήμα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας το εύρος μελέτης κυμαίνεται στην περιοχή 240-400 nm, για το ορατό στην περιοχή 400-700 nm, ενώ

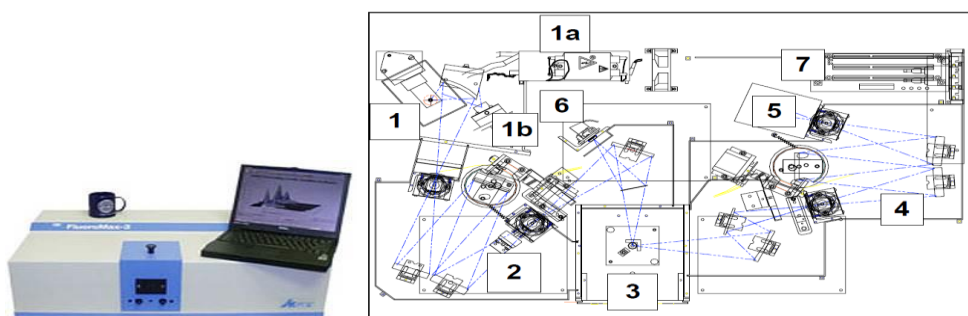
για το εγγύς υπέρυθρο στην περιοχή 1300-1800 nm. Η οπτική διαδρομή των κυψελίδων οι οποίες χρησιμοποιούνται είναι 10 mm για το υπεριώδες και 1 mm για το ορατό και το εγγύς υπέρυθρο. Τόσο η ακρίβεια του οργάνου, όσο και η επαναληψιμότητα των μετρήσεων ελεγχόταν σε τακτά χρονικά διαστήματα καθ' όλη τη διάρκεια των πειραματικών διαδικασιών.



Εικόνα 5.2. Φασματοφωτόμετρο (Perkin Elmer-Lambda 950)

5.4 Μέτρηση Φθορισμού

Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση του φθορισμού είναι ένα φασματοφθορισμόμετρο (Fluoromax-P, HORIBA) (Εικόνα 5.3) [4].



Εικόνα 5.3. Φασματοφθορισμόμετρο (Fluoromax-P, HORIBA)

Το συγκεκριμένο όργανο απαρτίζεται από μία λυχνία ξένου-Xe ισχύος 150 watt, η οποία λειτουργεί ως μία συνεχής πηγή ακτινοβολίας στο ορατό και στο υπεριώδες τμήμα του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, ένα μονοχρωμάτορα διέγερσης (220-600 nm) και ένα μονοχρωμάτορα εκπομπής (290-850 nm) τύπου Czerny-Turner, σχισμές, κλείστρα, φακούς, κάτοπτρα καθώς και ένα φώτοπολλαπλασιαστή τύπου

R928P με εύρος ανίχνευσης στα (180-850 nm) και γραμμικό εύρος έντασης από (0 έως 4×10^6 cps, counts per second - αυθαίρετες μονάδες).

Η μέτρηση της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας φθορισμού πραγματοποιείται σε δύο διαφορετικές γεωμετρίες 1) σε διάταξη ορθής γωνίας (Right-Angle) και 2) σε διάταξη εμπρόσθιας όψης (Front-Face). Στη γεωμετρία εμπρόσθιας όψης η ανάλυση λαμβάνει χώρα χωρίς κάποια προ-επεξεργασία του δείγματος. Ύστερα από πειραματική διερεύνηση, μελέτη στη βιβλιογραφία για τον φθορισμό του οίνου και δεδομένων των προδιαγραφών του φασματοφθορισμέτρου (Fluoromax-P), αποφασίστηκε η μέτρηση του φθορισμού να γίνεται με τον εξής τρόπο 1) τοποθέτηση του δείγματος οίνου σε κυψελίδα από χαλαζία των 10 mm 2) ακτινοβολήση σε γωνία 35° μοιρών ως προς την κάθετο της μπροστινής όψης της κυψελίδας 3) σάρωση σε ένα εύρος μηκών κύματος διέγερσης από 260 έως 500 nm με βήμα 4 nm και σε ένα εύρος μηκών κύματος εκπομπής από 290 έως 590 nm με βήμα 5 nm 4) απεικόνιση του φαινομένου μέσω χαρτών φθορισμού (Excitation Emission Matrices, EEM) 5) χρόνος σάρωσης 0,2 s. Παράγοντες, όπως η ισχύς εκπομπής της λυχνίας ξένου-Xe, η ακρίβεια, αλλά και η επαναληψιμότητα των μετρήσεων ελέγχονταν σε τακτά χρονικά διαστήματα, καθ' όλη τη διάρκεια των πειραματικών διαδικασιών.

5.5 Λογισμικά και Επεξεργασία Φασματοσκοπικών Δεδομένων

Για την προβολή, τη μελέτη και τη χημειομετρική επεξεργασία των φασματοσκοπικών δεδομένων χρησιμοποιούνται διάφορα λογισμικά. Αρχικά τα δεδομένα συλλέγονται στα λογισμικά των φασματοσκοπικών οργάνων (UV-Winlab Software, Datamax version 2.20) και μετά από μία γρήγορη επισκόπηση μεταφέρονται σε φύλλα εργασίας του OriginLab [5]. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα προβάλλονται ως φάσματα απορρόφησης, φάσματα εκπομπής, φάσματα διέγερσης, φάσματα σύγχρονης σάρωσης και χάρτες φθορισμού (EEM). Ακολουθεί μελέτη των φασμάτων με σκοπό τη χημική τους ερμηνεία και τον εντοπισμό τάσεων μεταξύ των δειγμάτων. Στη συνέχεια τα φασματοσκοπικά δεδομένα εισάγονται στη μαθηματική πλατφόρμα Matlab R2015b [6] ή στην πλατφόρμα Unscrambler®Xversion10.4 [7], με σκοπό την περαιτέρω χημειομετρική τους ανάλυση. Στη μαθηματική πλατφόρμα Matlab υπάρχουν δύο επιλογές 1) η χημειομετρική τους ανάλυση μέσω κάποιου κώδικα προγραμματισμού που έχει δημιουργηθεί ερασιτεχνικά από την επιστημονική μας ομάδα ή 2) η χημειομετρική τους ανάλυση μέσω κάποιας εργαλειοθήκης

(toolbox) η οποία εξειδικεύεται στην ανάλυση φασματοσκοπικών δεδομένων, όπως το PLS_Toolbox 8.1 [8].

Βιβλιογραφία

1. Old wine - Evaluation and Optimization of the quality factors during wine maturation produced from Cretan red and white grape varieties . [Online] <http://eilotas.chemistry.uoc.gr/oldwine/index.php/>.
2. LYRARAKIS Wines. [Online] <https://www.lyrarakis.com/en/home>.
3. LAMBDA 950 UV/Vis/NIR Spectrophotometer. [Online] PerkinElmer. <http://www.perkinelmer.com/product/lambda-950-uv-vis-nir-spectrophotometer-1950>.
4. Fluoromax Series. [Online] Horiba Scientific. <http://www.horiba.com/scientific/products/fluorescence-spectroscopy/steady-state/fluoromax/fluoromax-series-524/>.
5. OriginLab. [Online] <http://www.originlab.com/>.
6. Mathworks. [Online] <https://www.mathworks.com/products/matlab.html>.
7. The Unscrambler®Xversion 10.4. [Online] Camo. <http://www.camo.com/rt/Products/Unscrambler/unscrambler.html>.
8. PLS_Toolbox. [Online] Eigenvector Research Incorporated. http://www.eigenvector.com/software/pls_toolbox.htm.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

Μελέτη της μεταβολής διαφόρων παραμέτρων και των επιδράσεων τους στη μέτρηση της Απορρόφησης και του Φθορισμού του Οίνου

Κατά τη διάρκεια της προκαταρκτικής μελέτης για την ανάπτυξη της πειραματικής μεθόδου, αλλά και κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, εξετάστηκαν παράμετροι όπως το pH του οίνου και η επίδραση που προκαλεί η μεταβολή του τόσο στη μέτρηση της απορρόφησης όσο και στη μέτρηση του φθορισμού, η γραμμικότητα μεταξύ της κατ' όγκο συγκέντρωσης του οίνου (σε αραιώση με υπέρ-καθαρό νερό) και της τιμής της απορρόφησης του, η γραμμικότητα μεταξύ της τιμής της απορρόφησης του οίνου στην κύρια κορυφή των 280 nm και της έντασης εκπομπής φθορισμού στα 360 nm, ύστερα από διέγερση στα 280 nm. Τέλος πραγματοποιείται μία σύγκριση μεταξύ χαρτών φθορισμού, οι οποίοι προκύπτουν από δύο διαφορετικές γεωμετρίες μέτρησης του φθορισμού, ορθής γωνίας (Right-Angle) και εμπρόσθιας όψης (Front-Face), επίσης δίνονται πληροφορίες για τη γωνία τοποθέτησης του δείγματος στη γεωμετρία εμπρόσθιας όψης.

6.1 Επίδραση της μεταβολής της παραμέτρου του pH στον οίνο κατά τη μέτρηση της απορρόφησης και του φθορισμού του

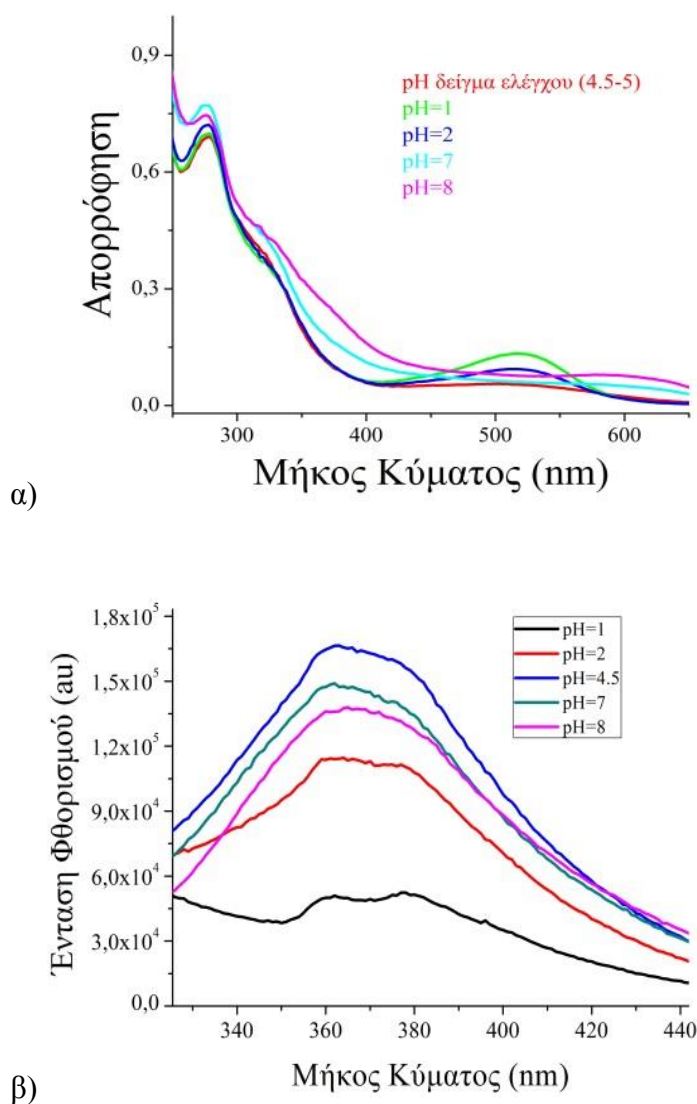
Οι τιμές pH για όλους τους οίνους κυμαίνονται μεταξύ 2.8 και 4 [1]. Για τις μελετώμενες ποικιλίες παρατηρείται η εξής διακύμανση: Δαφνί (3.4 - 3.7), Βηλόνα (3.2 - 3.5), Κοτσιφάλι (3.4 - 3.7) και Μαντηλάρι (3.1 - 3.4). Οι μεταβολές στο pH επηρεάζουν τη χημική μορφή των φαινολικών ενώσεων [2]. Εξαιτίας του γεγονότος ότι η απορρόφηση του οίνου στο υπεριώδες και στο ορατό τμήμα της

ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας αλλά και ο φθορισμός του οφείλεται κατά το μεγαλύτερο ποσοστό στις φαινολικές ενώσεις, σε συνδυασμό με την αστάθεια αυτών των ενώσεων στη μεταβολή του pH, η επίδραση αυτής της μεταβολής γίνεται εμφανής τόσο στα φάσματα απορρόφησης όσο και στα φάσματα φθορισμού. Για τη μελέτη μας, επιλέχθηκε ένας ερυθρός οίνος προερχόμενος από την ποικιλία Κοτσιφάλι. Το δείγμα ελέγχου αραιώθηκε με υπέρ-καθαρό νερό (pH=5.5) σε αναλογία (1:20), η αραιώση αυτή προκάλεσε αύξηση της αρχικής τιμής του pH του δείγματος από τιμή 3.5 στην τιμή 4.5. Παράλληλα παρασκευάστηκαν τέσσερα ρυθμιστικά διαλύματα δύο όξινα (pH=1, pH=2), ένα ουδέτερο (pH=7) και ένα ελαφρώς αλκαλικό (pH=8) με τα οποία αραιώθηκε ο οίνος στην ίδια αναλογία όπως στο δείγμα ελέγχου (1:20). Για την παρασκευή των ρυθμιστικών διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε υδατικό διάλυμα Na_2HPO_4 , 0.1M.

Όσον αφορά στην επίδραση της οξύτητας του διαλύματος στη μέτρηση της απορρόφησης, στην **Εικόνα 6.1** απεικονίζονται τα φάσματα απορρόφησης στην υπεριώδη και ορατή περιοχή τα οποία αντιστοιχούν σε διαφορετικές τιμές pH. Το ενδιαφέρον επικεντρώνεται στην κορυφή απορρόφησης των 520 nm, η οποία συνδέεται με την οικογένεια των ανθοκυανών. Μεταβάλλοντας το pH προς όξινες συνθήκες παρατηρείται μία υπερχρωμική μετατόπιση (αύξηση στην τιμή της απορρόφησης), ενώ μεταβολή του pH προς βασικές συνθήκες οδηγεί σε μία βαθυχρωμική μετατόπιση (μετακίνηση της κορυφής απορρόφησης σε μεγαλύτερα μήκη κύματος). Οι φασματοσκοπικές αυτές μετατοπίσεις ερμηνεύονται από τις διαφορετικές χημικές μορφές των ανθοκυανών, οι οποίες εξαρτώνται από τη μεταβολή του pH [3] και περιγράφονται στην ενότητα **(2.5, Χημικές Αντιδράσεις (3),(4) και (5))**. Οι χημικές αυτές μεταβολές έχουν ως αποτέλεσμα τη διαφορετική απόχρωση του οίνου με επικράτηση του έντονου ερυθρού χρώματος σε όξινες συνθήκες και την απώλεια του χρώματος σε ουδέτερο ή αλκαλικό περιβάλλον.

Όσον αφορά στην επίδραση των οξέο-βασικών μεταβολών στο φαινόμενο του φθορισμού, στην **Εικόνα 6.1β** απεικονίζονται φάσματα εκπομπής φθορισμού σε διαφορετικές τιμές pH, με το ενδιαφέρον μας να επικεντρώνεται στην κορυφή των 360 nm, η οποία προκύπτει ύστερα από διέγερση στα 280 nm και συνδέεται με οικογένειες φαινολικών ενώσεων, όπως τα φαινολικά οξέα. Μεταβάλλοντας το pH είτε προς όξινες είτε προς ελαφρά αλκαλικές συνθήκες παρατηρείται μία πτώση στην ένταση του φθορισμού. Η παρατήρηση αυτή συμφωνεί με τη πτώση στην τιμή της

απορρόφησης στα 280 nm (**Εικόνα 6.1α**, μήκος κύματος διέγερσης) και πιθανώς συνδέεται με μεταβολή της ισορροπίας μεταξύ των διαφόρων μορφών των φθορίζουσών ουσιών κατά τη μεταβολή του pH. Μία άλλη ερμηνεία ειδικά για τις περιπτώσεις του ελαφρώς αλκαλικού (pH=8) και του ουδέτερου διαλύματος (pH=7) είναι η αυξημένη απορρόφηση της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας στα 360 nm όπως αιτιολογείται από τα φάσματα στην **Εικόνα 6.1β**.



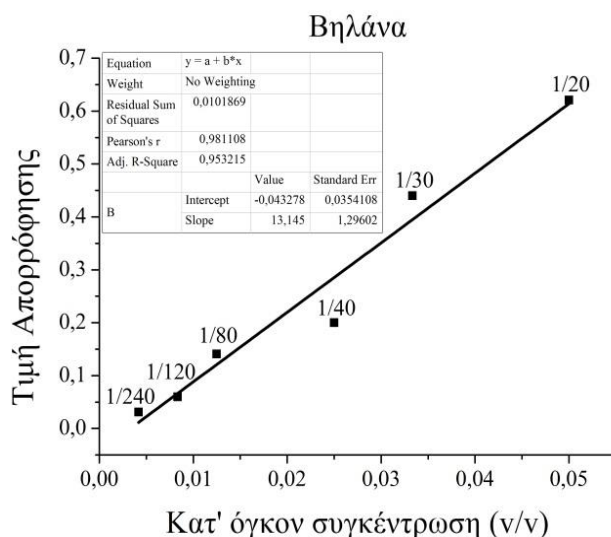
Εικόνα 6.1. Επίδραση της μεταβολής του pH του οίνου στις μετρήσεις μας α) Φάσματα απορρόφησης στην υπεριώδη και ορατή περιοχή β) Φάσματα εκπομπής φθορισμού με διέγερση στα 280 nm, (διαλύματα ερυθρού οίνου της ποικιλίας Κοτσιφάλι σε διαφορετικές τιμές pH)

6.2 Έλεγχος γραμμικότητας μεταξύ κατ' όγκο συγκέντρωσης οίνου και τιμής Απορρόφησης

Με βάση τον νόμο Beer-Lambert, η τιμή της απορρόφησης συνδέεται γραμμικά με τη συγκέντρωση της χημικής ένωσης η οποία απορροφά. Στη περίπτωση μιγμάτων χημικών ενώσεων και θεωρώντας ως δεδομένη την ισχύ της αρχής της προσθετικότητας, η παρατηρούμενη τιμή της απορρόφησης προκύπτει από το σύνολο των χημικών ενώσεων που απορροφούν και σχετίζεται γραμμικά με τη συγκέντρωσή τους, τον συντελεστή μοριακής απορροφητικότητας τους και το μήκος του οπτικού μέσου στο οποίο εμπεριέχονται. Ο οίνος και τα διαλύματα του είναι μία τέτοια περίπτωση, με τη παραδοχή ότι ο ακριβής αριθμός των χημικών ενώσεων οι οποίες απορροφούν και η συγκέντρωσή τους δεν είναι γνωστά. Βάσει αυτής της παραδοχής ο νόμος Beer-Lambert εκφράζεται από τη σχέση (1).

$$A = \alpha l \quad (1)$$

όπου **A**: η υπολογιζόμενη τιμή απορρόφησης, **α** : ένας συντελεστής απόσβεσης μετρούμενος σε cm^{-1} και εξαρτώμενος από τον άγνωστο αριθμό των χημικών ενώσεων που απορροφούν, την άγνωστη συγκέντρωσή τους και τη γραμμομοριακή τους απορροφητικότητα, **l** : το μήκος του οπτικού δρόμου της κυβελίδας σε cm.



Εικόνα 6.2. Γραμμική σχέση απορρόφησης μεταξύ κατ' όγκο συγκέντρωσης και τιμής απορρόφησης στη κύρια κορυφή λ_{max} στα 280 nm (διαλύματα λευκού οίνου ποικιλίας Βηλάνα)

Για την πειραματική επιβεβαίωση της γραμμικότητας μεταξύ της μετρούμενης τιμής της απορρόφησης και της συγκέντρωσης του οίνου, παρασκευάστηκαν δείγματα αραιωμένα με υπέρ-καθαρό νερό σε διαφορετικές κατ' όγκο συγκεντρώσεις, ενώ η εξάρτηση της απορρόφησης από την αρραίωση ελέγχθηκε στη κύρια κορυφή απορρόφησης στα 280 nm. Στην **Εικόνα 6.2** απεικονίζεται η γραμμική σχέση της κατ' όγκο συγκέντρωσης και της τιμής απορρόφησης για τον οίνο της ποικιλίας Βηλάνα (λευκό χρώμα). Η παρατηρούμενη μικρή απόκλιση από τη γραμμικότητα αποδίδεται σε τυχαία σφάλματα κατά τη πειραματική διαδικασία, καθώς και σε αποκλίσεις από τον νόμο Beer-Lambert εξαιτίας φαινομένων όπως η σκέδαση του φωτός. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρούνται και για τις υπόλοιπες τρεις μελετώμενες ποικιλίες οίνου (βλέπε στο **Παράρτημα-Εικόνα 6.6**).

6.3 Εκθετική - Γραμμική Σχέση κατ' όγκο συγκέντρωσης οίνου και έντασης εκπομπής Φθορισμού

Όπως προαναφέρθηκε στο (**Κεφ. 3**), η ένταση του φθορισμού σε περιπτώσεις διαλυμάτων προκύπτει από την σχέση (2α), ενώ όταν οι τιμές της απορρόφησης γίνονται μικρότερες από 0.05, η σχέση αυτή ($e^{-x}=1-x$, όταν $x < 0.05$) προσεγγίζεται ικανοποιητικά με τη γραμμική σχέση (2β).

$$I_F = I_0 \Phi_F (1 - e^{-\epsilon c l}) \quad (2\alpha)$$

$$I_F = I_0 \Phi_F \epsilon c l \quad (2\beta)$$

Η εκθετική σχέση για τιμές απορρόφησης > 0.05 , μεταξύ έντασης φθορισμού και συγκέντρωσης επιβεβαιώνεται και πειραματικά από το διάγραμμα που παρουσιάζεται στην **Εικόνα 6.3** όπου απεικονίζεται ο φθορισμός του οίνου της ποικιλίας Δαφνί στα 360 nm ύστερα από διέγερση στα 280 nm, σε σχέση με την τιμή απορρόφησης στα 280 nm και για διαφορετικές κατ' όγκο συγκεντρώσεις. Τα φαινόμενα αυτό-απορρόφησης είναι κυρίως υπεύθυνα για τη παρατηρούμενη εκθετική μείωση της έντασης του φθορισμού, ενώ διορθώνοντας ως προς αυτά μέσω της εμπειρικής σχέσης (3) [4], παρατηρείται μία μετατροπή της εκθετικής σχέσης που συνδέει τη συγκέντρωση με την ένταση του φθορισμού σε γραμμική.

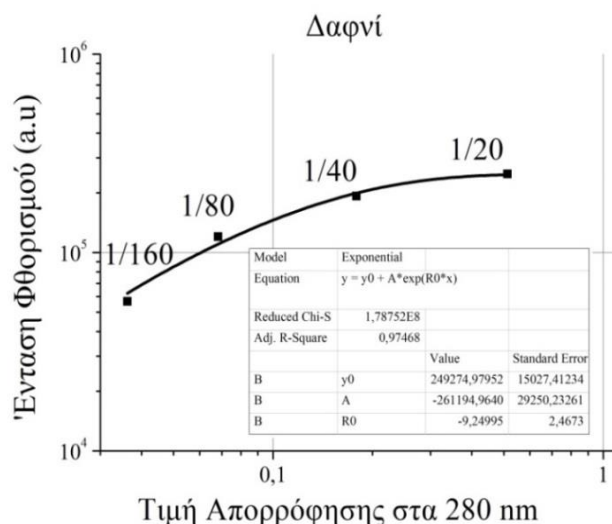
$$F_{\text{corr}} = F_{\text{obs}} * 10^{\frac{OD_{280} + OD_{360}}{2}} \quad (3)$$

όπου: F_{corr} : διορθωμένη ένταση φθορισμού,

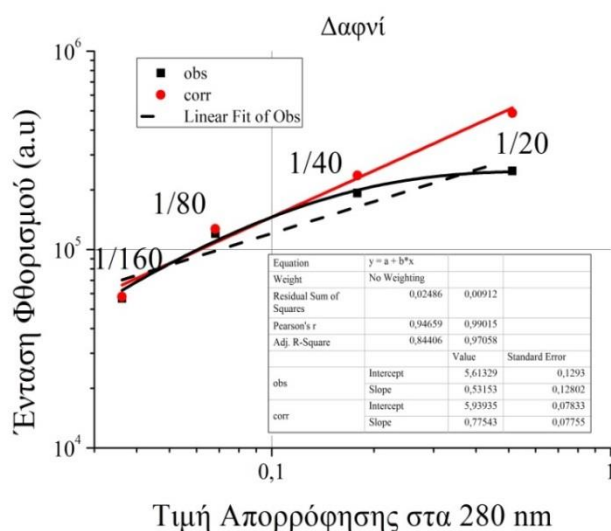
F_{obs} : παρατηρούμενη ένταση φθορισμού

OD 280 : τιμή απορρόφησης στα 280 nm

OD 360 : τιμή απορρόφησης στα 360 nm



Εικόνα 6.3. Εκθετική σχέση μεταξύ της κατ' όγκο συγκέντρωσης και της έντασης εκπομπής φθορισμού (διαλύματα οίνου της ποικιλίας Δαφνί, $\lambda_{exc}=280$ nm, $\lambda_{em} = 360$ nm)



Εικόνα 6.4. Διορθωμένη γραμμική σχέση μεταξύ κατ' όγκο συγκέντρωσης και έντασης εκπομπής φθορισμού (διάλυμα οίνου της ποικιλίας Δαφνί $\lambda_{exc}=280$ nm, $\lambda_{em} = 360$ nm)

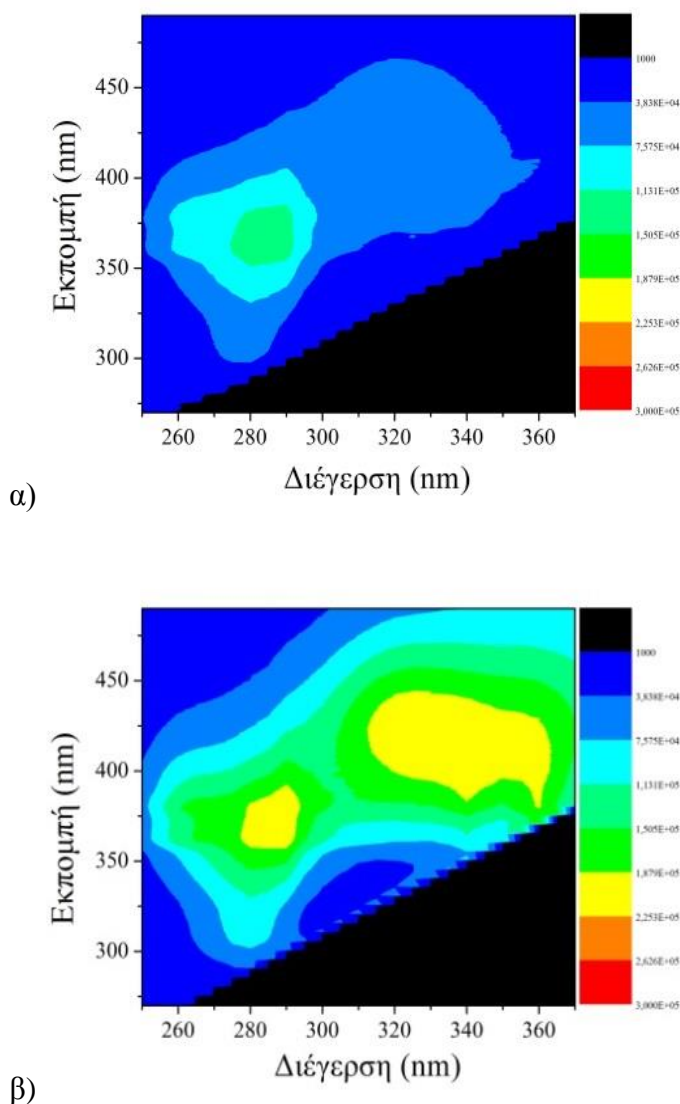
Στην **Εικόνα 6.4** απεικονίζεται στο ίδιο διάγραμμα η εκθετική και η διορθωμένη γραμμική σχέση για τον φθορισμό της ποικιλίας Δαφνί. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρούνται και για τις υπόλοιπες τρεις μελετώμενες ποικιλίες (βλέπε στο Παράρτημα-Εικόνα 6.7).

6.4 Διαφοροποίηση Χαρτών Φθορισμού με βάση τη γεωμετρία μέτρησης

Για τη μέτρηση του φθορισμού μελετήθηκαν η γεωμετρία ορθής γωνίας (Right-Angle) και η γεωμετρία εμπρόσθιας όψης (Front-Face). Όπως περιγράφηκε στη προηγούμενη ενότητα στη γεωμετρία ορθής γωνίας παρατηρούνται φαινόμενα αυτό-απορρόφησης για την εξάλειψη των οποίων απαιτείται υπερβολικά υψηλή αραιώση των δειγμάτων (η οποία οδηγεί σε πολύ χαμηλές τιμές απορρόφησης, αλλά ταυτόχρονα συνοδεύεται από μεταβολή στη χημική μορφή των φθορίζουσών ουσιών λόγω μεταβολής του pH) και επιπροσθέτως απαιτείται διόρθωση των φαινομένων μέσω μαθηματικών προσεγγίσεων, όπως αυτή της σχέσης (3). Με σκοπό την αποφυγή της χρονοβόρας διαδικασίας της αραιώσης και των συνεπειών της, επιλέγεται η γεωμετρία εμπρόσθιας όψης ως καταλληλότερη για τη μέτρηση του φθορισμού [5]. Στην **Εικόνα 6.5** απεικονίζεται ο χάρτης φθορισμού για την ίδια ποικιλία οίνου στις δύο διαφορετικές γεωμετρίες. Παρατηρείται μία σαφής διαφοροποίηση μεταξύ των δύο γεωμετριών όσον αφορά στους καταγεγραμμένους χάρτες φθορισμού. Κατά τη μέτρηση σε διάταξη εμπρόσθιας όψης παρατηρείται μία γενικότερη αύξηση της έντασης του φθορισμού, καθώς και μία ενίσχυση της έντασης της κορυφής εκπομπής στα 420 nm, ύστερα από διέγερση στα 330 nm. Οι παρατηρούμενες διαφοροποιήσεις πιθανόν να οφείλονται σε παράγοντες όπως η διαφοροποίηση στη συγκέντρωση και τη χημική μορφή των φθορίζουσών ουσιών, η οποία προκύπτει ύστερα από την αραιώση των δειγμάτων, καθώς και σε φαινόμενα αυτό-απορρόφησης στη διάταξη της ορθής γωνίας.

Μετά την επιλογή της γεωμετρίας εμπρόσθιας όψης ως τη πιο κατάλληλη για τη μέτρηση του φθορισμού, διερευνήθηκε η επιλογή της καταλληλότερης γωνίας ακτινοβολήσης. Τα κριτήρια της επιλογής μας βασίστηκαν, αφενός στην ανάκτηση ενός ικανοποιητικού σήματος φθορισμού, και αφετέρου στην ελαχιστοποίηση παρεμβολών όπως η ανάκλαση του φωτός, οι οποίες δεν σχετίζονται με την καταγραφή του φαινομένου του φθορισμού. Στη γωνία 0° (off-center) δεν είναι

δυνατή η καταγραφή σήματος φθορισμού στον οίνο, στις γωνίες 15° και 25° το σήμα είναι ασθενές, ενώ στη γωνία 45° η σκέδαση του φωτός κυριαρχεί. Τελικά, επιλέχθηκε η γωνία των 35°, η οποία συνδυάζει ένα ικανοποιητικό σήμα φθορισμού χωρίς σημαντικές παρεμβολές από την ανάκλαση του φωτός. Να σημειωθεί ότι και η γωνία των 55° είναι κατάλληλη για την καταγραφή του φθορισμού.



Εικόνα 6.5. Χάρτης φθορισμού (EEM) καταγεγραμμένος σε α) Γεωμετρία ορθής γωνίας β) Γεωμετρία εμπρόσθιας όψης, (διάλυμα οίνου από την ποικιλία Κοτσιφάλι σε αραιώση 1:20 με υπέρ-καθαρό νερό)

Βιβλιογραφία

1. P. Ribéreau-Gayon, Y. Glories, A. Maujean, D. Dubourdiou, Handbook of Enology Vol. 2: The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments. Wiley (2006), pp. 9-10.

2. M. Friedman and H.S. Jürgens, Effect of pH on the Stability of Plant Phenolic Compounds. *J. Agric. Food Chem.* 2000, **48** (6), 2101-2110
3. F. He, N.N. Liang, L. Mu, Q.H. Pan, J. Wang, M.J. Reeves, C.Q. Duan, Anthocyanins and their variation in red Wines I. Monomeric anthocyanins and their color expression. *Molecules.* 2012, **17**, 1571-1601
4. J. R. Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy: Instrumentation for Fluorescence Spectroscopy. Springer (2006)
5. D. Airado-Rodríguez, I. Durán Merás, T. Galeano-Díaz, J.P. Wold, Front-Face fluorescence spectroscopy: A new tool for control in the wine industry. *Journal of Food Composition and Analysis.* 2011, **24**, 257-264

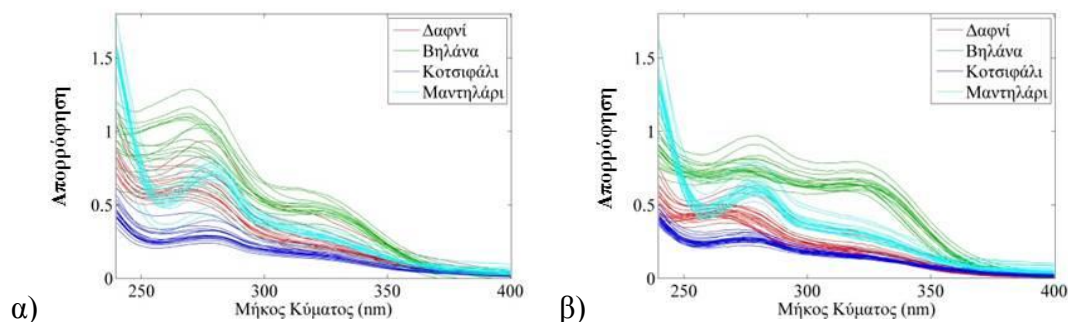
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

Διαχωρισμός Βοτανικής Προέλευσης

Ο χαρακτηρισμός της βοτανικής προέλευσης του οίνου, βάσει της οποίας εξασφαλίζεται πολλές φορές η αυθεντικότητα του, αποτελεί θέμα ιδιαίτερου ενδιαφέροντος τόσο για τους παραγωγούς όσο και για τους καταναλωτές. Για μία τέτοιου είδους μελέτη μέσω της μεθοδολογίας που εξετάζεται στο πλαίσιο της παρούσας έρευνας επιλέχθηκαν τέσσερις Ελληνικοί-Κρητικοί μονοποικιλιακοί οίνοι: η ποικιλία **Δαφνί** (15 δείγματα, σοδειά 2012) και (20 δείγματα, σοδειά 2013), η ποικιλία **Βηλάνα** (15 δείγματα, σοδειά 2012) και (20 δείγματα, σοδειά 2013), η ποικιλία **Κοτσιφάλι** (18 δείγματα, σοδειά 2012) και (24 δείγματα, σοδειά 2013) και η ποικιλία **Μαντηλάρι** (18 δείγματα, σοδειά 2012) και (24 δείγματα, σοδειά 2013). Στις ενότητες που ακολουθούν παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μελέτης μας, όσον αφορά στη δυνατότητα των φασματοσκοπικών τεχνικών της απορρόφησης (υπεριώδους, ορατού και εγγύς υπέρυθρου) και του φθορισμού, σε συνδυασμό με κατάλληλες μεθόδους χημειομετρίας να οδηγήσουν στον ασφαλή διαχωρισμό οίνων ως προς τη βοτανική τους προέλευση.

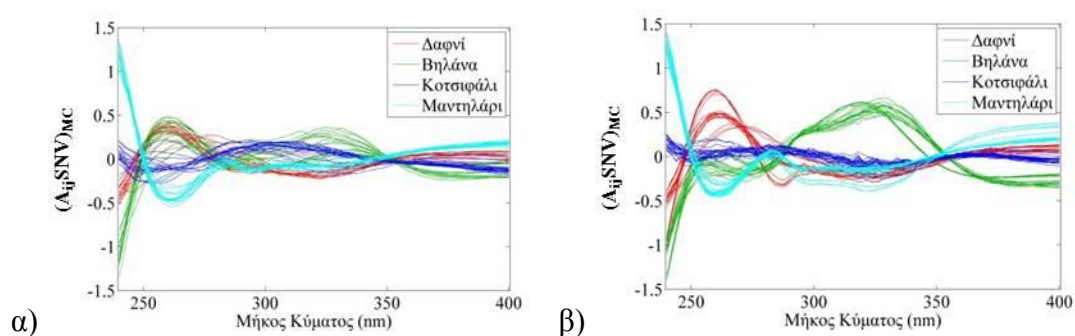
7.1 Διαχωρισμός Βοτανικής Προέλευσης με τη Φασματοσκοπία Απορρόφησης Υπεριώδους

Αρχικά προβάλλεται το σύνολο των φασμάτων απορρόφησης (240-400 nm) με σκοπό τον εντοπισμό ομοιοτήτων και διαφορών μεταξύ τους. Από την προβολή των φασμάτων παρατηρούνται οπτικά τέσσερις διαφορετικές ομάδες που υποδηλώνονται με τους αντίστοιχους χρωματισμούς, οι οποίες ταυτίζονται με τις τέσσερις μελετώμενες ποικιλίες. Η εικόνα είναι παρόμοια τόσο για τη σοδειά του 2012 (**Εικόνα 7.1α**), όσο και για τη σοδειά του 2013 (**Εικόνα 7.1β**).



Εικόνα 7.1. Φάσματα απορρόφησης οίνου στο υπεριώδες 240-400 nm α) Σοδειά 2012- 66 δείγματα β) Σοδειά 2013- 88 δείγματα

Τα φάσματα δειγμάτων οίνου της ποικιλίας Μαντηλάρι διαφέρουν περισσότερο από τα φάσματα των άλλων ποικιλιών, κυρίως ως προς την εμφάνιση μίας διακριτής στενής κορυφής στη φασματική περιοχή γύρω από τα 280 nm εύρους περίπου 30 nm. Η απορρόφηση αυτή συνδέεται με το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο του οίνου [1], ενώ συναντάται και στις υπόλοιπες τρεις ποικιλίες με μεγαλύτερο φασματικό εύρος και με μία ελαφρά μετατόπιση του μεγίστου απορρόφησης προς μικρότερα μήκη κύματος. Τα φάσματα της ποικιλίας Βηλάννα παρουσιάζουν και αυτά μία ιδιαιτερότητα, ως προς την εμφάνιση μίας ευρείας κορυφής με μέγιστο γύρω στα 320 nm. Αυτή συνδέεται κυρίως με ενώσεις της οικογένειας των Φλαβονοειδών και των Κινναμωμικών Οξέων [2–4], ενώ εμφανίζεται και στις υπόλοιπες τρεις ποικιλίες ως μία κάμψη (ώμος) στο φάσμα απορρόφησης.



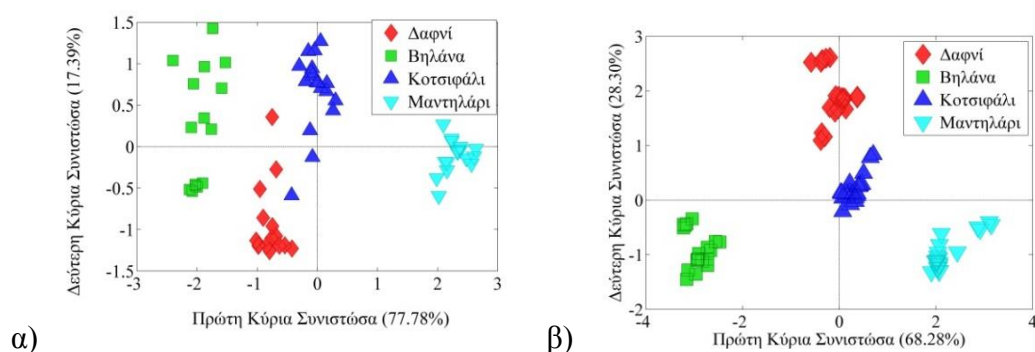
Εικόνα 7.2. Φάσματα απορρόφησης οίνου μετά την προ-επεξεργασία τους α) Σοδειά 2012- 66 δείγματα β) Σοδειά 2013- 88 δείγματα

Με σκοπό την εξάλειψη τυχαίων ή συστηματικών σφαλμάτων (κατά τη δειγματοληψία, την αποθήκευση και την πειραματική διαδικασία), τα οποία επηρεάζουν την τιμή της απορρόφησης, καθώς και τον περιορισμό του

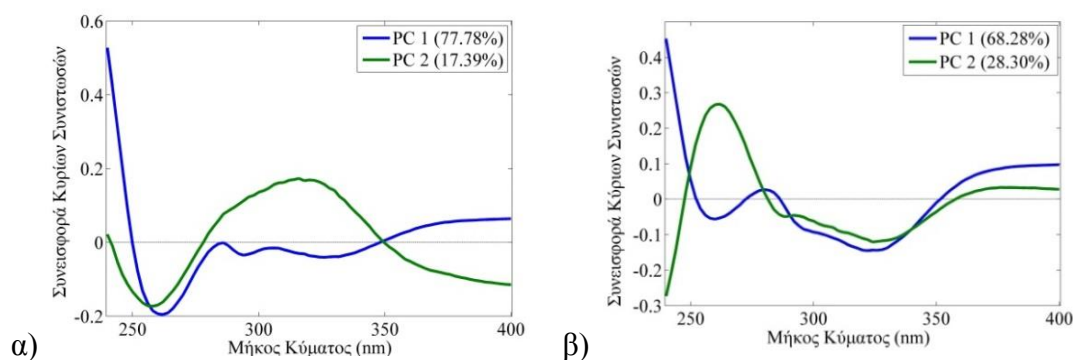
παρατηρούμενοι διαχωρισμού μόνο σε φασματοσκοπικής φύσεως διαφοροποιήσεις, επιλέχθηκε η προ-επεξεργασία των φασματοσκοπικών δεδομένων με τη μέθοδο SNV, η οποία περιγράφεται στο **Κεφ.4.6.2**. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Mean Centering. Σημειώνεται ότι η ποσότητα $(A_{ij} SNV)_{MC}$ η οποία εμφανίζεται στα τροποποιημένα φάσματα της **Εικόνας 7.2** υποδηλώνει συνολικά την προ-επεξεργασία στην οποία έχουν υποβληθεί τα δεδομένα των φασμάτων απορρόφησης.

Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA)

Για τη χημειομετρική διερευνητική μελέτη των φασματοσκοπικών δεδομένων χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA), η οποία προσφέρει μία πιο συστηματική οπτική απεικόνιση του διαχωρισμού.



Εικόνα 7.3. Διερευνητική μελέτη με την ανάλυση κύριων συνιστωσών. Score Plots στις δύο πρώτες κύριες συνιστώσες α) Σοδειά 2012 β) Σοδειά 2013



Εικόνα 7.4. Διερευνητική μελέτη με την ανάλυση κύριων συνιστωσών. Loading Plots στις δύο πρώτες κύριες συνιστώσες α) Σοδειά 2012 β) Σοδειά 2013

Επιλέχθηκαν τέσσερις (4) κύριες συνιστώσες για τη σοδειά του 2012 και τρεις (3) κύριες συνιστώσες για τη σοδειά του 2013, οι οποίες περιγράφουν το 99.6% και το 98.5% της διακύμανσης των φασματοσκοπικών δεδομένων, αντίστοιχα. Η προβολή των δειγμάτων στις δύο πρώτες κύριες συνιστώσες (Score Plots) δείχνει

έναν ικανοποιητικό διαχωρισμό μεταξύ των τεσσάρων ποικιλιών που διατάσσονται σε τέσσερις ομάδες δειγμάτων (**Εικόνα 7.3**). Οι δύο πρώτες κύριες συνιστώσες ερμηνεύουν υψηλό ποσοστό της διακύμανσης των δεδομένων 95.2% για τη σοδειά 2012 και 94.6% για τη σοδειά 2013. Τα αντίστοιχα Loading Plots για την πρώτη και τη δεύτερη κύρια συνιστώσα (**Εικόνα 7.4**) υποδεικνύουν τις φασματικές περιοχές, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τον παρατηρούμενο διαχωρισμό. Οι εικόνες του διαχωρισμού και οι φασματικές περιοχές από τις οποίες εξαρτώνται είναι παρόμοιες τόσο για τη σοδειά του 2012 όσο και για τη σοδειά του 2013.

Από τη συνδυαστική αξιολόγηση των Score Plots, των Loading Plots αλλά και των αρχικών φασμάτων απορρόφησης, συνάγονται τα ακόλουθα 1) η φασματοσκοπία απορρόφησης στο υπεριώδες τμήμα του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος (240-400 nm) είναι ικανή να διαχωρίσει δείγματα οίνου προερχόμενα από τις τέσσερις ποικιλίες που εξετάστηκαν 2) είναι σαφής η διαφοροποίηση μεταξύ των δύο λευκών και δύο ερυθρών οίνων 3) εντοπίζονται μεγάλες διαφορές μεταξύ των ποικιλιών Βηλάνα και Μαντηλάρι 4) εντοπίζονται μικρότερες διαφορές μεταξύ των ποικιλιών Δαφνί και Κοτσιφάλι 5) όλες οι προαναφερθείσες διαφοροποιήσεις είναι ανεξάρτητες από την περίοδο συγκομιδής (σοδειά 2012 ή σοδειά 2013) και σχετίζονται κυρίως με το φαινολικό δυναμικό της κάθε ποικιλίας, το οποίο συνδέεται με τη βοτανική τους προέλευση. Η πρώτη κύρια συνιστώσα, η οποία ερμηνεύει ένα υψηλό ποσοστό της διακύμανσης των φασματοσκοπικών δεδομένων (77.8% σοδειά 2012, 68.3% σοδειά 2013) συνδέεται με την απορρόφηση στο εύρος γύρω από τις κορυφές των 280 και 320 nm και είναι υπεύθυνη για τον διαχωρισμό των ποικιλιών. Η δεύτερη κύρια συνιστώσα, η οποία ερμηνεύει ένα χαμηλότερο αλλά εξίσου σημαντικό ποσοστό της διακύμανσης των φασματοσκοπικών δεδομένων (17.4% σοδειά 2012, 28.3% σοδειά 2013) συνδέεται και αυτή με την απορρόφηση στο εύρος γύρω από τις κορυφές των 280 και 320 nm και είναι υπεύθυνη για διαφοροποιήσεις μεταξύ οίνων προερχόμενων από την ίδια ποικιλία. Εξαιτίας του εκτεταμένου εύρους των κορυφών, δεν είναι δυνατό οι διαφορές αυτές να αποδοθούν σε συγκεκριμένες χημικές ενώσεις, παρά μόνο σε οικογένειες φαινολικών ενώσεων.

Ανάλυση Διακριτότητας Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (PLS-DA)

Για την επιβεβαίωση της ικανότητας της φασματοφωτομετρίας απορρόφησης στον διαχωρισμό των ποικιλιών οίνου, χρησιμοποιήθηκε η χημειομετρική μέθοδος

κατηγοριοποίησης της ανάλυσης διακριτότητας μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA). Κατά την εξέταση των φασματοσκοπικών δεδομένων μέσω αυτής της μεθόδου, θεωρείται γνωστή η κατηγορία του κάθε οίνου (ποικιλία προέλευσης) και μελετάται η ικανότητα των φασματοσκοπικών δεδομένων στην πρόβλεψη αυτής της κατηγορίας.

Πίνακας 7.1. Κατηγοριοποίηση ποικιλιών Σοδειάς 2012

Cross Validation LV=4		Προβλεπόμενη Ομάδα				Ορθή Ταξινόμηση %
VB(7)	# Δείγματα	Δαφνί	Βηλάνα	Κοτσιφάλι	Μαντηλάρι	
Δαφνί	15	15	0	0	0	100
Βηλάνα	15	0	15	0	0	100
Κοτσιφάλι	18	0	0	18	0	100
Μαντηλάρι	18	0	0	0	18	100

Πίνακας 7.2. Κατηγοριοποίηση ποικιλιών Σοδειάς 2013

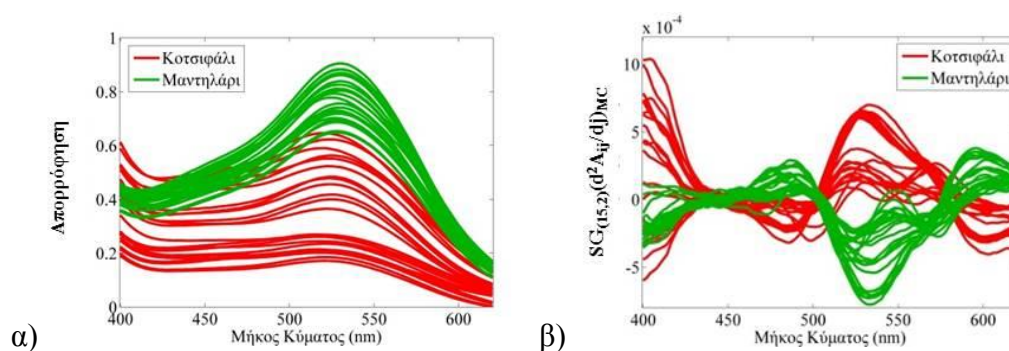
Cross Validation LV=4		Προβλεπόμενη Ομάδα				Ορθή Ταξινόμηση %
VB(9)	# Δείγματα	Δαφνί	Βηλάνα	Κοτσιφάλι	Μαντηλάρι	
Δαφνί	20	20	0	0	0	100
Βηλάνα	20	0	20	0	0	100
Κοτσιφάλι	24	0	0	24	0	100
Μαντηλάρι	24	0	0	0	24	100

Τα μαθηματικά μοντέλα τα οποία επιλέχθηκαν αποτελούνται από πέντε (5) λανθάνουσες μεταβλητές για τη σοδειά του 2012 και τέσσερις (4) λανθάνουσες μεταβλητές για τη σοδειά του 2013, οι οποίες ερμηνεύουν το 99.8%, σοδειά 2012 / 99.0%, σοδειά 2013 της διακύμανσης των ανεξάρτητων μεταβλητών (φάσματα απορρόφησης υπεριώδους) και το 90.9%, σοδειά 2012 / 95.4%, σοδειά 2013, της

διακύμανσης των εξαρτημένων μεταβλητών (ποικιλία προέλευσης). Η αξιοπιστία του μαθηματικού μοντέλου ελέγχθηκε μέσω διασταυρωτικής αξιολόγησης (Cross-Validation) με τη μέθοδο Venetian-Blinds, η οποία βασίζεται στην επαναλαμβανόμενη εκτέλεση-έλεγχο του μαθηματικού αλγορίθμου με τον διαχωρισμό του πίνακα των δεδομένων σε επιμέρους ομάδες. Η απεικόνιση των αποτελεσμάτων γίνεται μέσω τετραγωνικών πινάκων. Στους **Πίνακες 7.1** και **7.2** φαίνεται η απόλυτα (100%) επιτυχής πρόβλεψη της βοτανικής προέλευσης των τεσσάρων ποικιλιών οίνου, τόσο για τα 66 δείγματα της σοδειάς τους 2012, όσο για τα 88 δείγματα της σοδειάς του 2013.

7.2 Διαχωρισμός Βοτανικής Προέλευσης με τη Φασματοσκοπία Απορρόφησης Ορατού

Στην περιοχή του ορατού απορροφούν φαινολικές ενώσεις της οικογένειας των ανθοκυανών [5]. Εξαιτίας της παρουσίας αυτών των ενώσεων μόνο στους ερυθρούς οίνους, η μελέτη μας περιορίζεται στις ποικιλίες Κοτσιφάλι και Μαντηλάρι. Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τα δείγματα της σοδειάς του 2013 (48 δείγματα). Αρχικά προβάλλεται το σύνολο των φασμάτων απορρόφησης (400-620 nm) με σκοπό τον εντοπισμό ομοιοτήτων και διαφορών μεταξύ τους (**Εικόνα 7.5**). Ήδη από την προβολή των φασμάτων είναι εμφανής η διαφοροποίηση μεταξύ των δύο ποικιλιών ερυθρού οίνου.



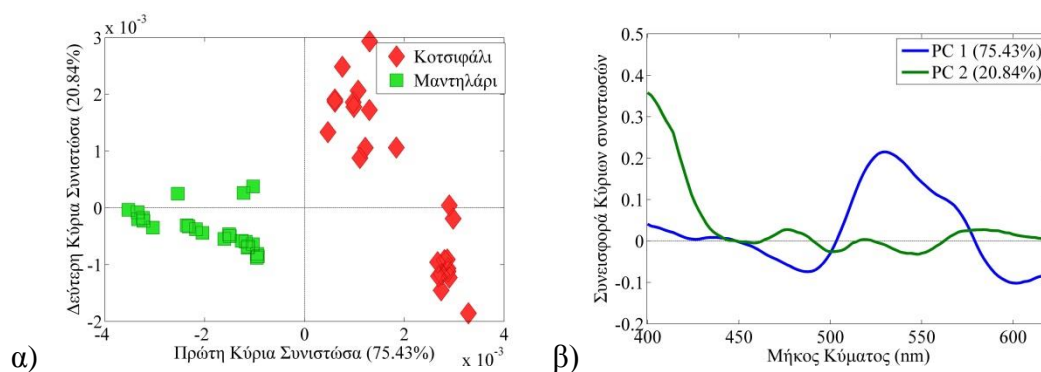
Εικόνα 7.5. Φάσματα απορρόφησης ορατού (400-620 nm) α) χωρίς προ-επεξεργασία β) μετά την προ-επεξεργασία

Η προ-επεξεργασία των φασματοσκοπικών δεδομένων με την ομαλοποίηση Savitzky-Golay (15 σημείων, πολυώνυμο 2^{00} βαθμού) και την παραγωγή τους (2^{00} βαθμού) διαδικασίες οι οποίες περιγράφονται στο **Κεφ.4.6.3** και **Κεφ.4.6.4** αναδεικνύουν κορυφές στα 480 nm, 530 nm και 580 nm, οι οποίες διευκολύνουν τη

διαφοροποίηση μεταξύ των οίνων. Πριν την εισαγωγή των φασματοσκοπικών δεδομένων στα μαθηματικά μοντέλα, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Mean Centering, με τα τροποποιημένα φάσματα απορρόφησης να φαίνονται στην **Εικόνα 7.5β**. Να σημειωθεί ότι η ποσότητα $SG_{(15,2)}(d^2A_{ij}/dj^2)_{MC}$ υποδηλώνει συνολικά την προεπεξεργασία στην οποία έχουν υποβληθεί τα φάσματα.

Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA)

Με την εφαρμογή της μεθόδου της ανάλυσης κύριων συνιστωσών (PCA) δίνεται μία καλύτερη οπτική απεικόνιση του διαχωρισμού. Το μαθηματικό μοντέλο το οποίο προκύπτει αποτελείται από τρεις (3) κύριες συνιστώσες και ερμηνεύει το 99.6% της συνολικής διακύμανσης των φασματοσκοπικών δεδομένων. Από την προβολή των δειγμάτων στις δύο πρώτες κύριες συνιστώσες (Score Plot, 96.3% της διακύμανσης) (**Εικόνα 7.6α**), η διαφοροποίηση είναι εμφανής και οφείλεται σε διαφορετικά χημικά είδη και μορφές της οικογένειας των ανθοκυανών που απορροφούν σε μήκος κύματος 480 nm, 530 nm και 560 nm (όπως υποδεικνύουν τα Loading Plots στην **Εικόνα 7.6β**). Μελετώντας το Score Plot ξεχωριστά για την κάθε ποικιλία, παρατηρείται μία μεγάλη διασπορά στα δείγματα της ποικιλίας Κοτσιφάλι σε σχέση με αυτά της ποικιλίας Μαντηλάρι, προδίδοντας μία αστάθεια στο χρώμα της συγκεκριμένης ποικιλίας, εξαρτώμενη από τον χρόνο και τον τρόπο ωρίμανσης.



Εικόνα 7.6. Διερευνητική μελέτη με την ανάλυση κύριων συνιστωσών α) Score Plot στις πρώτες κύριες συνιστώσες β) Loading Plots στις πρώτες κύριες συνιστώσες

Η πρώτη κύρια συνιστώσα η οποία περιγράφει το 75.4% της διακύμανσης των φασματοσκοπικών δεδομένων συνδέεται με την απορρόφηση στην περιοχή 500-580 nm, ενώ η δεύτερη κύρια συνιστώσα η οποία περιγράφει το 20.8% της διακύμανσης συνδέεται με την απορρόφηση στην περιοχή 400-450 nm. Η πρώτη κύρια συνιστώσα

είναι υπεύθυνη για τον διαχωρισμό των δύο ποικιλιών, ενώ η δεύτερη κύρια συνιστώσα εξηγεί τη διασπορά στα δείγματα της ποικιλίας Κοτσιφάλι.

Ανάλυση Διακριτότητας Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (PLS-DA)

Για την επιβεβαίωση της δυνατότητας της φασματοσκοπίας απορρόφησης ορατού στον αξιόπιστο διαχωρισμό των ερυθρών ποικιλιών οίνου, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ανάλυσης διακριτότητας μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA). Το μοντέλο το οποίο επιλέχθηκε αποτελείται από μία (1) λανθάνουσα μεταβλητή και ερμηνεύει το 97.0% της διακύμανσης των ανεξάρτητων μεταβλητών (φάσματα απορρόφησης ορατού) και το 93.3% της διακύμανσης των εξαρτημένων μεταβλητών (χρόνος ωρίμανσης).

Πίνακας 7.3. Κατηγοριοποίηση ερυθρών ποικιλιών Σοδειάς 2013

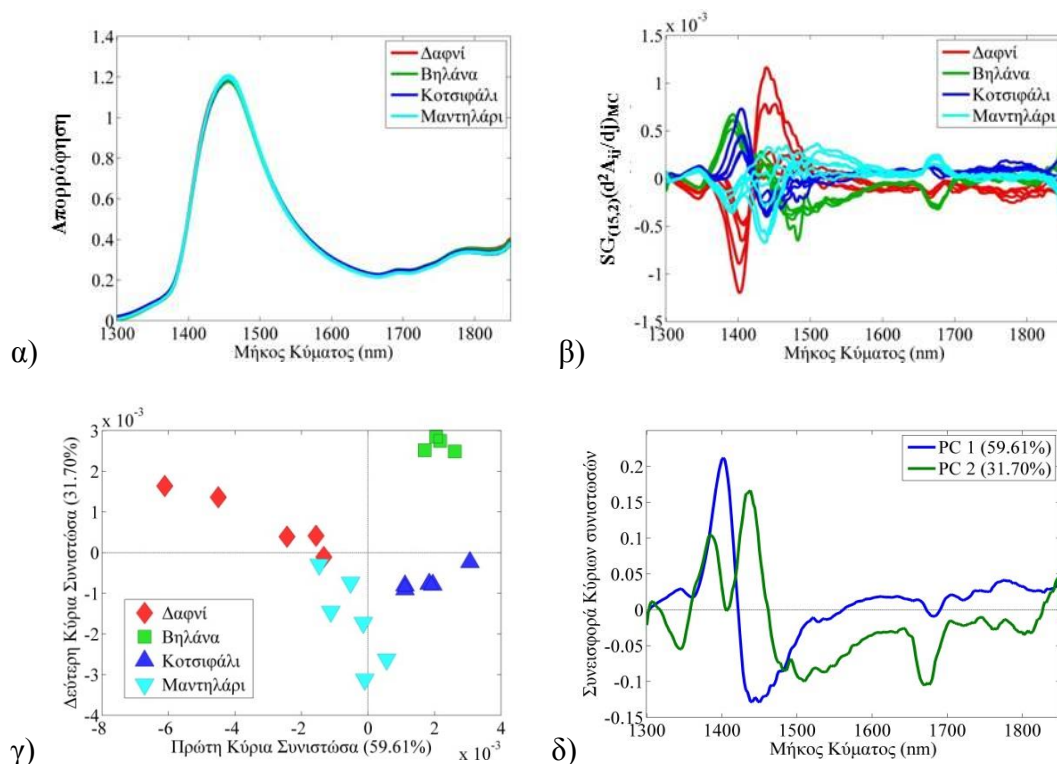
Cross Validation	LV=3	Προβλεπόμενη Ομάδα		Ορθή
VB (4)	# Δείγματα	Κοτσιφάλι	Μαντηλάρι	Ταξινόμηση %
Κοτσιφάλι	24	24	0	100
Μαντηλάρι	24	0	24	100

Η αξιοπιστία του μαθηματικού μοντέλου ελέγχθηκε μέσω διασταυρωτικής αξιολόγησης (Cross-Validation) με τη μέθοδο Venetian-Blinds, η οποία βασίζεται στην επαναλαμβανόμενη του εκτέλεση-έλεγχο με τον διαχωρισμό του πίνακα των δεδομένων σε επιμέρους ομάδες. Στον **Πίνακα 7.3** φαίνεται η επιτυχής προβλεπτική ικανότητα του μαθηματικού μοντέλου με τον ακριβή εντοπισμό της βοτανικής προέλευσης των οίνων που εξετάστηκαν.

7.3 Διαχωρισμός Βοτανικής Προέλευσης με τη Φασματοσκοπία Απορρόφησης Εγγύς Υπέρυθρου

Όσον αφορά στην εξέταση της δυνατότητας της φασματοσκοπίας απορρόφησης στο εγγύς υπέρυθρο, σχετικά με τον εντοπισμό της βοτανικής προέλευσης του οίνου, η παρούσα μελέτη διερεύνησε τις προαναφερθέντες τέσσερις ποικιλίες της σοδειάς του 2013 σε χρόνο ωρίμανσης έξι μηνών. Το σύνολο των δειγμάτων αποτελείται από πέντε (5) δείγματα της ποικιλίας Δαφνί, τέσσερα (4) δείγματα της ποικιλίας Βηλάνα, έξι (6) δείγματα της ποικιλίας Κοτσιφάλι και έξι (6)

δείγματα της ποικιλίας Μαντηλάρι. Το φασματικό εύρος μελέτης κάλυψε την περιοχή 1300-1800 nm και οι μετρήσεις έγιναν με τον τρόπο που περιγράφεται στο **Κεφ. 5.3**.



Εικόνα 7.7. Μελέτη στο εγγύς υπερευθρο 1300-1850 nm α) Φάσματα απορρόφησης β) Φάσματα απορρόφησης μετά από προ-επεξεργασία γ) Score Plot δ) Loading Plots

Στην **Εικόνα.7.7α** απεικονίζονται τα φάσματα απορρόφησης των είκοσι ένα (21) δειγμάτων. Μεταξύ των φασμάτων των τεσσάρων ποικιλιών παρατηρείται σχεδόν πλήρης επικάλυψη, με μικρές διαφορές μεταξύ τους στην περιοχή 1400 - 1600 nm. Όλα τα φάσματα εμφανίζουν τρεις χαρακτηριστικές κορυφές στα 1450 nm ή 6896 cm^{-1} (O-H), στα 1690 nm ή 5917 cm^{-1} (C-H) και στα 1790 nm ή 5586 cm^{-1} (C-H), οι οποίες οφείλονται σε υπέρτονους δονήσεων των μορίων του νερού, της αιθανόλης και άλλων οργανικών ενώσεων που εμπεριέχονται στον οίνο [6]. Για παράδειγμα, η υπερτονική μετάβαση του δεσμού (O-H) προκύπτει ως εξής: $2\nu_1 = 2 \times 3400 \text{ cm}^{-1} = 6800 \text{ cm}^{-1} \leftrightarrow 1471 \text{ nm} \sim 1450 \text{ nm}$, όπου ν_1 η συχνότητα δόνησης του δεσμού (O-H) σε κυματάριθμους cm^{-1} . Είναι αξιοσημείωτο ότι η εφαρμογή της μεθόδου Savitzky-Golay με ομαλοποίηση δεκαπέντε (15) σημείων μέσω ενός πολωνύμου $2^{\text{ου}}$ βαθμού και η $2^{\text{ου}}$ βαθμού παραγωγή των φασμάτων αποκαλύπτει διαφορές μεταξύ αυτών (**Εικόνα 7.7β**). Οι σημαντικότερες διαφορές επικεντρώνονται γύρω από την κορυφή των 1450 nm, οι οποίες πιθανόν να οφείλονται στη

διαφορετική περιεκτικότητα σε νερό και αιθανόλη μεταξύ των ποικιλιών. Από την οπτική απεικόνιση των προ-επεξεργασμένων φασμάτων στις δύο πρώτες κύριες συνιστώσες μετά την εφαρμογή της μεθόδου της ανάλυσης κύριων συνιστωσών (PCA), παρατηρείται μία ικανοποιητική διαφοροποίηση μεταξύ των τεσσάρων ποικιλιών οίνου (**Εικόνα 7.7γ**). Τα Loading Plots της **Εικόνας 7.7δ** επιβεβαιώνουν ότι η απορρόφηση γύρω από την κορυφή των 1450 nm συνεισφέρει περισσότερο στη διαφοροποίηση των ποικιλιών.

Ανάλυση Διακριτότητας Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (PLS-DA)

Για την επιβεβαίωση της ικανότητας της φασματοσκοπίας απορρόφησης εγγύς υπερόθρου στο διαχωρισμό των ποικιλιών οίνου, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ανάλυσης διακριτότητας μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA). Στον **Πίνακα 7.4** φαίνεται η απόλυτα επιτυχής πρόβλεψη της βοτανικής προέλευσης των ποικιλιών για τη σοδειά του 2013 σε χρονική περίοδο 6 μηνών ωρίμανσης.

Πίνακας 7.4 Κατηγοριοποίηση ποικιλιών σοδειάς 2013 σε χρονική περίοδο 6 μηνών ωρίμανσης

Cross Validation		Προβλεπόμενη Ομάδα				Ορθή
LV=3						Ταξινόμηση
VB(2)	# Δείγματα	Δαφνί	Βηλάνα	Κοτσιφάλι	Μαντηλάρι	%
Δαφνί	5	5	0	0	0	100
Βηλάνα	4	0	4	0	0	100
Κοτσιφάλι	6	0	0	6	0	100
Μαντηλάρι	6	0	0	0	6	100

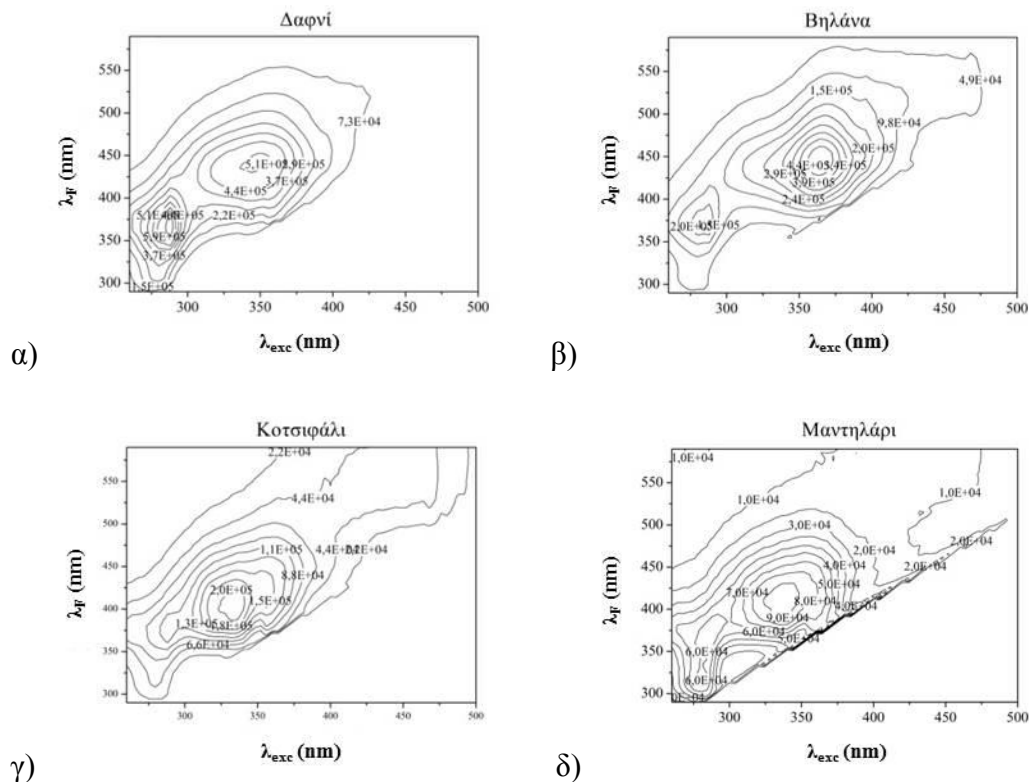
7.4 Διαχωρισμός Βοτανικής Προέλευσης με τη Φασματοσκοπία Φθορισμού

Στην τελευταία ενότητα αυτού του κεφαλαίου παρουσιάζονται τα αποτελέσματα, όσον αφορά στην ικανότητα της φασματοσκοπίας φθορισμού στον προσδιορισμό της βοτανικής προέλευσης του οίνου. Η προβολή του φθορισμού επιλέχθηκε να γίνει μέσω χαρτών φθορισμού (EEM) διότι μέσω αυτών επιτυγχάνεται μία πληρέστερη εικόνα σχετικά με τον φθορισμό του οίνου. Εναλλακτικά είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν φάσματα διέγερσης, εκπομπής και σύγχρονης σάρωσης.

Οι χάρτες φθορισμού προκύπτουν από τη διαδοχική συλλογή φασμάτων εκπομπής σε διαφορετικά μήκη κύματος διέγερσης τα οποία καλύπτουν το φασματικό προφίλ της απορρόφησης των δειγμάτων. Η μέτρηση του φθορισμού στα δείγματα της σοδειάς του 2012 πραγματοποιήθηκε με τη γεωμετρία της ορθής γωνίας (Right-Angle), ενώ η αντίστοιχη μέτρηση για τα δείγματα της σοδειάς του 2013 πραγματοποιήθηκε με τη γεωμετρία της εμπρόσθιας όψης (Front-Face). Τα αποτελέσματα από τη συνδυαστική εφαρμογή της φασματοσκοπίας φθορισμού με τη χημειομετρία, δείχνουν έναν αρκετά ικανοποιητικό διαχωρισμό των ποικιλιών, τόσο για τη σοδειά του 2012 (**βλέπε στο παράρτημα Εικόνα 7.11 και 7.12**) όσο και για τη σοδειά του 2013.

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τη μελέτη 83 δειγμάτων της σοδειάς του 2013. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε γεωμετρία εμπρόσθιας όψης χωρίς αραίωση των δειγμάτων. Το εύρος σάρωσης διέγερσης ήταν 260-500 nm με βήμα 4 nm, ενώ το εύρος σάρωσης εκπομπής ήταν 290-590 nm με βήμα 5 nm. Οι πειραματικοί παράμετροι διατηρήθηκαν σταθεροί σε όλες τις μετρήσεις (Integration Time 0.2 s, Slit Width Exc. 1 nm / Emiss. 5 nm). Στην **Εικόνα 7.8** απεικονίζονται τέσσερις χαρακτηριστικοί χάρτες φθορισμού, οι οποίοι αντιστοιχούν στις τέσσερις μελετώμενες ποικιλίες (Δαφνί, Βηλάνα, Κοτσιφάλι και Μαντηλάρι). Εκ πρώτης όψεως, διακρίνονται ομοιότητες και διαφορές ανάμεσα στους χάρτες, οι οποίες σχετίζονται με την ένταση του φθορισμού, αλλά και με το μήκος κύματος διέγερσης/εκπομπής. Σε όλους τους χάρτες εντοπίζονται δύο κύριες επιφάνειες φθορισμού 1) η πρώτη αντιστοιχεί σε διέγερση στην ευρύτερη περιοχή γύρω από τα 280 nm και εκπομπή στην ευρύτερη περιοχή γύρω από τα 360 nm 2) η δεύτερη αντιστοιχεί σε διέγερση γύρω στα 330 nm και εκπομπή γύρω στα 450 nm. Τόσο η πρώτη όσο και η δεύτερη επιφάνεια προκύπτουν από τη συνεισφορά πολλών φθοριζόντων συστατικών. Η πρώτη σχετίζεται με φαινολικές ενώσεις της οικογένειας των φαινολικών οξέων, φλαβονοειδών αλλά και πρωτεΐνες. Η δεύτερη συνδέεται και αυτή με φαινολικές ενώσεις της οικογένειας των φαινολικών οξέων και των φλαβονοειδών καθώς και με την οικογένεια των στυλβενοειδών [7, 8].

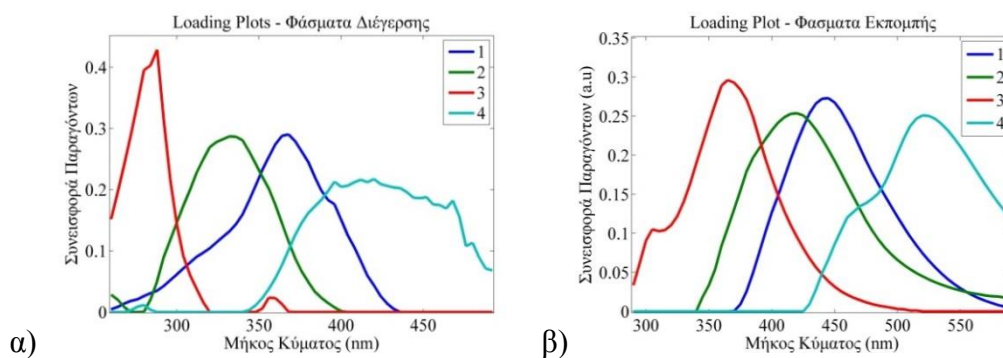
Τα φασματοσκοπικά δεδομένα περιγράφονται μέσω ενός πίνακα τριών διαστάσεων (83x61x61). Για τη διερευνητική χημειομετρική τους μελέτη, επιλέχθηκε η μέθοδος της ανάλυσης παράλληλων παραγόντων (PARAFAC). Εναλλακτικά θα μπορούσε να είχε γίνει εκδίπλωση των δεδομένων (83x3721) και χρήση U-PCA.



Εικόνα 7.8. Χάρτες Φθορισμού (ίδιας κλίμακας) για τις τέσσερις μελετώμενες ποικιλίες Οίνου α) Δαφνί β) Βηλάνα γ) Κοτσιφάλι δ) Μαντηλάρι.

Κατά την εφαρμογή της μεθόδου ακολουθήθηκαν οι εξής διαδικασίες 1) επιλέχθηκαν τέσσερις (4) παράγοντες, οι οποίοι αντιπροσωπεύουν το σύνολο των φθορίζοντων συστατικών του οίνου στα δείγματα της σοδειάς του 2013 και των οποίων η συνισταμένη συνεισφορά δημιουργεί τους χάρτες φθορισμού 2) πραγματοποιήθηκε φιλτράρισμα των χαρτών φθορισμού με απαλοιφή των δεδομένων στις ευρύτερες περιοχές γύρω από τις διαγώνιους, οι οποίες συνδέονται με φαινόμενα σκέδασης Rayleigh (1^{ης} και 2^{ης} τάξης) και έγινε αντικατάσταση των δεδομένων με μηδενικές τιμές σε περιοχές, όπου το μήκος κύματος εκπομπής ήταν μικρότερο από το μήκος κύματος διέγερσης ($\lambda_{em} < \lambda_{exc}$), καθώς και σε περιοχές όπου το μήκος κύματος εκπομπής ήταν διπλάσιο από το μήκος κύματος διέγερσης ($\lambda_{em} > 2\lambda_{exc}$) (sub-Rayleigh areas) 3) εφαρμόστηκε περιορισμός των λύσεων, οι οποίες προκύπτουν από το μαθηματικό μοντέλο σε μη αρνητικές τιμές (non-negativity, for scores and loadings), διατηρώντας με αυτόν τον τρόπο τη φυσική σημασία των περιγραφόμενων ιδιοτήτων (σχετική συγκέντρωση φθορίζοντων συστατικών και ένταση φθορισμού). Αποφασίστηκε να μην γίνει κάποια αφαίρεση ή διόρθωση στις περιοχές εμφάνισης της ανελαστικής σκέδασης Raman, εξαιτίας του γεγονότος ότι αυτές συμπίπτουν με

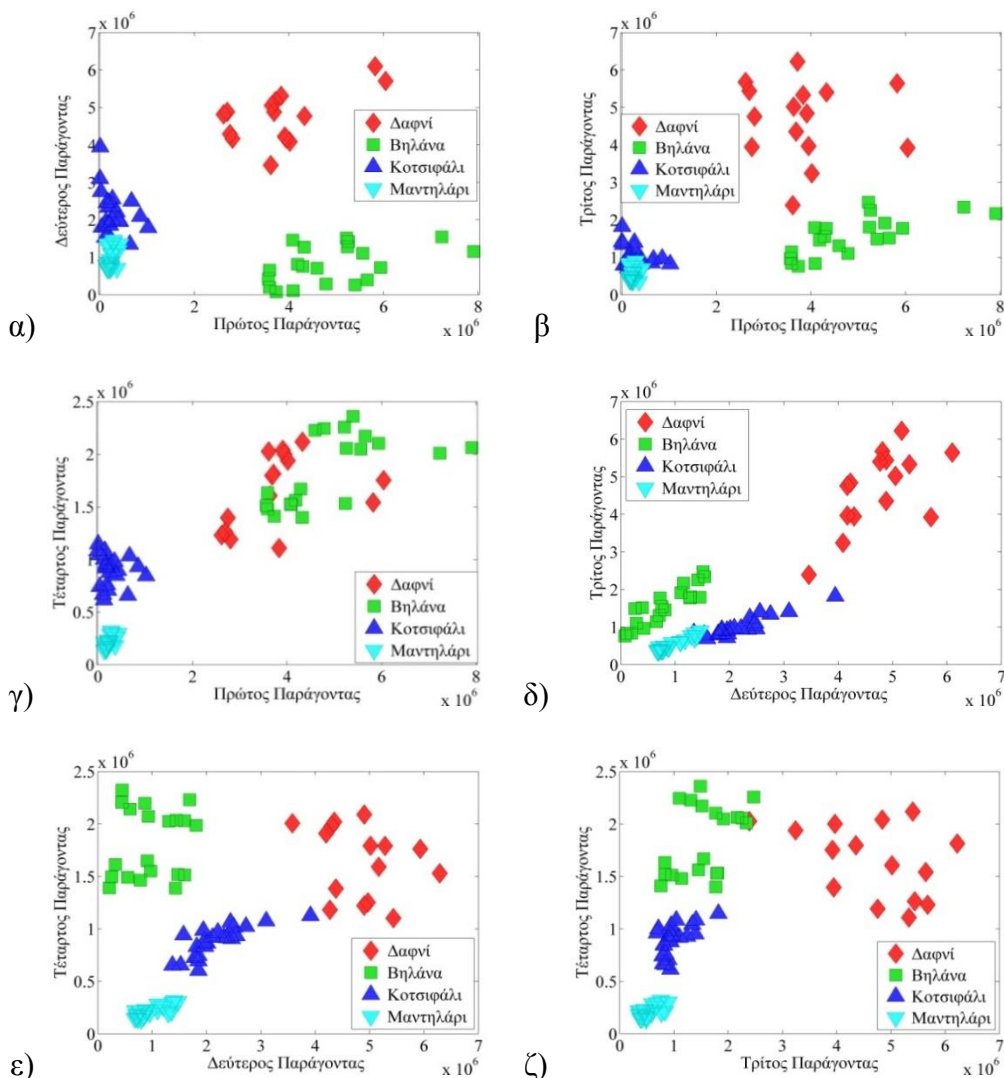
τις περιοχές εμφάνισης του φθορισμού και η ένταση εκπομπής της είναι αρκετές τάξεις μεγέθους χαμηλότερη. Το μοντέλο που προέκυψε ερμηνεύει το 98.7% της συνολικής διακύμανσης των δεδομένων, ενώ τα διαγνωστικά τεστ τα οποία εκτελέστηκαν επιβεβαιώνουν την αξιοπιστία του μαθηματικού μοντέλου. Στην **Εικόνα 7.9** απεικονίζονται τα Loading Plots (φάσματα διέγερσης και εκπομπής) των τεσσάρων παραγόντων. Οι τέσσερις (4) παράγοντες βάσει των οποίων προκύπτουν οι παρατηρούμενοι χάρτες φθορισμού είναι i) 1^{ος} παράγοντας (Διέγερση 368 nm / Εκπομπή 445 nm) ii) 2^{ος} παράγοντας (Διέγερση 332 nm/Εκπομπή 415 nm) iii) 3^{ος} παράγοντας (Διέγερση 284 nm/Εκπομπή 370 nm) iv) 4^{ος} παράγοντας (Διέγερση 416 nm/Εκπομπή 520 nm). Από την προβολή των δειγμάτων στους τέσσερις (4) παράγοντες (**Εικόνα 7.10**), παρατηρούνται σαφείς εικόνες διαχωρισμού ως προς την ποικιλία προέλευσης. Όλοι οι παράγοντες βρίσκονται αρκετά κοντά σε περιοχές όπου εμφανίζονται κορυφές φθορισμού τυπικών φθοριζόντων συστατικών του οίνου, όπως τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή, τα στυλβενοειδή, τα αμινοξέα και οι πρωτεΐνες. Αν εξαιρέσουμε τον 3^ο παράγοντα, ο οποίος ταυτίζεται αρκετά καλά με τις κορυφές φθορισμού των χημικών ενώσεων γαλλικό οξύ, κατεχίνη, κερκετίνη και τρυπτοφάνη [9], οι υπόλοιποι παράγοντες δεν είναι εφικτό να ταυτιστούν με απόλυτη αξιοπιστία με τις ιδιότητες φθορισμού συγκεκριμένων φθοριζουσών ουσιών. Αυτοί οι παράγοντες φθορισμού είναι δυνατό να έχουν προκύψει από τη συνεισφορά πολλών διαφορετικών φθοριζουσών ουσιών [10, 11].



Εικόνα 7.9. Διερευνητική μελέτη με την ανάλυση παράλληλων παραγόντων, Loading plots α) Φάσματα διέγερσης παραγόντων β) Φάσματα εκπομπής παραγόντων

Από τη συνδυαστική αξιολόγηση των Score Plots (**Εικόνα 7.10**), των Loading Plots (**Εικόνα 7.9**) αλλά και των χαρτών φθορισμού (**Εικόνα 7.8**) συνάγονται τα ακόλουθα 1) η φασματοσκοπία φθορισμού είναι ικανή να διαχωρίσει δείγματα οίνου προερχόμενα από τις τέσσερις ποικιλίες που εξετάζονται στην παρούσα μελέτη 2)

είναι σαφής η διαφοροποίηση μεταξύ λευκών και ερυθρών οίνων με την ένταση του φθορισμού για τους λευκούς να είναι σαφώς υψηλότερη (κατά μία τάξη μεγέθους συγκρινόμενη με την ένταση φθορισμού της ποικιλίας Μαντηλάρι) 3) από τα έξι συνολικά Score plots των τεσσάρων παραγόντων, τα Score plots μεταξύ των παραγόντων (2 έναντι 4) και των παραγόντων (3 έναντι 4) προσφέρουν τον καλύτερο διαχωρισμό μεταξύ των τεσσάρων ποικιλιών οίνου 4) ο 4^{ος} παράγοντας είναι ικανός να διαχωρίσει πλήρως τις δύο ερυθρές ποικιλίες με τους παράγοντες 1, 2 και 3 να προσφέρουν μόνο μία μερική διαφοροποίηση μεταξύ αυτών 5) ο 2^{ος} και ο 3^{ος} παράγοντας είναι ικανοί να διαχωρίσουν πλήρως τις δύο λευκές ποικιλίες με τους παράγοντες 1 και 4 να προσφέρουν μία μέτρια διαφοροποίηση.



Εικόνα 7.10. Διερευνητική μελέτη με την ανάλυση παράλληλων παραγόντων, Score Plots α) 1^{ου} - 2^{ου} παράγοντα β) 1^{ου} - 3^{ου} παράγοντα γ) 1^{ου} - 4^{ου} παράγοντα δ) 2^{ου} - 3^{ου} παράγοντα ε) 2^{ου} - 4^{ου} παράγοντα ζ) 3^{ου} - 4^{ου} παράγοντα

Βιβλιογραφία

1. R. Sanna, C. Piras, F.C. Marincola, V. Lecca, S. Maurichi, P.Scano, Multivariate Statistical Analysis of the UV-Vis Profiles of Wine Polyphenolic Extracts during Vinification. *Journal of Agricultural Science*. 2014, **6** (12), 152-162
2. C. Martin, J. Bruneel, F. Guyon, B. Médina, M. Jourdes, P. Teissedre, F.Guillaume, Raman Spectroscopy of white wines. *Food Chemistry*. 2015, **181**, 235-240
3. M. Urbano, M.D.L. De Castro, P.M. Pérez, J. García-Olmo, M.A. Gomez-Nieto, Ultraviolet–visible spectroscopy and pattern recognition methods for differentiation and classification of wines. *Food Chemistry*. 2005, **97**(1), 166-175
4. E. H. Annuar, J. Gierschner, J. Duroux, P. Trouillas, UV/Visible spectra of natural polyphenols: A time-dependent density. *Food Chemistry*. 2012, **131**, 79-89
5. F. He, N.N. Liang, L. Mu, Q.H. Pan, J. Wang, M.J. Reeves, C.Q. Duan, Anthocyanins and their variation in red Wines I. Monomeric anthocyanins and their color expression. *Molecules*. 2012, **17**, 1571-1601
6. D. Cozzolino, H.E. Smyth, M. Gishen, Feasibility study on the use of visible and Near-Infrared Spectroscopy together with Chemometrics to discriminate between commercial white wines of different varietal origins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2003, **51**, 7703-7708
7. D. Airado-Rodríguez, T. Galeano-Díaz, I. Durán Merás, J.P. Wold, Usefulness of Fluorescence Excitation-Emission Matrices in Combination with PARAFAC, as Fingerprints of Red Wines. *J. Agric. Food Chem*. 2009, **57**, 1711-1720
8. J. Christensen, L. Nørgaard, R. Bro, S. B. Engelsen, Multivariate Autofluorescence of Intact Food Systems. *Chemical Reviews*. 2005, **106** (6), 1979-1994
9. D. Airado-Rodríguez, I. Durán Merás, T. Galeano-Díaz, J.P. Wold, Front-face fluorescence spectroscopy: A new tool for control in the wine industry. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2011, **24**, 257-264
10. É. Dufour, A. Letort, A. Laguet, A. Lebecque, J.N. Serra, Investigation of variety, typicality and vintage of French and German wines using Front-Face fluorescence spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*. 2006, **563**, 292-299.

11. S. M. Azcarate, A. Gomes, M. R. Alcaraz, M. C. Agulino de Araújo, J. M. Camiña, H. C. Goicoechea, Modeling excitation–emission fluorescence matrices with pattern recognition algorithms for classification of Argentine white wines according grape variety. *Food Chemistry*. 2015, **184**, 214-219

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

Διαχωρισμός Σταδίου Ωρίμανσης

Ο προσδιορισμός του σταδίου ωρίμανσης ενός οίνου, χαρακτηριστικό το οποίο σχετίζεται με την ποιότητα του, αποτελεί θέμα ιδιαίτερου ενδιαφέροντος κατά την οίνο-παραγωγική διαδικασία. Στη βιβλιογραφία δεν εντοπίζονται πολλές επιστημονικές εργασίες οι οποίες να μελετούν την ικανότητα των φασματοσκοπικών τεχνικών της απορρόφησης και του φθορισμού στον προσδιορισμό του σταδίου ωρίμανσης ενός οίνου. Η περιορισμένη βιβλιογραφία πιθανόν να οφείλεται στη δυσκολία επίτευξης ενός τέτοιου ερευνητικού στόχου, εξαιτίας της μικρής επιρροής που ασκεί ο παράγοντας του χρόνου (σε σχέση με άλλους παράγοντες, όπως π.χ. η βοτανική προέλευση) στο χημικό αποτύπωμα ενός οίνου, όπως αυτό αντικατοπτρίζεται από τις συγκεκριμένες φασματοσκοπικές τεχνικές. Άξια αναφοράς, είναι η περίπτωση οίνων προερχόμενων από το σύμπλεγμα των νήσων Μαδέρα, για τους οποίους αποδεικνύεται ότι είναι εφικτή η πρόβλεψη του χρόνου παλαίωσης με τη χρήση της φασματοσκοπίας απορρόφησης υπεριώδους-ορατού (UV-VIS) σε συνδυασμό με τη χημειομετρική τεχνική των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS) [1].

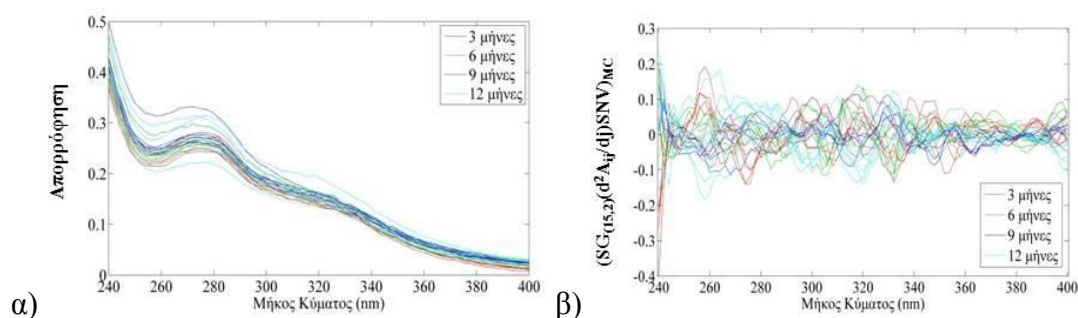
Στο πλαίσιο της παρούσας έρευνας επιλέχθηκαν δείγματα οίνου προερχόμενα από την ίδια ποικιλία σε χρόνους ωρίμανσης των 3, 6, 9 και 12 μηνών. Όπως προαναφέρθηκε, ο διαχωρισμός ως προς τον χρόνο ωρίμανσης μέσω των φασματοσκοπικών τεχνικών θεωρείται υψηλότερης δυσκολίας σε σχέση με την περίπτωση του διαχωρισμού μεταξύ ποικιλιών (Κεφ. 7). Επομένως, για την επίτευξη ενός τέτοιου διαχωρισμού απαιτείται μία πιο πολύπλοκη προ-επεξεργασία των φασματοσκοπικών δεδομένων η οποία πολλές φορές συνοδεύεται από κανονικοποίηση ή παραγωγή των φασμάτων. Στις ενότητες που ακολουθούν

παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μελέτης μας, όσον αφορά στην ικανότητα των φασματοσκοπικών τεχνικών της απορρόφησης (υπεριώδους, ορατού και εγγύς υπέρυθρου) και του φθορισμού σε συνδυασμό με τη χημειομετρία στον διαχωρισμό του οίνου, ως προς τον χρόνο ωρίμανσης. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης, δείχνουν ένα σχετικά καλό διαχωρισμό ως προς τον χρόνο ωρίμανσης στις επιλεγμένες περιπτώσεις δειγμάτων οι οποίες παρουσιάζονται στις επόμενες ενότητες.

8.1 Διαχωρισμός σταδίου ωρίμανσης με τη Φασματοσκοπία

Απορρόφησης Υπεριώδους.

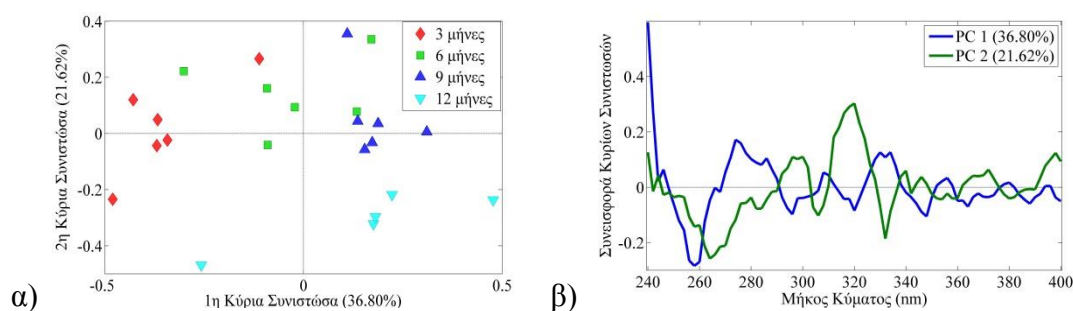
Στην ενότητα αυτή παρουσιάζεται η περίπτωση της ποικιλίας Κοτσιφάλι, σοδειά 2013 (24 δείγματα). Αρχικά προβάλλεται το σύνολο των φασμάτων απορρόφησης (240-400 nm) με σκοπό τον εντοπισμό ομοιοτήτων και διαφορών μεταξύ τους (**Εικόνα 8.1α**). Από την προβολή των φασμάτων παρατηρείται επικάλυψη μεταξύ των δειγμάτων των 3, 6, 9 και 12 μηνών ωρίμανσης αν και διαφαίνεται μία τάση διαφοροποίησης. Η προ-επεξεργασία των φασματοσκοπικών δεδομένων με την ομαλοποίηση Savitzky-Golay (15 σημείων με πολυώνυμο 2^{ου} βαθμού), την παραγωγή τους (2^{ου} βαθμού) και την εξάλειψη άλλων παραγόντων επιρροής με τη μέθοδο SNV, δεν δείχνει να αναδεικνύει διαφορές μεταξύ τους (**Εικόνα 8.1β**). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα πριν την εισαγωγή τους στα μαθηματικά μοντέλα, επικεντρώθηκαν στον μέσο όρο (Mean Centering). Η ποσότητα $(SG_{(15,2)}, d^2A_{ij}/dj^2, SNV)_{MC}$ υποδηλώνει συνολικά την προ-επεξεργασία στην οποία έχουν υποβληθεί τα δεδομένα των φασμάτων απορρόφησης.



Εικόνα 8.1. Φάσματα απορρόφησης στο υπεριώδες 240-400 nm α) χωρίς προ-επεξεργασία β) μετά την προ-επεξεργασία (ποικιλία Κοτσιφάλι)

Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA)

Για τη χημειομετρική διερευνητική μελέτη των φασμάτων απορρόφησης, χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση κύριων συνιστωσών. Οι πέντε (5) πρώτες κύριες συνιστώσες ερμηνεύουν το 83.5% της διακύμανσης των φασματοσκοπικών δεδομένων.



Εικόνα 8.2. Διερευνητική μελέτη με την ανάλυση κύριων συνιστωσών α) Score Plot στις πρώτες κύριες συνιστώσες β) Loading Plots στις πρώτες κύριες συνιστώσες

Η προβολή των δειγμάτων στις δύο πρώτες κύριες συνιστώσες αποκαλύπτει μία διαφοροποίηση μεταξύ των χρόνων ωρίμανσης (3, 6, 9 και 12 μήνες) (**Εικόνα 8.2α**). Οι δύο πρώτες κύριες συνιστώσες ερμηνεύουν το 58.4 % της συνολικής διακύμανσης των δεδομένων. Τα Loading Plots (**Εικόνα 8.2β**) υποδεικνύουν τις φασματικές περιοχές, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τον παρατηρούμενο διαχωρισμό. Ειδικότερα, από τη συνδυαστική αξιολόγηση των Score Plots, των Loading Plots αλλά και των αρχικών φασμάτων απορρόφησης προκύπτουν τα εξής 1) η φασματοσκοπία απορρόφησης στο υπεριώδες (240-400 nm) είναι ικανή να διαχωρίσει δείγματα οίνου σε διαφορετικούς χρόνους ωρίμανσης 2) για την περίπτωση της ποικιλίας Κοτσιφάλι, σοδειά 2013, τα δείγματα πρώιμου σταδίου ωρίμανσης (3 και 6 μηνών) συνδέονται με μία κορυφή απορρόφησης γύρω από τα 260 nm, ενώ τα δείγματα προχωρημένου σταδίου ωρίμανσης (9 και 12 μηνών) συνδέονται με μία κορυφή απορρόφησης γύρω από τα 280 nm 3) δύο κορυφές απορρόφησης στα 320 και 330 nm φαίνεται να διαφοροποιούν τα δείγματα που αντιστοιχούν σε χρόνο ωρίμανσης 12 μηνών σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα. Όπως και στην περίπτωση του διαχωρισμού ως προς την ποικιλία, είναι προφανές ότι οι προαναφερθείσες κορυφές δεν είναι εφικτό να αποδοθούν σε συγκεκριμένες χημικές ενώσεις, παρά ταύτα συνδέονται με την απορρόφηση φαινολικών συστατικών του οίνου.

Ανάλυση Διακριτότητας Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (PLS-DA)

Για την επιβεβαίωση της ικανότητας της φασματοσκοπίας υπεριώδους ως προς το διαχωρισμό με βάση τον χρόνο ωρίμανσης στην περίπτωση της ποικιλίας Κοτσιφάλι σοδειά 2013, χρησιμοποιήθηκε η χημειομετρική μέθοδος της ανάλυσης διακριτότητας μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA).

Πίνακας 8.1. Κατηγοριοποίηση με βάση τον χρόνο ωρίμανσης (Κοτσιφάλι 2013)

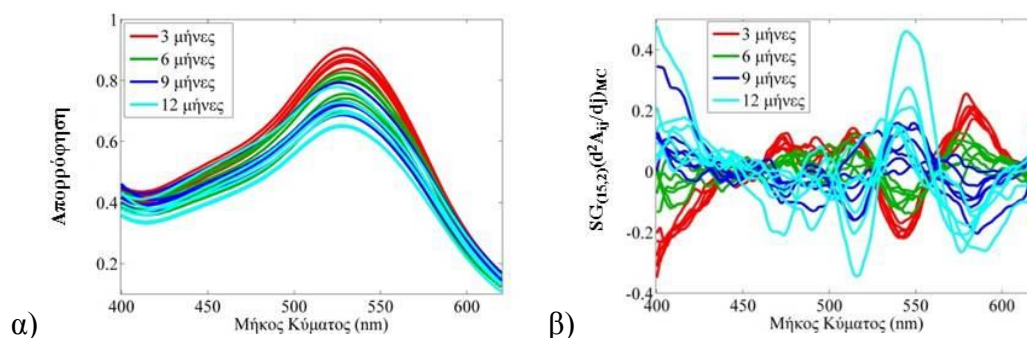
Cross Validation LV=7		Προβλεπόμενη Ομάδα				Ορθή Ταξινόμηση
VB(7)	# Δείγματα	3 μήνες	6 μήνες	9 μήνες	12 μήνες	%
3 μήνες	6	6	0	0	0	100
6 μήνες	6	1	5	0	0	83.3
9 μήνες	6	0	0	6	0	100
12 μήνες	6	0	0	0	6	100

Με βάση την ανάλυση PLS-DA επτά (7) λανθάνουσες μεταβλητές ερμηνεύουν το 87.1% της διακύμανσης των ανεξάρτητων μεταβλητών (φάσματα απορρόφησης υπεριώδους) και το 93.1% της διακύμανσης των εξαρτημένων μεταβλητών (χρόνος ωρίμανσης). Η αξιοπιστία του μαθηματικού μοντέλου ελέγχθηκε μέσω διασταυρωτικής αξιολόγησης (Cross-Validation) με τη μέθοδο Venetian-Blinds, η οποία βασίζεται στην επαναλαμβανόμενη εκτέλεση-έλεγχο του μαθηματικού αλγορίθμου με το διαχωρισμό του πίνακα των δεδομένων σε επιμέρους ομάδες. Στον **Πίνακα 8.1** απεικονίζεται η αξιόπιστη προβλεπτική ικανότητα του μαθηματικού μοντέλου.

8.2 Διαχωρισμός σταδίου ωρίμανσης με τη Φασματοσκοπία Απορρόφησης Ορατού

Στην περιοχή του ορατού απορροφούν φαινολικές ενώσεις της οικογένειας των ανθοκυανών, επομένως η μελέτη μας περιορίζεται στις ποικιλίες ερυθρού οίνου. Τα αποτελέσματα από τη συνδυαστική εφαρμογή της φασματοσκοπίας απορρόφησης ορατού με τη χημειομετρία, δείχνουν έναν σχετικά ικανοποιητικό διαχωρισμό ως

προς τον χρόνο ωρίμανσης. Στη συνέχεια, παρουσιάζεται η περίπτωση της ποικιλίας Μαντηλάρι σοδειάς 2013 (24 δείγματα).

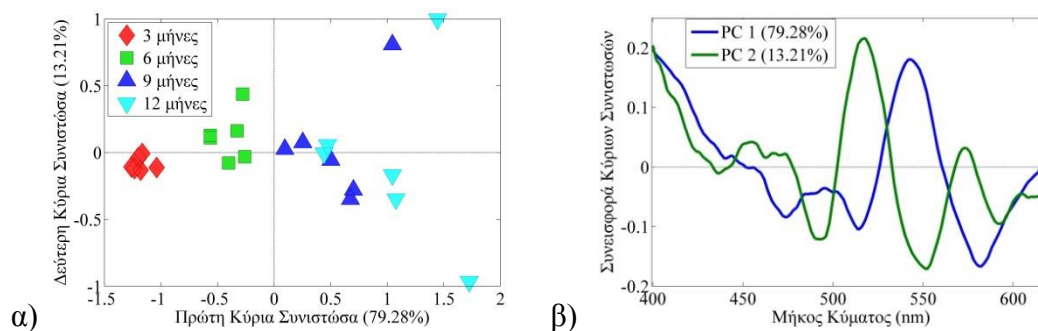


Εικόνα 8.3. Φάσματα απορρόφησης ορατού 400-620 nm α) χωρίς προ-επεξεργασία β) μετά την προ-επεξεργασία (ποικιλία Μαντηλάρι 2013)

Αρχικά προβάλλεται το σύνολο των φασμάτων απορρόφησης (400-620 nm) με σκοπό τον εντοπισμό ομοιοτήτων και διαφορών (**Εικόνα 8.3α**). Ήδη από αυτή την εικόνα είναι εμφανείς κάποιες διαφοροποιήσεις μεταξύ των φασμάτων με μία χαρακτηριστική πτωτική τάση της τιμής της απορρόφησης σε φάσματα δειγμάτων προχωρημένου σταδίου ωρίμανσης. Η προ-επεξεργασία των φασματοσκοπικών δεδομένων με την ομαλοποίηση Savitzky-Golay (15 σημείων, πολυώνυμο 2^{ου} βαθμού), η παραγωγή τους (2^{ου} βαθμού) και η εξάλειψη άλλων παραγόντων επιρροής με τη μέθοδο SNV, ενισχύει τις διαφοροποιήσεις ως προς την τιμή της απορρόφησης και επιπλέον αναδεικνύει διαφοροποιήσεις ως προς το μήκος κύματος. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα πριν την εισαγωγή τους στα μαθηματικά μοντέλα, επικεντρώθηκαν στον μέσο όρο (mean centering) (**Εικόνα 8.3β**).

Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA)

Με την εφαρμογή της μεθόδου της ανάλυσης κύριων συνιστωσών δίνεται μία καλύτερη οπτική απεικόνιση του διαχωρισμού. Οι δύο (2) πρώτες κύριες συνιστώσες ερμηνεύουν το 92.5% της διακύμανσης των φασματοσκοπικών δεδομένων. Από την προβολή των δειγμάτων στις δύο πρώτες κύριες συνιστώσες (**Εικόνα 8.4α**) παρατηρούνται διαφοροποιήσεις μεταξύ των διαφορετικών σταδίων ωρίμανσης κυρίως ως προς την πρώτη κύρια συνιστώσα, η οποία εξηγεί το 79.3% της συνολικής διακύμανσης και συνδέεται με χημικά είδη ανθοκυανών, τα οποία απορροφούν στα 540 και 580 nm, όπως φαίνεται στα Loading plots της **Εικόνας 8.4β**.



Εικόνα 8.4. Διερευνητική μελέτη με την ανάλυση κύριων συνιστωσών α) Score Plot στις πρώτες κύριες συνιστώσες β) Loading Plots στις πρώτες κύριες συνιστώσες

Η διαφοροποίηση στα δείγματα των 3 και 6 μηνών ωρίμανσης είναι σαφής, όμως δεν ισχύει το ίδιο στα δείγματα των 9 και 12 μηνών. Παράλληλα τα δείγματα προχωρημένου σταδίου ωρίμανσης (9 και 12 μηνών) διαφοροποιούνται ως προς τη δεύτερη κύρια συνιστώσα, η οποία εξηγεί το 13.2% της συνολικής διακύμανσης και συνδέεται με διαφορετικές χημικές μορφές, οι οποίες απορροφούν στα 510 και 550 nm (**Εικόνα 8.4β**).

Ανάλυση Διακριτότητας Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (PLS-DA)

Για την επιβεβαίωση της ικανότητας της φασματοσκοπίας απορρόφησης ορατού στον προσδιορισμό του σταδίου ωρίμανσης, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ανάλυσης διακριτότητας μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA).

Πίνακας 8.2. Κατηγοριοποίηση με βάση τον χρόνο ωρίμανσης ποικιλία Μαντηλάρι σοδειά 2013

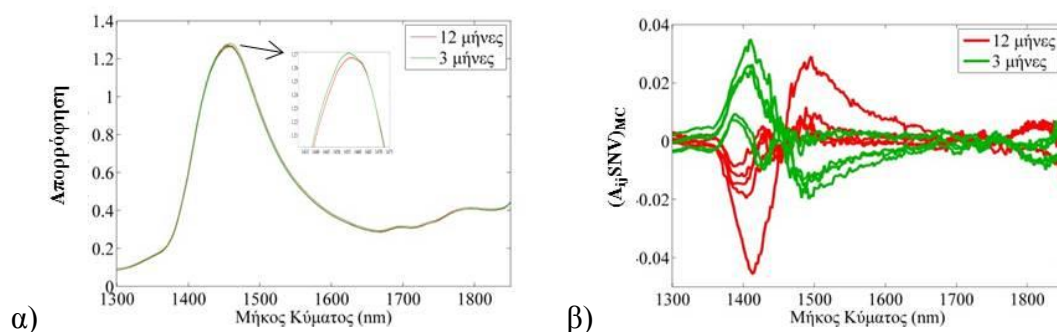
Cross Validation		Προβλεπόμενη Ομάδα				Ορθή
LV=5						Ταξινόμηση
VB(7)	# Δείγματα	3 μήνες	6 μήνες	9 μήνες	12 μήνες	%
3 μήνες	6	6	0	0	0	100
6 μήνες	6	1	5	0	0	100
9 μήνες	6	0	0	6	0	100
12 μήνες	6	0	1	1	4	66.6

Πέντε (5) λανθάνουσες μεταβλητές ερμηνεύουν το 96.9% της διακύμανσης των ανεξάρτητων μεταβλητών (φάσματα απορρόφησης ορατού) και το 82.9% της

διακύμανσης των εξαρτημένων μεταβλητών (χρόνος ωρίμανσης). Η αξιοπιστία του μαθηματικού μοντέλου ελέγχθηκε μέσω διασταυρωτικής αξιολόγησης (Cross-Validation) με τη μέθοδο Venetian-Blinds, η οποία βασίζεται στην επαναλαμβανόμενη εκτέλεση - έλεγχο του μαθηματικού αλγορίθμου με το διαχωρισμό του πίνακα των δεδομένων σε επιμέρους ομάδες. Στον **Πίνακα 8.2** φαίνεται η απόλυτα (100%) επιτυχημένη πρόβλεψη του μαθηματικού μοντέλου για τους χρόνους ωρίμανσης των 3, 6 και 9 μηνών ωρίμανσης και η κατά 66.6% επιτυχημένη πρόβλεψη για τα δείγματα που αντιστοιχούν σε 12 μήνες ωρίμανσης.

8.3 Διαχωρισμός σταδίου ωρίμανσης με τη Φασματοσκοπία Απορρόφησης Εγγύς Υπέρυθρου

Όσον αφορά στην ικανότητα της φασματοσκοπίας απορρόφησης εγγύς υπέρυθρου στον προσδιορισμό του σταδίου ωρίμανσης του οίνου, η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε δύο χρονικές περιόδους ωρίμανσης. Το φασματικό εύρος το οποίο επιλέχθηκε κυμαίνεται μεταξύ 1300-1800 nm. Στη συνέχεια παρουσιάζεται η περίπτωση της ποικιλίας Βηλάνα σοδειά 2013 σε χρόνους ωρίμανσης 3 και 12 μηνών (τα δείγματα των 3 μηνών μελετήθηκαν μετά την παραμονή τους 12 μήνες σε γυάλινη φιάλη, συνολικά μελετήθηκαν 10 δείγματα). Στην **Εικόνα 8.5α** απεικονίζονται τα φάσματα απορρόφησης στο εγγύς υπέρυθρο σε ένα εύρος από 1300 έως 1850 nm με εμφανείς διαφοροποιήσεις στην περιοχή γύρω από την κορυφή των 1450 nm εξαιτίας της υπέρτονου της δονητικής κίνησης (O-H) των μορίων του νερού και της αιθανόλης.



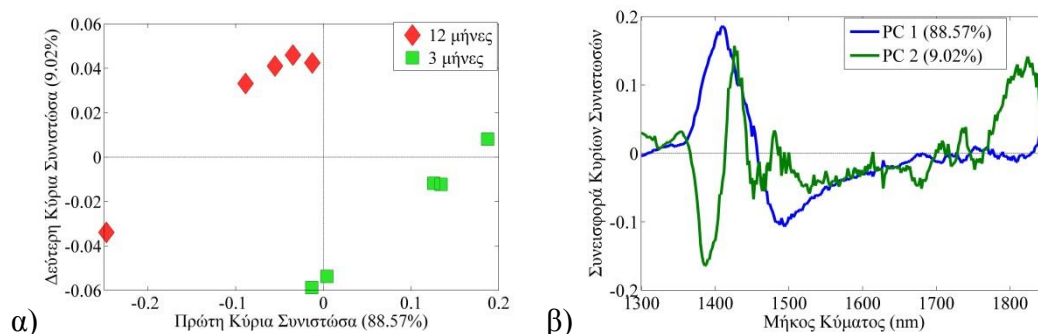
Εικόνα 8.5. Φάσματα Απορρόφησης Εγγύς Υπέρυθρου 1300-1850 nm (Βηλάνα 2013) α) χωρίς προ-επεξεργασία β) μετά την προ-επεξεργασία

Οι διαφοροποιήσεις αυτές αναδεικνύονται ακόμα περισσότερο μετά την προ-επεξεργασία των φασμάτων με τη μέθοδο SNV (**Εικόνα 8.5β**). Επιπλέον,

χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Mean Centering. Σημειώνεται ότι η ποσότητα (A_{ij} SNV)_{MC} υποδηλώνει συνολικά την προ-επεξεργασία στην οποία έχουν υποβληθεί τα δεδομένα των φασμάτων απορρόφησης.

Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA)

Με την εφαρμογή της μεθόδου της ανάλυσης κύριων συνιστωσών επιτυγχάνεται μία καλύτερη οπτική απεικόνιση του διαχωρισμού. Τρεις (3) κύριες συνιστώσες ερμηνεύουν το 98.7% της συνολικής διακύμανσης των φασματοσκοπικών δεδομένων.



Εικόνα 8.6. Διερευνητική μελέτη με την ανάλυση κύριων συνιστωσών α) Score Plot στις πρώτες κύριες συνιστώσες β) Loading Plots στις πρώτες κύριες συνιστώσες

Από την προβολή των δειγμάτων στις δύο πρώτες κύριες συνιστώσες φαίνεται μία σαφής διαφοροποίηση μεταξύ των σταδίων ωρίμανσης 3 και 12 μηνών (**Εικόνα 8.6α**). Η πρώτη κύρια συνιστώσα ερμηνεύει το 88.6% της συνολικής διακύμανσης των δεδομένων, ενώ η δεύτερη το 9.0%. Η διαφοροποίηση εξαρτάται τόσο από την πρώτη όσο και από τη δεύτερη κύρια συνιστώσα. Από τα Loading Plots (**Εικόνα 8.6β**) επιβεβαιώνεται ότι οι παρατηρούμενες διαφοροποιήσεις συνδέονται με την κύρια κορυφή απορρόφησης του οίνου στο εγγύς υπέρυθρο, η οποία εμφανίζεται στα 1450 nm και συνδέεται με την υπέρτονο της δονητικής κίνησης (O-H) των μορίων του νερού και της αιθανόλης.

Ανάλυση Διακριτότητας Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (PLS-DA)

Με την εφαρμογή της μεθόδου ανάλυσης διακριτότητας μερικών ελαχίστων τετραγώνων PLS-DA, επιβεβαιώνεται και μαθηματικά η ικανότητα της φασματοσκοπίας απορρόφησης εγγύς υπέρυθρου στον προσδιορισμό του σταδίου ωρίμανσης του οίνου. Το μαθηματικό μοντέλο το οποίο επιλέχθηκε αποτελείται από δύο (2) λανθάνουσες μεταβλητές και ερμηνεύει το 97.6% της διακύμανσης των

ανεξάρτητων μεταβλητών (φάσματα απορρόφησης υπεριώδους) και το 99.4% της διακύμανσης των εξαρτημένων μεταβλητών (χρόνος ωρίμανσης).

Πίνακας 8.3. Κατηγοριοποίηση με βάση τον χρόνο ωρίμανσης ποικιλία Βηλάννα 2013

Cross Validation	LV=3	Προβλεπόμενη Ομάδα		Ορθή
VB (4)	# Δείγματα	3 μήνες	12 μήνες	Ταξινόμηση %
3 μήνες	5	5	0	100
12 μήνες	5	0	5	100

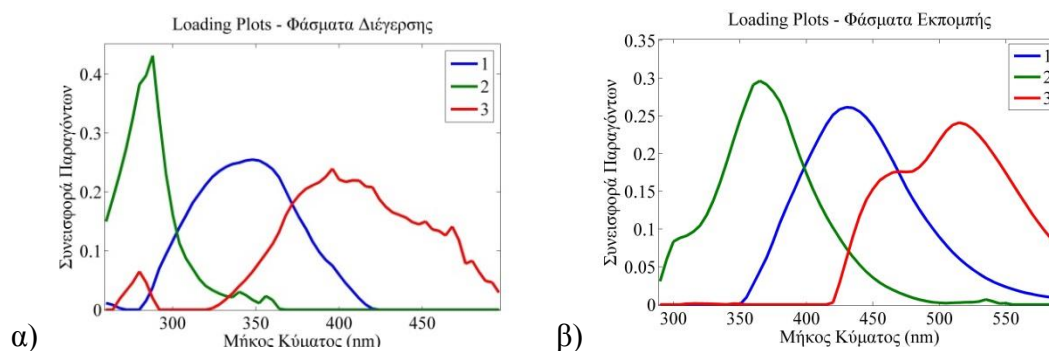
Η αξιοπιστία του μαθηματικού μοντέλου ελέγχθηκε μέσω διασταυρωτικής αξιολόγησης (Cross-Validation) με τη μέθοδο Leave-one-out, η οποία βασίζεται στην επαναλαμβανόμενη εκτέλεση-έλεγχο του μαθηματικού αλγορίθμου με τον αποκλεισμό ενός δείγματος κάθε φορά. Στον **Πίνακα 8.3** φαίνεται η αξιόπιστη προβλεπτική ικανότητα του μαθηματικού μοντέλου τόσο για τα δείγματα σε στάδιο ωρίμανσης 3 μηνών, όσο και για τα δείγματα σε στάδιο ωρίμανσης 6 μηνών.

8.4 Διαχωρισμός σταδίου ωρίμανσης με τη Φασματοσκοπία Φθορισμού

Όσον αφορά στην ικανότητα της φασματοσκοπίας φθορισμού να προσδιορίσει το στάδιο ωρίμανσης ενός οίνου παρουσιάζεται η περίπτωση της ποικιλίας Δαφνί σοδειά 2013. Οι μετρήσεις των συνολικά 15 δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν σε γεωμετρία εμπρόσθιας όψης (Front-Face). Το εύρος σάρωσης διέγερσης ήταν 260-496 nm με βήμα 4 nm, ενώ το εύρος σάρωσης εκπομπής ήταν 290-590 nm με βήμα 5 nm. Οι πειραματικές παράμετροι διατηρήθηκαν σταθερές σε όλες τις μετρήσεις (Integration Time 0.2 sec, Slit Width Exc. 1 nm/Emiss.5 nm). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα περιγράφονται μέσω ενός πίνακα τριών διαστάσεων (15x61x60). Για τη διερευνητική χημειομετρική τους μελέτη, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ανάλυσης παράλληλων παραγόντων (PARAFAC).

Κατά την εφαρμογή της μεθόδου ακολουθήθηκαν οι εξής διαδικασίες 1) επιλέχθηκαν τρεις παράγοντες, οι οποίοι αντιπροσωπεύουν καλά το σύνολο των φθορίζοντων συστατικών στα δείγματα της ποικιλίας Δαφνί, σοδειά 2013, και των οποίων η συνισταμένη συνεισφορά δημιουργεί τους χάρτες φθορισμού 2)

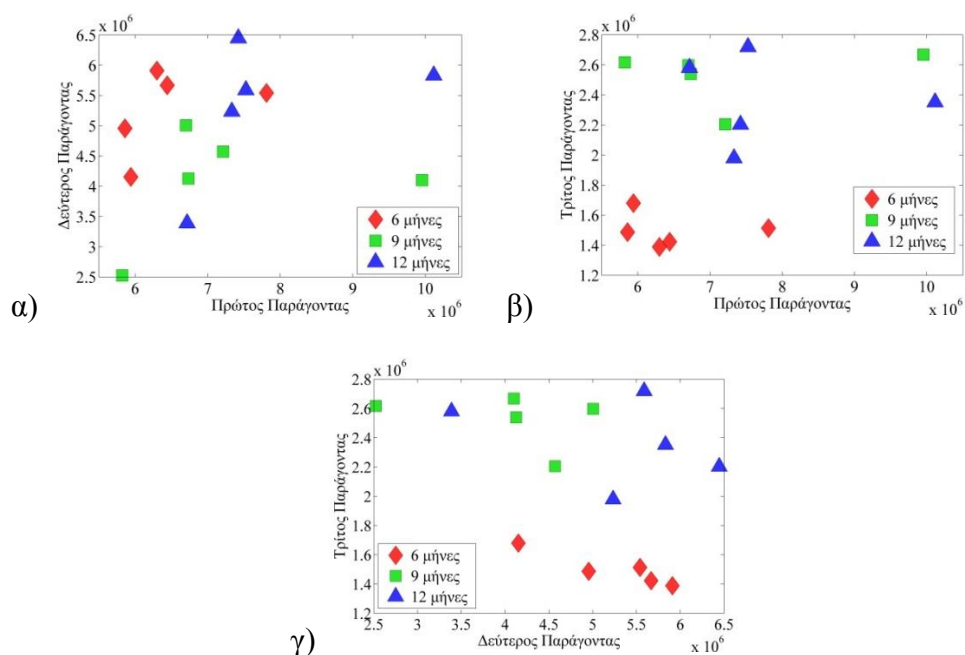
πραγματοποιήθηκε επεξεργασία των χαρτών φθορισμού με απαλοιφή των δεδομένων σε εύρος 15 nm γύρω από τις διαγώνιους, οι οποίες συνδέονται με φαινόμενα σκέδασης Rayleigh (1ης και 2ης τάξης) και έγινε αντικατάσταση των δεδομένων με μηδενικές τιμές σε περιοχές, όπου το μήκος κύματος εκπομπής ήταν μικρότερο από το μήκος κύματος διέγερσης ($\lambda_{em} < \lambda_{exc}$) καθώς και σε περιοχές όπου το μήκος κύματος εκπομπής ήταν διπλάσιο ή υπερδιπλάσιο από το μήκος κύματος διέγερσης ($\lambda_{em} > 2\lambda_{exc}$) (sub-Rayleigh areas) 3) εφαρμόστηκε περιορισμός των λύσεων, οι οποίες προκύπτουν από το μαθηματικό μοντέλο σε μη αρνητικές τιμές (non-negativity, for scores and loadings), διατηρώντας με αυτόν τον τρόπο τη φυσική σημασία των περιγραφόμενων ιδιοτήτων (σχετική συγκέντρωση φθοριζόντων συστατικών και ένταση φθορισμού). Το μοντέλο που προέκυψε ερμηνεύει το 99.1% της συνολικής διακύμανσης των δεδομένων, ενώ τα διαγνωστικά τεστ τα οποία εκτελέστηκαν επιβεβαιώνουν την αξιοπιστία του μαθηματικού μοντέλου (Core consistency 91%). Στην **Εικόνα 8.7** απεικονίζονται τα Loading plots (φάσματα διέγερσης και εκπομπής) των τριών παραγόντων. Οι τρεις (3) παράγοντες βάσει των οποίων προκύπτουν οι παρατηρούμενοι χάρτες φθορισμού είναι i) 1^{ος} παράγοντας (Διέγερση 350 nm/Εκπομπή 430 nm) ii) 2^{ος} παράγοντας (Διέγερση 287 nm/Εκπομπή 365 nm) iii) 3^{ος} παράγοντας (Διέγερση 400 nm/Εκπομπή 460 και 515 nm).



Εικόνα 8.7. Διερευνητική μελέτη με την ανάλυση παράλληλων παραγόντων, Loading plots α) Φάσματα διέγερσης παραγόντων β) Φάσματα εκπομπής παραγόντων

Από την προβολή των δειγμάτων στους τρεις παράγοντες (**Εικόνα 8.8**), παρατηρούνται σαφείς εικόνες διαχωρισμού ως προς τον χρόνο ωρίμανσης. Όλοι οι παράγοντες ευρίσκονται αρκετά κοντά σε περιοχές όπου εμφανίζονται κορυφές φθορισμού τυπικών φθοριζόντων συστατικών του οίνου, όπως φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή, στυλβενοειδή, αμινοξέα και πρωτεΐνες. Αυτοί οι παράγοντες φθορισμού

δύναται να έχουν προκύψει από τη συνεισφορά όλων αυτών των φθοριζουσών ουσιών.



Εικόνα 8.8. Διερευνητική μελέτη με την Ανάλυση Παράλληλων Παραγόντων, Score Plots α) 1ου - 2ου παράγοντα, β) 1ου - 3ου παράγοντα, γ) 2ου - 3ου παράγοντα

Από τη μελέτη άλλων περιπτώσεων οίνου, διαπιστώθηκε ότι τα αποτελέσματα ήταν σχετικά καλά ανεξάρτητα από την ποικιλία, τη σοδειά και τη γεωμετρία μέτρησης. Εξαίρεση αποτελούν οι λευκοί οίνοι της σοδειάς του 2012.

Βιβλιογραφία

1. A.C. Pereira, M.S. Reis, P.M. Saraiva, J.C. Marques, Development of a fast and reliable method for long- and short-term wine age prediction. *Talanta*. 2011, **86**, 293-304

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

Διαχωρισμός Τρόπου Ωρίμανσης

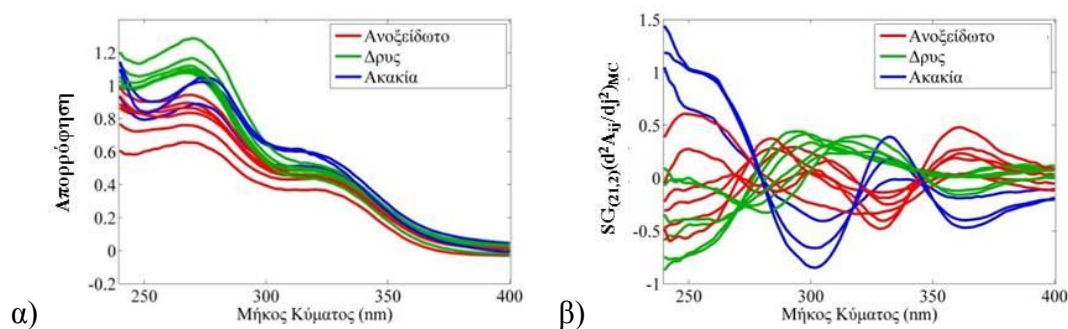
Ο προσδιορισμός του τρόπου ωρίμανσης (π.χ. ο περιέκτης μέσα στον οποίο πραγματοποιήθηκε η ωρίμανση) θεωρείται ένα εξίσου σημαντικό θέμα μελέτης εξαιτίας της άμεσης σχέσης του με τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του οίνου. Εκτός από τα συνηθισμένα δρύινα βαρέλια, τα τελευταία χρόνια έχουν αρχίσει να χρησιμοποιούνται εναλλακτικοί τρόποι ωρίμανσης. Στη μελέτη που παρουσιάζεται, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα οίνου κατόπιν ωρίμανσης με έξι διαφορετικούς τρόπους, σε ανοξειδωτες δεξαμενές, σε ανοξειδωτες δεξαμενές με την προσθήκη δρύινων ρινισμάτων, σε βαρέλι από ξύλο γαλλικής δρυός, σε βαρέλι από ξύλο ακακίας, σε βαρέλι από ξύλο αμερικάνικης δρυός και σε βαρέλι από ξύλο καστανιάς. Σημειώνεται ότι ο διαχωρισμός ως προς τον τρόπο ωρίμανσης με τη συνδυασμένη χρησιμοποίηση των φασματοσκοπικών τεχνικών και της χημειομετρίας είναι ένας αρκετά δύσκολος στόχος. Η μικρή επιρροή του παράγοντα του περιέκτη σε σχέση με άλλους παράγοντες επιρροής στο χημικό αποτύπωμα ενός οίνου όπως αυτό καταγράφεται από τις συγκεκριμένες φασματοσκοπικές τεχνικές, πιθανόν να είναι η αιτία της απουσίας από τη βιβλιογραφία τέτοιων επιστημονικών μελετών.

Για την απλοποίηση της μελέτης οι έξι διαφορετικοί τρόποι ωρίμανσης συμπτύχθηκαν σε τέσσερις κατηγορίες **ανοξειδωτες δεξαμενές, δρύινα βαρέλια, βαρέλια ακακίας και βαρέλια καστανιάς**. Όπως και στην περίπτωση του διαχωρισμού ως προς τον χρόνο ωρίμανσης (**Κεφ. 8**) ακολουθήθηκε πιο σύνθετη διαδικασία προ-επεξεργασίας των φασματοσκοπικών δεδομένων. Τα μελετώμενα δείγματα, προήλθαν τόσο από τη σοδειά του 2012 όσο και από τη σοδειά του 2013. Τα δείγματα της σοδειάς του 2012 ωρίμασαν σε νέα (πρώτης χρήσης) βαρέλια, ενώ

τα δείγματα της σοδειάς του 2013 σε βαρέλια τα οποία είχαν ξαναχρησιμοποιηθεί (δεύτερης χρήσης). Στις ενότητες που ακολουθούν παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μελέτης μας, όσον αφορά στην ικανότητα των φασματοσκοπικών τεχνικών της απορρόφησης (υπεριώδους και ορατού) και του φθορισμού σε συνδυασμό με τη χημειομετρία, στο διαχωρισμό του οίνου ως προς τον τρόπο ωρίμανσης. Σε κάποιες περιπτώσεις επιτυγχάνεται ικανοποιητικός διαχωρισμός, ενώ σε κάποιες άλλες τα αποτελέσματα είναι ασαφή. Σημειώνεται ότι διαχωρισμός με τη φασματοσκοπία εγγύς υπέρυθρου δεν ήταν εφικτός.

9.1 Διαχωρισμός τρόπου ωρίμανσης με τη Φασματοσκοπία Απορρόφησης Υπεριώδους

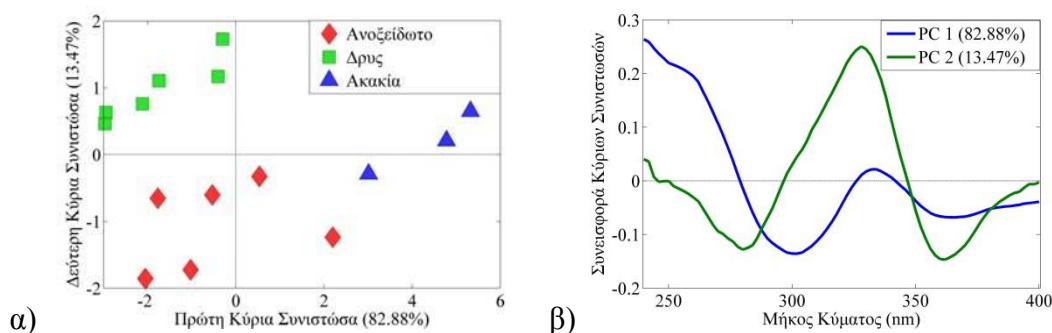
Για την παρουσίαση του διαχωρισμού ως προς τον τρόπο ωρίμανσης επιλέχθηκε η περίπτωση της ποικιλίας Βηλάνα, σοδειά 2012 (15 δείγματα). Αρχικά προβάλλεται το σύνολο των φασμάτων απορρόφησης (240-400 nm) με σκοπό τον εντοπισμό ομοιοτήτων και διαφορών μεταξύ τους (**Εικόνα 9.1α**). Ήδη από την προβολή των φασμάτων παρατηρούνται τρεις διαφορετικές ομάδες φασμάτων με τους αντίστοιχους χρωματισμούς, οι οποίες ταυτίζονται με τις διαφορετικές κατηγορίες τρόπου ωρίμανσης. Η προ-επεξεργασία των φασματοσκοπικών δεδομένων με την ομαλοποίηση Savitzky-Golay (21 σημείων με πολυώνυμο 2^ο βαθμού), την παραγωγή τους (2^ο βαθμού) και την εξάλειψη άλλων παραγόντων επιρροής με τη μέθοδο SNV αναδεικνύει διαφορές μεταξύ τους. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Mean Centering, ενώ σημειώνεται ότι η ποσότητα $(SG_{(21,2)}, d^2A_{ij}/dj^2, SNV)_{MC}$ υποδηλώνει συνολικά την προ-επεξεργασία στην οποία έχουν υποβληθεί τα δεδομένα των φασμάτων απορρόφησης (**Εικόνα 9.1β**).



Εικόνα 9.1. Φάσματα απορρόφησης στο υπεριώδες 240-400 nm α) χωρίς προ-επεξεργασία β) μετά την προ-επεξεργασία (ποικιλία Βηλάνα)

Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA)

Για τη χημειομετρική διερευνητική μελέτη των φασμάτων απορρόφησης, χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση κύριων συνιστωσών. Τέσσερις (4) κύριες συνιστώσες περιγράφουν το 99.5% της διακύμανσης των φασματοσκοπικών δεδομένων. Η προβολή των δειγμάτων στις δύο πρώτες κύριες συνιστώσες δείχνει ένα σαφή διαχωρισμό μεταξύ των τριών κατηγοριών (ανοξειδωτες δεξαμενές, δρυς και ακακία) (**Εικόνα 9.2α**). Οι δύο πρώτες κύριες συνιστώσες περιγράφουν το 96.3% της συνολικής διακύμανσης των δεδομένων, ενώ τα Loading Plots (**Εικόνα 9.2β**) υποδεικνύουν τις φασματικές περιοχές, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τον παρατηρούμενο διαχωρισμό. Από τη συνδυαστική αξιολόγηση των Score Plots, των Loading Plots αλλά και των αρχικών φασμάτων απορρόφησης συνάγονται τα εξής 1) η φασματοσκοπία απορρόφησης στο υπεριώδες τμήμα του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος (240-400 nm) είναι ικανή να διαχωρίσει δείγματα οίνου βάσει του τρόπου ωρίμανσης 2) όπως φαίνεται από τα αρχικά φάσματα, δείγματα τα οποία ωρίμασαν σε βαρέλια ακακίας συνδέονται περισσότερο με την κορυφή απορρόφησης γύρω στα 330 nm, ενώ δείγματα τα οποία ωρίμασαν σε δρύινα βαρέλια συνδέονται περισσότερο με την κορυφή απορρόφησης γύρω στα 280 nm 3) δείγματα τα οποία αποθηκεύτηκαν σε ανοξειδωτες δεξαμενές εμφανίζουν μία πιο ουδέτερη συμπεριφορά. Η απορρόφηση στην ευρύτερη περιοχή των 330 nm αποδίδεται περισσότερο σε φαινολικές ενώσεις της οικογένειας των φλαβονοειδών και των κινναμωμικών οξέων, ενώ η κορυφή στα 280 nm σε φαινολικές ενώσεις της οικογένειας των βενζοϊκών οξέων [1].



Εικόνα 9.2. Διερευνητική μελέτη με την ανάλυση κύριων συνιστωσών α) Score Plot στις πρώτες κύριες συνιστώσες β) Loading Plots στις πρώτες κύριες συνιστώσες

Ανάλυση Διακριτότητας Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (PLS-DA)

Για την επιβεβαίωση της ικανότητας της φασματοσκοπίας υπεριώδους ως προς τον διαχωρισμό με βάση τον τρόπο ωρίμανσης στην περίπτωση της ποικιλίας Βηλάνα, σοδειά 2012, χρησιμοποιήθηκε η χημειομετρική μέθοδος της ανάλυσης διακριτότητας μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA). Δύο (2) λανθάνουσες μεταβλητές συνολικά περιγράφουν το 96.3% της διακύμανσης των ανεξάρτητων μεταβλητών (φάσματα απορρόφησης υπεριώδους) και το 80.0% της διακύμανσης των εξαρτημένων μεταβλητών (χρόνος ωρίμανσης). Η αξιοπιστία του μαθηματικού μοντέλου ελέγχθηκε μέσω διασταυρωτικής αξιολόγησης (Cross-Validation) με τη μέθοδο Venetian-Blinds, η οποία βασίζεται στην επαναλαμβανόμενη εκτέλεση - έλεγχο του μαθηματικού αλγορίθμου με τον διαχωρισμό του πίνακα των δεδομένων σε επιμέρους ομάδες. Στον **Πίνακα 9.1** απεικονίζεται η καλή προβλεπτική ικανότητα του μαθηματικού μοντέλου με την απόλυτα επιτυχημένη (100%) πρόβλεψη όλων των κατηγοριών.

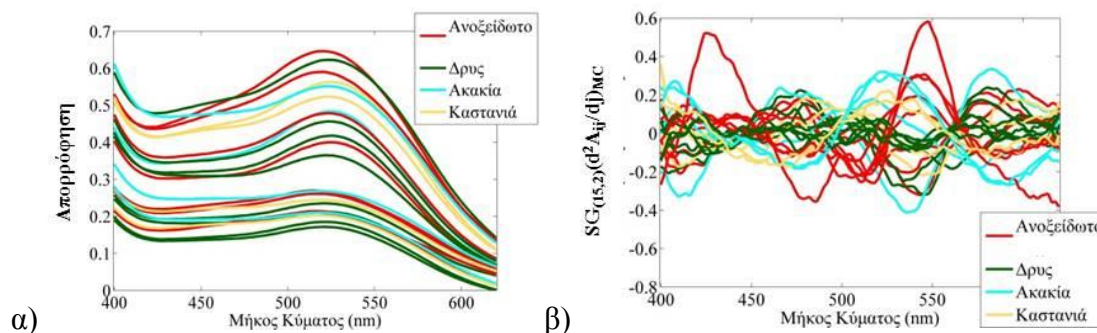
Πίνακας 9.1. Κατηγοριοποίηση τρόπου ωρίμανσης Βηλάνα 2012

Cross Validation	LV=2	Προβλεπόμενη Ομάδα			Ορθή Ταξινόμηση %		
		VB(7)	# Δείγματα	Ιnox		Δρυς	Ακακία
		Ιnox	6	6	0	0	100
		Δρυς	6	0	6	0	100
Ομάδα		Ακακία	3	0	0	3	100

9.2 Διαχωρισμός τρόπου ωρίμανσης με τη Φασματοσκοπία Απορρόφησης Ορατού

Όσον αφορά στο διαχωρισμό του τρόπου ωρίμανσης στο ορατό τμήμα του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, παρουσιάζεται η περίπτωση της ποικιλίας Κοτσιφάλι, σοδειά 2013 (24 δείγματα). Η προβολή του συνόλου των φασμάτων απορρόφησης (400-620 nm) έχει ως σκοπό τον εντοπισμό ομοιοτήτων και διαφορών μεταξύ τους (**Εικόνα 9.3α**). Από αυτή τη προβολή δεν δίνεται μία ευκρινής εικόνα διαχωρισμού για τους διαφορετικούς τρόπους ωρίμανσης. Η προ-επεξεργασία των

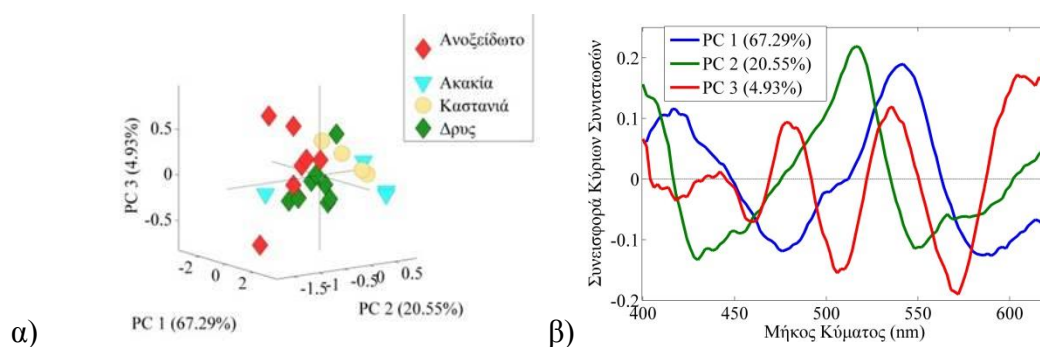
φασματοσκοπικών δεδομένων με την ομαλοποίηση Savitzky-Golay (15 σημείων με πολυώνυμο 2^{ου} βαθμού), την παραγωγή τους (2^{ου} βαθμού) και την εξάλειψη άλλων παραγόντων επιρροής με τη μέθοδο SNV αναδεικνύει μικρές διαφορές μεταξύ τους. Πριν την εισαγωγή των δεδομένων στα μαθηματικά μοντέλα εφαρμόστηκε η μέθοδος Mean Centering (**Εικόνα 9.3β**).



Εικόνα 9.3. Φάσματα Απορρόφησης Ορατού (400-620 nm) ποικιλία Κοτσιφάλι 2013 α) χωρίς προ-επεξεργασία β) μετά την προ-επεξεργασία

Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA)

Με την εφαρμογή της μεθόδου της ανάλυσης κύριων συνιστωσών δίνεται μία σχετικά καλή οπτική απεικόνιση του διαχωρισμού. Τρεις (3) κύριες συνιστώσες ερμηνεύουν το 92.8% της διακύμανσης των φασματοσκοπικών δεδομένων. Από την προβολή των δειγμάτων στις πρώτες κύριες συνιστώσες (**Εικόνα 9.4α**), μία σχετικά καλή διαφοροποίηση αρχίζει να γίνεται εμφανής. Αυτή η διαφοροποίηση αποδίδεται σε ανθοκυάνες, οι οποίες απορροφούν σε μήκη κύματος των 425, 475, 510, 540 και 570nm.



Εικόνα 9.4. Διερευνητική μελέτη με την ανάλυση κύριων συνιστωσών α) Score Plot στις πρώτες κύριες συνιστώσες β) Loading Plots στις πρώτες κύριες συνιστώσες

Ανάλυση Διακριτότητας Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (PLS-DA)

Για την επιβεβαίωση της ικανότητας της φασματοσκοπίας απορρόφησης ορατού στον προσδιορισμό του τρόπου ωρίμανσης, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ανάλυσης διακριτότητας μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA). Δώδεκα (12) λανθάνουσες μεταβλητές ερμηνεύουν το 99.5% της διακύμανσης των ανεξάρτητων μεταβλητών (φάσματα απορρόφησης ορατού) και το 93.3% της διακύμανσης των εξαρτημένων μεταβλητών (χρόνος ωρίμανσης). Η αξιοπιστία του μαθηματικού μοντέλου ελέγχθηκε μέσω διασταυρωτικής αξιολόγησης (Cross-Validation) με τη μέθοδο Venetian-Blinds, η οποία βασίζεται στην επαναλαμβανόμενη εκτέλεση - έλεγχο του μαθηματικού αλγορίθμου με τον διαχωρισμό του πίνακα των δεδομένων σε επιμέρους ομάδες. Στον **Πίνακα 9.2** φαίνεται η σχετικά καλή προβλεπτική ικανότητα του μαθηματικού μοντέλου με την απόλυτα επιτυχημένη (κατά 100%) πρόβλεψη για τα δείγματα τα οποία ωρίμασαν στο βαρέλι της καστανιάς, ένα ποσοστό 75% επιτυχημένης πρόβλεψη παρατηρείται για τα δείγματα τα οποία ωρίμασαν στο βαρέλι της ακακίας, ποσοστό 62.5% για τα δείγματα τα οποία αποθηκεύτηκαν σε ανοξειδωτες δεξαμενές και 87.5% για τα δείγματα τα οποία ωρίμασαν σε δρύινα βαρέλια.

Πίνακας 9.2. Κατηγοριοποίηση βάσει του τρόπου ωρίμανσης ποικιλία Κοτσιφάλι, σοδειά 2013

Cross Validation		Προβλεπόμενη Ομάδα				Ορθή
VB(7)	#	Ιnox	Δρυς	Ακακία	Καστανι	Ταξινόμηση
Ιnox	8	5	2	1	0	62.5
Δρυς	8	0	7	0	1	87.5
Ακακία	4	0	0	3	1	75
Καστανιά	4	0	0	0	4	100

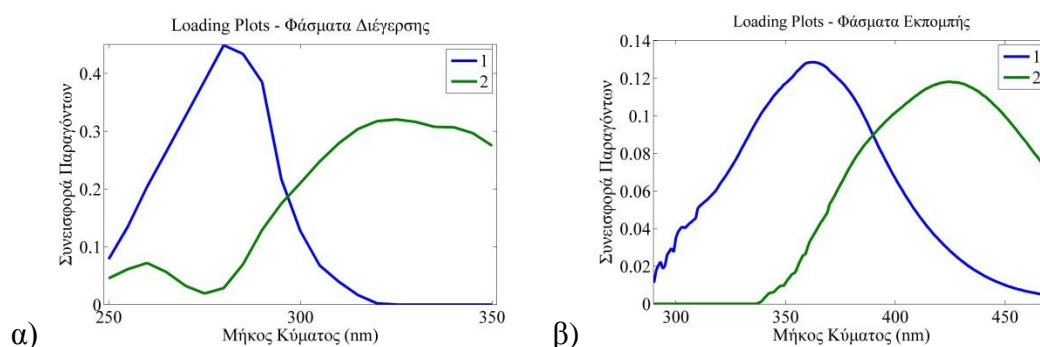
9.3 Διαχωρισμός τρόπου ωρίμανσης με τη Φασματοσκοπία

Φθορισμού

Όσον αφορά στην ικανότητα της φασματοσκοπίας φθορισμού στον προσδιορισμό του τρόπου ωρίμανσης ενός οίνου για τις περισσότερες των περιπτώσεων ο διαχωρισμός με βάση τον τρόπο ωρίμανσης δεν κατέστη εφικτός. Στη

συνέχεια όμως παρουσιάζεται μία επιτυχής περίπτωση διαχωρισμού που αφορά στην ποικιλία Δαφνί, σοδειά 2012. Οι μετρήσεις των συνολικά 15 δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν σε γεωμετρία ορθής γωνίας (Right-Angle). Το εύρος σάρωσης διέγερσης ήταν 250-350 nm με βήμα 5 nm, ενώ το εύρος σάρωσης εκπομπής ήταν 290-470 nm με βήμα 1 nm. Οι πειραματικές παράμετροι διατηρήθηκαν σταθερές σε όλες τις μετρήσεις (Integration Time 0.2 s, Slit Width Exc. 1 nm/Emiss. 5 nm). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα περιγράφονται μέσω ενός πίνακα τριών διαστάσεων (15x181x21). Για τη διερευνητική χημειομετρική τους μελέτη, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ανάλυσης παράλληλων παραγόντων (PARAFAC).

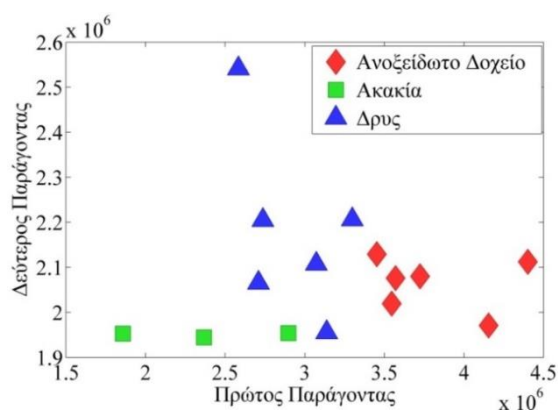
Κατά την εφαρμογή της μεθόδου ακολουθήθηκαν οι εξής διαδικασίες 1) επιλέχθηκαν δύο (2) παράγοντες οι οποίοι αντιπροσωπεύουν το σύνολο των φθορίζόντων συστατικών στα δείγματα της ποικιλίας Δαφνί σοδειά 2012 και των οποίων η συνισταμένη συνεισφορά δημιουργεί τους χάρτες φθορισμού 2) πραγματοποιήθηκε επεξεργασία των χαρτών φθορισμού με απαλοιφή των δεδομένων σε εύρος 8 nm γύρω από τις διαγώνιους, οι οποίες συνδέονται με φαινόμενα σκέδασης Rayleigh (1^{ης} τάξης) και έγινε αντικατάσταση των δεδομένων με μηδενικές τιμές σε περιοχές, όπου το μήκος κύματος εκπομπής ήταν μικρότερο από το μήκος κύματος διέγερσης ($\lambda_{em} < \lambda_{exc}$) (sub-Rayleigh areas) 3) εφαρμόστηκε περιορισμός των λύσεων, σε μη αρνητικές τιμές (non-negativity, for scores and loadings) διατηρώντας με αυτόν τον τρόπο τη φυσική σημασία των περιγραφόμενων ιδιοτήτων (σχετική συγκέντρωση φθορίζουσών ουσιών και ένταση φθορισμού).



Εικόνα 9.5. Διερευνητική μελέτη με την Ανάλυση Παράλληλων Παραγόντων, Loading plots α) Φάσματα Διέγερσης δύο παραγόντων β) Φάσματα Εκπομπής δύο παραγόντων

Το μοντέλο το οποίο προέκυψε εξηγεί το 98.8% της συνολικής διακύμανσης των δεδομένων, ενώ τα διαγνωστικά τεστ τα οποία εκτελέστηκαν επιβεβαιώνουν την

αξιοπιστία του μαθηματικού μοντέλου (Core Consistency 100%). Στην **Εικόνα 9.5** απεικονίζονται τα Loading plots (φάσματα διέγερσης και εκπομπής) των δύο παραγόντων. Οι δύο παράγοντες βάσει των οποίων προκύπτουν οι παρατηρούμενοι χάρτες φθορισμού είναι i) 1^{ος} παράγοντας (Διέγερση 280 nm/Εκπομπή 360 nm) και ii) 2^{ος} παράγοντας (Διέγερση 330 nm/Εκπομπή 440 nm). Από την προβολή των δειγμάτων στους δύο παράγοντες (**Εικόνα 9.6**), παρατηρείται μία σαφής εικόνα διαχωρισμού ως προς τον τρόπο ωρίμανσης. Τα δείγματα τα οποία ωρίμασαν στο βαρέλι της ακακίας χαρακτηρίζονται από χαμηλές τιμές τόσο στον πρώτο όσο και στον δεύτερο παράγοντα, τα δείγματα τα οποία αποθηκεύτηκαν σε ανοξειδωτές δεξαμενές εμφανίζουν χαμηλές τιμές στον δεύτερο παράγοντα αλλά υψηλές στον πρώτο, ενώ τα δείγματα τα οποία ωρίμασαν σε δρύινα βαρέλια χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη διασπορά με υψηλότερες και χαμηλότερες τιμές τόσο στον πρώτο όσο και στον δεύτερο παράγοντα. Ο πρώτος παράγοντας δύναται να συνδεθεί με χημικές ενώσεις όπως το γαλλικό οξύ, η κατεχίνη, η κερκετίνη και η τρυπτοφάνη [2]. Ο δεύτερος παράγοντας συνδέεται με χημικές ενώσεις όπως το γεντισικό οξύ και τα στυλβενοειδή.



Εικόνα 9.6. Διερευνητική μελέτη με την Ανάλυση Παράλληλων Παραγόντων, Score Plots 1^{ου} - 2^{ου} παράγοντα

Βιβλιογραφία

1. R. Sanna, C. Piras, F.C. Marincola, V. Lecca, S. Maurichi, P.Scano, Multivariate Statistical Analysis of the UV-Vis Profiles of Wine Polyphenolic Extracts during Vinification. *Journal of Agricultural Science*. 2014, **6** (12). 152-162
2. D. Airado-Rodríguez, I. Durán Merás, T. Galeano-Díaz, J.P. Wold, Front-Face fluorescence spectroscopy: A new tool for control in the wine industry. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2011, **24**, 257-264

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10

Συσχέτιση Αποτελεσμάτων μεταξύ Φασματοσκοπίας Απορρόφησης και άλλων Αναλυτικών Μεθόδων ή Οργανοληπτικών Αξιολογήσεων. Δημιουργία Μοντέλων Πρόβλεψης

Οι τεχνικές φασματοφωτομετρικής ανάλυσης χαρακτηρίζονται από απλότητα στη διεξαγωγή καθώς απαιτείται ελάχιστη (κυρίως αραιώσεις) ή μηδενική προεπεξεργασία του δείγματος, διαθέτουν υψηλή ευαισθησία, ενώ έχουν σχετικά χαμηλό κόστος εξοπλισμού και αντίστοιχα χαμηλό κόστος ανάλυσης [1]. Τα χαρακτηριστικά αυτά έχουν οδηγήσει επιστήμονες, ειδικότερα στο πεδίο του ελέγχου ποιότητας τροφίμων στη διερεύνηση της πιθανότητας αντικατάστασης πολύπλοκων, ακριβών και χρονοβόρων αναλυτικών μεθόδων με πιο απλές φασματοσκοπικές τεχνικές [2]. Προς αυτή την κατεύθυνση, με τη βοήθεια χημειομετρικών μεθόδων δημιουργούνται μοντέλα πρόβλεψης, τα οποία συσχετίζουν τα φασματοσκοπικά δεδομένα με πιο ακριβή δεδομένα προερχόμενα από άλλες αναλυτικές τεχνικές αναφοράς που παρέχουν εξειδικευμένη μοριακή πληροφορία, στοχεύοντας στον προσδιορισμό συγκεκριμένων ιδιοτήτων ή δεικτών ποιότητας. Η εν λόγω προσέγγιση έχει αποτελέσει αντικείμενο έρευνας σχετικά με την εφαρμογή της στη μελέτη του οίνου με την παρουσία αρκετών επιστημονικών άρθρων.

Οι *García-Jares* και *Médina* [3] χρησιμοποίησαν φάσματα απορρόφησης υπεριώδους και ορατού (UV-Visible) σε συνδυασμό με τη χημειομετρική τεχνική μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-Regression), επιτυγχάνοντας πρόβλεψη φυσικοχημικών παραμέτρων ερυθρών οίνων όπως την ολική τους οξύτητα, την πτητική τους οξύτητα, το pH, τη συγκέντρωση σε SO₂, τη συγκέντρωση σε Ταννίνες και τη συγκέντρωση σε Ανθοκυάνες. Οι *Cozzolino et al, 2004* [4] χρησιμοποίησαν φάσματα απορρόφησης (NIR) ερυθρού οίνου σε συνδυασμό με τη χημειομετρική τεχνική μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-Regression) για την πρόβλεψη της

συγκέντρωσης της κυρίαρχης μονομερούς ανθοκυάνης του οίνου (μονογλυκοζίτης-3 της μαλβιδίνης, MG3), πολυμερών χρωστικών τους μορφών και ταννινών. Σαν μέθοδος αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Βάσει των στατιστικών δεικτών r^2 και RPD, η πρόβλεψη θεωρήθηκε επιτυχημένη καθιστώντας την όλη διαδικασία ως μία γρήγορη και εναλλακτική μέθοδο στον προσδιορισμό της συγκέντρωσης φαινολικών συστατικών σε ερυθρούς οίνους. Σε άλλη επιστημονική εργασία (Cozzolino *et al*, 2005) [5], παρουσιάζεται η ικανοποιητική συσχέτιση των φασματοσκοπικών δεδομένων ορατού και εγγύς υπερύθρου (VIS-NIR) από δείγματα λευκών ποικιλιών οίνου (Chardonnay και Riesling) με κάποια από τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά (άρωμα λεμονιού, αίσθηση γλυκού κ.ά.).

Στο παρόν κεφάλαιο της διδακτορικής διατριβής παρουσιάζεται μία σειρά συστηματικών μελετών που αποβλέπουν στη συσχέτιση φασματοσκοπικών δεδομένων (ειδικότερα, φάσματα απορρόφησης υπεριώδους και ορατού από δείγματα οίνου) με δεδομένα από άλλες αναλυτικές τεχνικές και διαδικασίες. Με σκοπό την πλήρη καταγραφή και αποτίμηση των συσχετίσεων στους μελετώμενους Κρητικούς οίνους, επιλέχθηκαν διάφοροι συνδυασμοί δειγμάτων. Μετρήθηκαν δείγματα προερχόμενα από δύο διαφορετικές σοδειές (2012 και 2013) και τέσσερις διαφορετικές ποικιλίες (Δαφνί, Βηλάνα, Κοτσιφάλι, Μαντηλάρι). Η διαδικασία της συσχέτισης υλοποιείται με τη δημιουργία μοντέλων πρόβλεψης που βασίζονται στη χρήση της τεχνικής των μερικών ελαχίστων τετραγώνων. Τα μαθηματικά μοντέλα χρησιμοποιούν ανεξάρτητες μεταβλητές (φασματοσκοπικά δεδομένα) στοχεύοντας στην πρόβλεψη εξαρτημένων μεταβλητών (μετρούμενη ιδιότητα), οι οποίες εξάγονται από μία προεπιλεγμένη μέθοδο αναφοράς.

Ακολουθούν συσχετίσεις με κλασσικές μεθόδους όπως η **μέθοδος Folin-Ciocalteu** μέσω της οποίας μετράται το συνολικό φαινολικό δυναμικό ενός οίνου, η τροποποιημένη **μέθοδος Somers** μέσω της οποίας μετράται το συνολικό ανθοκυανικό δυναμικό ενός οίνου και η προτεινόμενη **μέθοδος των Ribéreau-Gayon & Stonestreet** (1965) για τη μέτρηση της συγκέντρωσης των ταννινών. Συσχετίσεις επίσης πραγματοποιήθηκαν, με τις συγκεντρώσεις των φαινολικών ουσιών **Καφταρικό οξύ** και **Τυροσόλη**, όπως αυτές προέκυψαν από τη μέτρηση των δειγμάτων οίνου με τη **Φασματοσκοπία NMR**. Οι συσχετίσεις ολοκληρώνονται με τη σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων με γευστικά χαρακτηριστικά

(αίσθηση του **στυφού** και **πικρού**) με βάση την **Οργανοληπτική αξιολόγηση** των δειγμάτων οίνου. Στην τελευταία ενότητα αυτού του κεφαλαίου σαν ανεξάρτητες μεταβλητές χρησιμοποιούνται φασματοσκοπικά δεδομένα και σαν εξαρτημένες μεταβλητές το **ποσοστό μίξης δύο ερυθρών ποικιλιών** (Κοτσιφάλι και Μαντηλάρι) με στόχο τη δημιουργία ενός μαθηματικού μοντέλου το οποίο θα είναι ικανό να προβλέψει αυτό το ποσοστό μίξης.

Με σκοπό την πιστοποίηση των μοντέλων πρόβλεψης απαραίτητη διαδικασία θεωρείται η εσωτερική τους αξιολόγηση. Για την εσωτερική αξιολόγηση επιλέγεται η τεχνική του διασταυρωτικού ελέγχου (Cross Validation). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα προ της εισαγωγής τους στο εκάστοτε μοντέλο υπόκεινται σε προ-επεξεργασία. Τονίζεται ότι η μη προ-επεξεργασία ή ο τρόπος προ-επεξεργασίας των δεδομένων (εφόσον αυτή πραγματοποιηθεί) σε συνδυασμό με την επιλογή του αριθμού των λανθανουσών μεταβλητών και του τρόπου εσωτερικής αξιολόγησης είναι καθοριστικοί παράγοντες στην προβλεπτική ικανότητα του εκάστοτε μοντέλου. Συνήθεις στατιστικοί δείκτες ελέγχου της προβλεπτικής ικανότητας κάποιου μαθηματικού μοντέλου είναι ο συντελεστής συσχέτισης r^2 , το σφάλμα πρόβλεψης μετά την εσωτερική του αξιολόγηση (SECV) και η υπολειμματική προβλεπτική απόκλιση (RPD), οι οποίοι περιγράφονται στο **Κεφάλαιο 4.3**, βάσει αυτών γίνεται η αξιολόγηση των μαθηματικών μοντέλων. Η συνολική αξιολόγηση ενός μαθηματικού μοντέλου θα πρέπει να συνεκτιμήσει και άλλα στοιχεία, όπως τον αρχικό πειραματικό σχεδιασμό ο οποίος σχετίζεται με την επιλογή της μεθόδου αναφοράς και την ομοιογένεια ή την ανομοιογένεια της επιλεγείσας ομάδας δειγμάτων, τη διακύμανση των δειγμάτων στη μετρούμενη ιδιότητα και την πραγματική φυσικοχημική σχέση μεταξύ εξαρτημένων και ανεξάρτητων μεταβλητών.

10.1 Συσχέτιση Φασματοσκοπίας Απορρόφησης Υπεριώδους με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

Στην παρούσα ενότητα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μελέτης μας σχετικά με την ικανότητα της φασματοσκοπίας απορρόφησης υπεριώδους 240-400 nm όσον αφορά στην πρόβλεψη της φαινολικής σύστασης του οίνου. Ως μέθοδος αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Folin-Ciocalteu η οποία παρέχει δεδομένα για τη συνολική σύσταση φαινολικών παραγόντων στον οίνο. Η μέθοδος βασίζεται στην οξείδωση των φαινολικών παραγόντων από το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu που

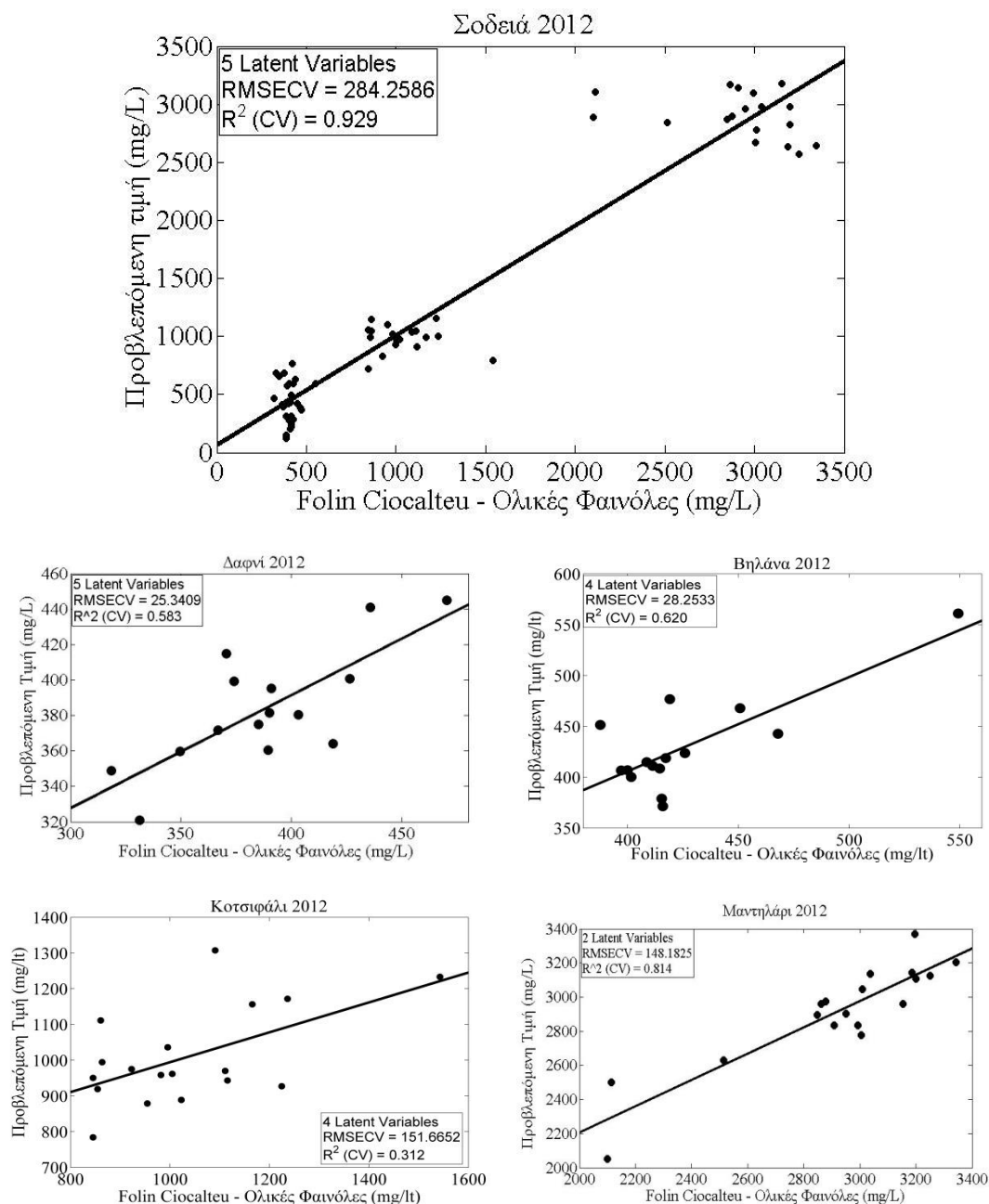
είναι ένα μίγμα φωσφό-μολυβδαινικού ($H_3PMo_{12}O_{40}$) και φωσφό-βολφραμικού οξέος ($H_3PW_{12}O_{40}$) [6]. Στη συνέχεια μετράται η τιμή της απορρόφησης στα 750 nm η οποία είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση του συνόλου των φαινολικών ενώσεων και συχνά εκφράζεται ως ισοδύναμα γαλλικού οξέος. Η εφαρμογή της μεθόδου Folin-Ciocalteu στους οίνους που μελετήθηκαν πραγματοποιήθηκε από την επιστημονική ομάδα του ΤΕΙ Κρήτης στο πλαίσιο του ερευνητικού έργου Θαλής «Παλαιός Οίνος» [7]. Η απορρόφηση του οίνου στο υπεριώδες τμήμα του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος όπως ήδη έχει αναφερθεί στο **Κεφάλαιο 3** συνδέεται άμεσα με το φαινολικό του δυναμικό και ως εκ τούτου αναμένεται ισχυρή συσχέτιση των φασματικών χαρακτηριστικών του οίνου στο υπεριώδες με τη φαινολική του σύσταση. Στον **Πίνακα 10.1** αναφέρονται τα χαρακτηριστικά της κάθε ομάδας δειγμάτων (σοδειά, ποικιλία και αριθμός δειγμάτων), η μέση τιμή της φαινολικής σύστασης και η τυπική της απόκλιση, οι στατιστικοί δείκτες οι οποίοι προκύπτουν από την εφαρμογή της τεχνικής των μερικών ελαχίστων τετραγώνων και η αποτίμηση της επιτυχίας του κάθε μοντέλου πρόβλεψης.

Πίνακας 10.1. Στατιστικοί δείκτες από τη συσχέτιση της φασματοσκοπίας απορρόφησης υπεριώδους 240-400 nm με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu στην εκτίμηση της φαινολικής σύστασης (mg/L)

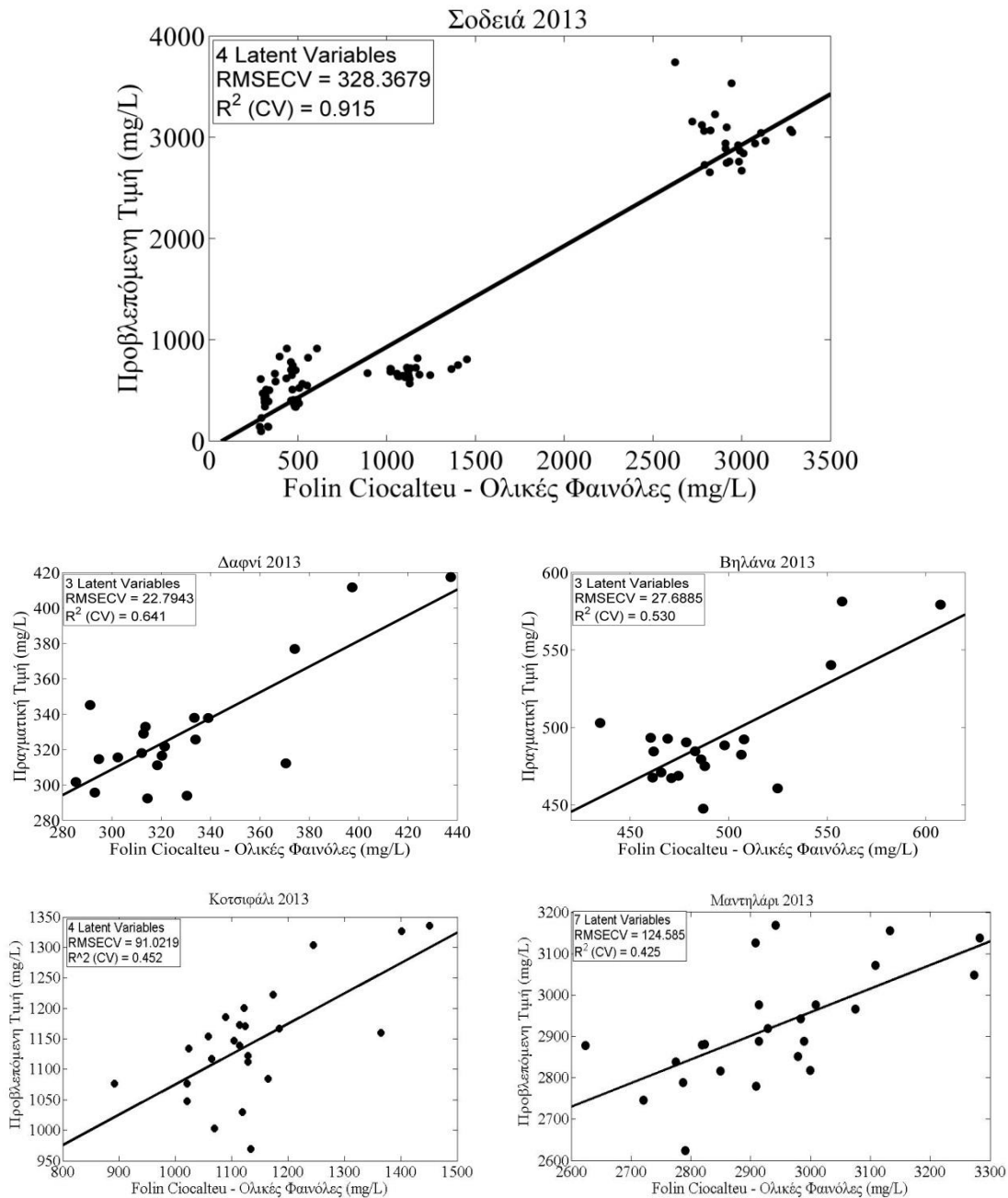
Σοδειά	Ποικιλία	N	Mean	SD	r^2	SECV	RPD	Αποτίμηση
2012	Όλες	66	1263.4	1066	0.93	284.3	3.75	Εξαιρετικό
2012	Δαφνί	15	388	38.5	0.58	18.3	2.10	Αξιόπιστο
2012	Βηλόνα	15	425.5	38.4	0.62	28.2	1.36	Ενδεικτικό
2012	Κοτσιφάλι	18	1035.5	175.6	0.31	151.6	1.16	Ενδεικτικό
2012	Μαντηλάρι	18	2919.1	341.6	0.81	148.1	2.31	Αξιόπιστο
2013	Όλες	88	1299	1054.9	0.91	328.3	3.21	Εξαιρετικό
2013	Δαφνί	20	329.8	37.4	0.64	22.7	1.64	Αξιόπιστο
2013	Βηλόνα	20	493.7	39.5	0.53	27.6	1.43	Αξιόπιστο
2013	Κοτσιφάλι	24	1137.9	122.1	0.45	91	1.34	Ενδεικτικό
2013	Μαντηλάρι	24	2939	156.4	0.42	124.5	1.26	Ενδεικτικό

N: Αριθμός Δειγμάτων, Mean: Μέση Τιμή περιεκτικότητας οίνου σε φαινόλες (mg/L), SD: Τυπική Απόκλιση (mg/L), r^2 : Συντελεστής συσχέτισης, SECV: Σφάλμα Πρόβλεψης (mg/L), RPD = SD/SECV: Υπολειμματική Προβλεπτική Απόκλιση

Στην **Εικόνα 10.1** και στην **Εικόνα 10.2** απεικονίζονται οι προβλεπτικές ικανότητες των μοντέλων πρόβλεψης τόσο για τα δείγματα της σοδειάς του 2012 όσο και για τα δείγματα της σοδειάς του 2013 (όλες οι ποικιλίες συγκεντρωτικά αλλά και κάθε ποικιλία μεμονωμένα).



Εικόνα 10.1. Σύγκριση της προβλεπόμενης τιμής η οποία προκύπτει από τη φασματοσκοπία απορρόφησης υπεριώδους 240-400 nm για τη φαινολική σύσταση (mg/L) δειγμάτων οίνου της σοδειάς του 2012 με την αντίστοιχη τιμή από τη μέθοδο Folin-Ciocalteu (μέθοδος αναφοράς)



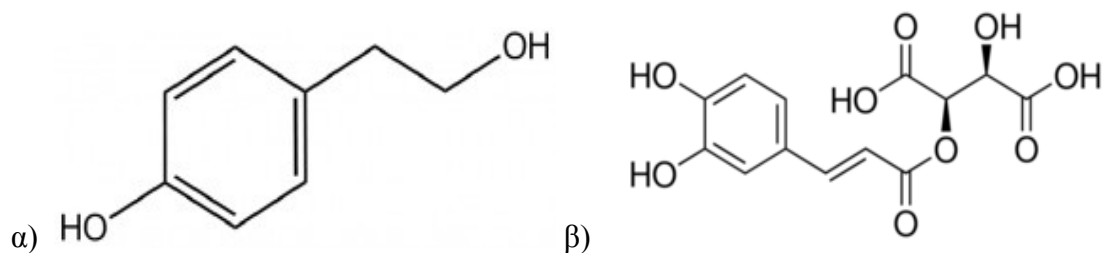
Εικόνα 10.2. Σύγκριση της προβλεπόμενης τιμής η οποία προκύπτει από τη φασματοσκοπία απορρόφησης υπεριώδους 240-400 nm για τη φαινολική σύσταση (mg/L) δειγμάτων οίνου της σοδειάς του 2013, με την αντίστοιχη τιμή από τη μέθοδο Folin-Ciocalteu (μέθοδος αναφοράς)

Στην πρόβλεψη της φαινολικής σύστασης χρησιμοποιείται ως βασικό κριτήριο ο συντελεστής συσχέτισης και η τιμή RPD. Στις περιπτώσεις δειγμάτων από όλες τις ποικιλίες (σοδειά 2012 και 2013) διακρίνονται εξαιρετικά μοντέλα, θα πρέπει όμως να σημειωθεί ότι το ευρύ φάσμα μελέτης αυτών των περιπτώσεων ενισχύει το

συντελεστή συσχέτισης μεταξύ εξαρτημένων και ανεξάρτητων μεταβλητών και αντίστοιχα την προβλεπτική ικανότητα των μαθηματικών μοντέλων. Στη μεμονωμένη εξέταση της κάθε ποικιλίας στις οποίες το εύρος μελέτης περιορίζεται, τα μοντέλα χαρακτηρίζονται ως αξιόπιστα ή μόνο ενδεικτικά. Στην αξιολόγηση της επιτυχίας της συσχέτισης και της προβλεπτικής ικανότητας θα πρέπει να ληφθεί υπόψη το γεγονός ότι ένα σημαντικό ποσοστό της απορρόφησης του οίνου στο υπεριώδες οφείλεται και σε άλλες μη φαινολικές ενώσεις (πολυσακχαρίτες και πρωτεΐνες) και αυτό αποτελεί ένα στοιχείο που εισάγει αβεβαιότητα στη συσχέτιση [8].

10.2 Συσχέτιση Φασματοσκοπίας Απορρόφησης Υπεριώδους με τη Φασματοσκοπική Τεχνική NMR

Στην ενότητα 10.2 γίνεται παρουσίαση των αποτελεσμάτων της μελέτης μας όσον αφορά στην ικανότητα της φασματοσκοπίας απορρόφησης υπεριώδους 240-400 nm στην πρόβλεψη της συγκέντρωσης συγκεκριμένων φαινολικών ενώσεων οι οποίες εμπεριέχονται στον οίνο. Ως μέθοδος αναφοράς, χρησιμοποιήθηκε η Φασματοσκοπία NMR [9]. Η εφαρμογή της μεθόδου πραγματοποιήθηκε από την επιστημονική ομάδα του πανεπιστημίου Κρήτης στο πλαίσιο του ερευνητικού έργου Θαλής «Παλαιός Οίνος». Από μία πλειάδα χημικών ενώσεων (η συγκέντρωση των οποίων προσδιορίστηκε με τη φασματοσκοπία NMR) επιλέχθηκαν η **Τυροσόλη** και το **Καφταρικό Οξύ** (Εικόνα 10.3) [10].



Εικόνα 10.3. Δομή χημικών ενώσεων α) Τυροσόλη β) Καφταρικό Οξύ

Τυροσόλη

Η Τυροσόλη παρουσιάζει σχετικά υψηλό συντελεστή απορρόφησης στην περιοχή του υπεριώδους ($2200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ στα 280 nm τιμή η οποία προκύπτει βάσει δικών μας πειραματικών δεδομένων, βλέπε παράρτημα Εικόνα 10.17α). Η συγκέντρωση της Τυροσόλης στον οίνο κυμαίνεται σε ένα εύρος από 5-40 mg/L. Στον Πίνακα 10.2 περιγράφονται τα χαρακτηριστικά της κάθε ομάδας δειγμάτων

(σοδειά, ποικιλία και αριθμός δειγμάτων), η μέση τιμή συγκέντρωσης της, η τυπική της απόκλιση, οι στατιστικοί δείκτες οι οποίοι προκύπτουν από την εφαρμογή της τεχνικής των μερικών ελαχίστων τετραγώνων και η αποτίμηση της επιτυχίας του κάθε μοντέλου πρόβλεψης.

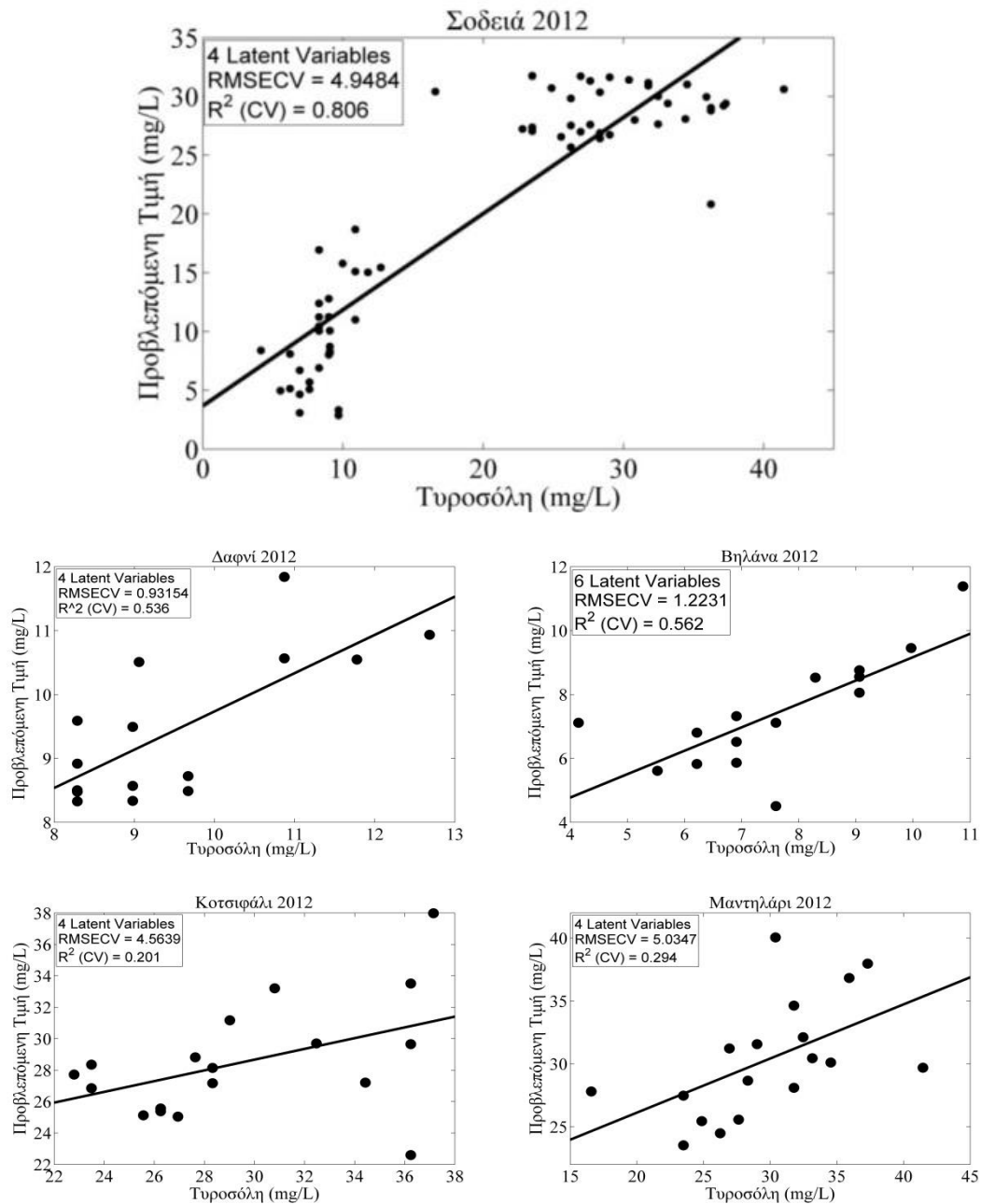
Πίνακας 10.2. Στατιστικοί δείκτες από τη συσχέτιση της φασματοσκοπίας απορρόφησης υπεριώδους 240-400 nm με τη φασματοσκοπική τεχνική NMR στον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της Τυροσόλης (mg/L)

Σοδει	Ποικιλία	N	Mean	SD	r ²	SECV	RPD	Αποτίμηση
2012	Όλες	66	20.07	11.24	0.8	4.84	2.32	Εξαιρετικό
2012	Δαφνί	15	9.53	1.35	0.5	0.93	1.45	Αξιόπιστο
2012	Βηλάνα	15	7.62	1.73	0.5	1.22	1.42	Αξιόπιστο
2012	Κοτσιφάλι	18	29.53	4.69	0.2	4.56	1.03	Ενδεικτικό
2012	Μαντηλάρι	18	29.74	5.70	0,9	5.03	1.13	Ενδεικτικό
2013	Όλες	88	23.61	8.06	0.8	2.72	2.95	Εξαιρετικό
2013	Δαφνί	20	14.47	1.16	0.5	0.78	1.48	Αξιόπιστο
2013	Βηλάνα	20	21.12	1.52	0.1	1.73	0.88	Ενδεικτικό
2013	Κοτσιφάλι	24	21.62	1.55	0.4	1.19	1.30	Ενδεικτικό
2013	Μαντηλάρι	24	35.32	4.10	0.1	4.33	0.95	Ανεπαρκές

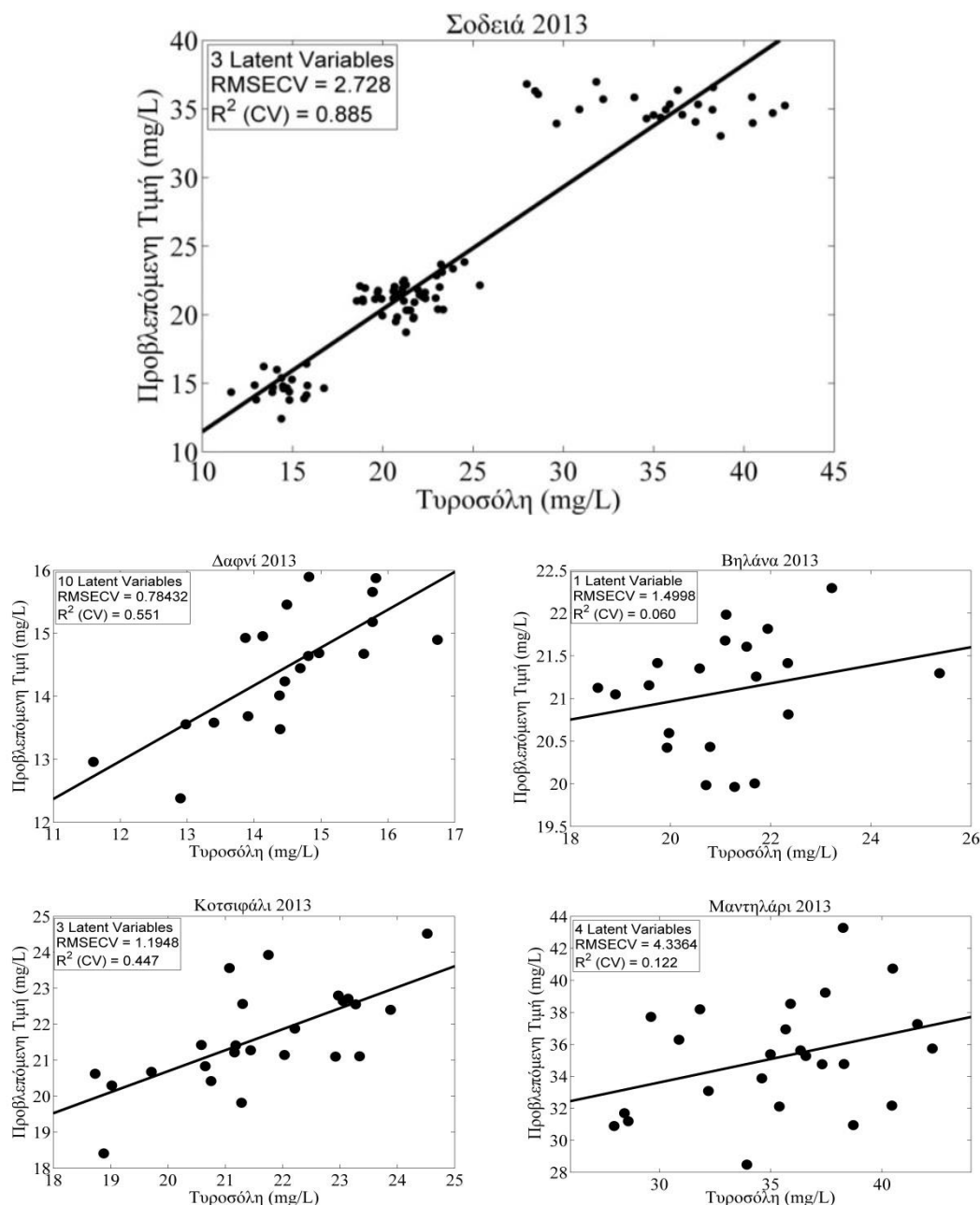
N: Αριθμός Δειγμάτων, Mean: Μέση Τιμή της συγκέντρωσης της Τυροσόλης (mg/L), SD: Τυπική Απόκλιση (mg/L), r²: Συντελεστής συσχέτισης, SECV: Σφάλμα Πρόβλεψης (mg/L), RPD: Υπολειμματική Προβλεπτική Απόκλιση

Στην **Εικόνα 10.4** και στην **Εικόνα 10.5** απεικονίζονται οι προβλεπτικές ικανότητες των μοντέλων τόσο για τα δείγματα της σοδειάς του 2012 όσο και για τα δείγματα της σοδειάς του 2013 (όλες οι ποικιλίες μαζί και κάθε ποικιλία μεμονωμένα). Έχοντας ως κριτήριο αξιολόγησης την τιμή RPD, διακρίνουμε εξαιρετικά μοντέλα στις περιπτώσεις όπου τα δείγματα προέρχονται από όλες τις ποικιλίες μαζί, ενδεικτικά και αξιόπιστα μοντέλα έχουμε στις περιπτώσεις όπου η κάθε ποικιλία εξετάζεται μεμονωμένα, ενώ υπάρχει και ένα κακό μοντέλο συσχέτισης για την περίπτωση της ποικιλίας Μαντηλάρι. Στην αξιολόγηση θα πρέπει να ληφθεί υπόψη η χαμηλή συγκέντρωση της Τυροσόλης στον οίνο (5-40 mg/L). Επιπλέον ένα

φάσμα απορρόφησης στο υπεριώδες προκύπτει από τη συνεισφορά πολλών χημικών ενώσεων κάνοντας δύσκολη την πρόβλεψη των επιπέδων συγκέντρωσης για μία μόνο χημική ένωση.



Εικόνα 10.4. Σύγκριση της προβλεπόμενης τιμής η οποία προκύπτει από τη φασματοσκοπία απορρόφησης υπεριώδους 240-400 nm για τη συγκέντρωση της Tyrosol (mg/L) δειγμάτων οίνου της σοδειάς του 2012 με την αντίστοιχη τιμή από τη φασματοσκοπία-NMR (μέθοδος αναφοράς)



Εικόνα 10.5. Σύγκριση της προβλεπόμενης τιμής η οποία προκύπτει από τη φασματοσκοπία απορρόφησης υπεριώδους 240-400 nm για τη συγκέντρωση της Τυροσόλης (mg/L) δειγμάτων οίνου της σοδειάς του 2013 με την αντίστοιχη τιμή από τη φασματοσκοπία-NMR (μέθοδος αναφοράς)

Καφταρικό Οξύ

Το Καφταρικό οξύ χαρακτηρίζεται και αυτό από υψηλό συντελεστή απορρόφησης στην περιοχή του υπεριώδους ($9600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ στα 280 nm, βάσει δικών μας πειραματικών δεδομένων για την απορρόφηση της παρεμφερούς ενώσεως του καφεϊκού οξέος από το οποίο προκύπτει, **βλέπε παράρτημα Εικόνα 10.17β**). Η συγκέντρωση του στον οίνο κυμαίνεται σε ένα εύρος από 20-150 mg/L. Στον Πίνακα

10.3 περιγράφονται τα χαρακτηριστικά της κάθε ομάδας δειγμάτων (σοδειά, ποικιλία και αριθμός δειγμάτων), η μέση τιμή συγκέντρωσης της συγκέντρωσης του όπως προσδιορίστηκε μέσω της φασματοσκοπίας NMR και η τυπική της απόκλιση, οι στατιστικοί δείκτες οι οποίοι προκύπτουν από την εφαρμογή της τεχνικής των μερικών ελαχίστων τετραγώνων και η αποτίμηση της επιτυχίας κάθε μοντέλου πρόβλεψης.

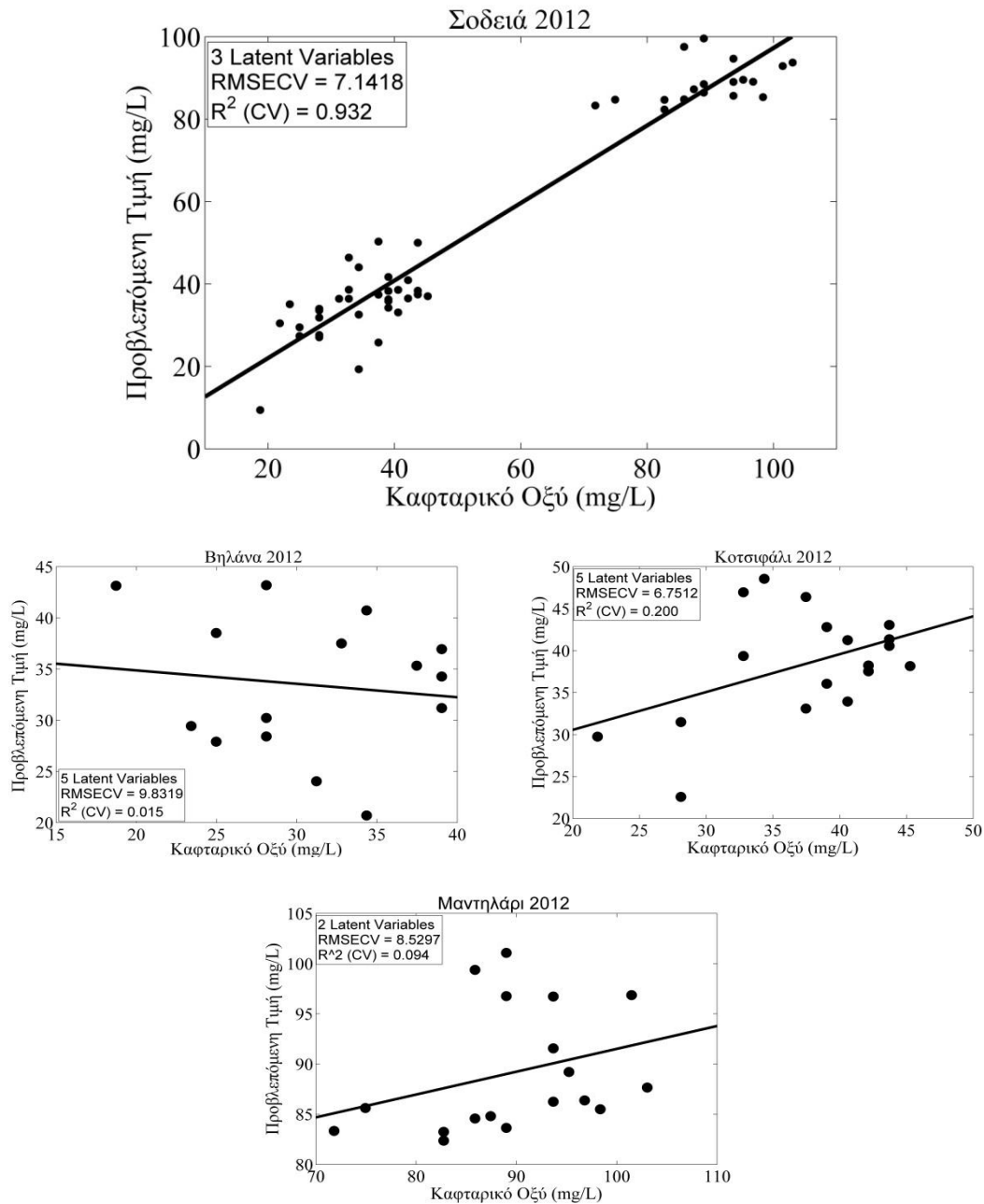
Πίνακας 10.3. Στατιστικοί δείκτες από τη συσχέτιση της φασματοσκοπίας απορρόφησης υπεριώδους 240-400 nm με τη φασματοσκοπική τεχνική NMR στον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του Καφταρικού Οξέος (mg/L)

Σοδει	Ποικιλία	N	Mean	SD	r ²	SECV	RPD	Αποτίμηση
2012	Όλες	66	53.94	27.42	0.9	7.14	3.84	Εξαιρετικό
2012	Βηλάνα	15	30.91	6.14	0,0	9.83	0.62	Ανεπαρκές
2012	Κοτσιφάλι	18	37.38	6.32	0,2	6.75	0.94	Ανεπαρκές
2012	Μαντηλάρι	18	89.68	8.13	0,0	8,52	0.95	Ανεπαρκές
2013	Όλες	88	73.77	46.04	0.9	10.23	4.50	Εξαιρετικό
2013	Δαφνί	20	9.51	3.84	0.8	1.33	2.89	Εξαιρετικό
2013	Βηλάνα	20	88.08	11.40	0.4	8.46	1.35	Ενδεικτικό
2013	Κοτσιφάλι	24	55.25	2.14	0,0	2.32	0.92	Ανεπαρκές
2013	Μαντηλάρι	24	133.91	8.76	0.2	11.27	0.78	Ανεπαρκές

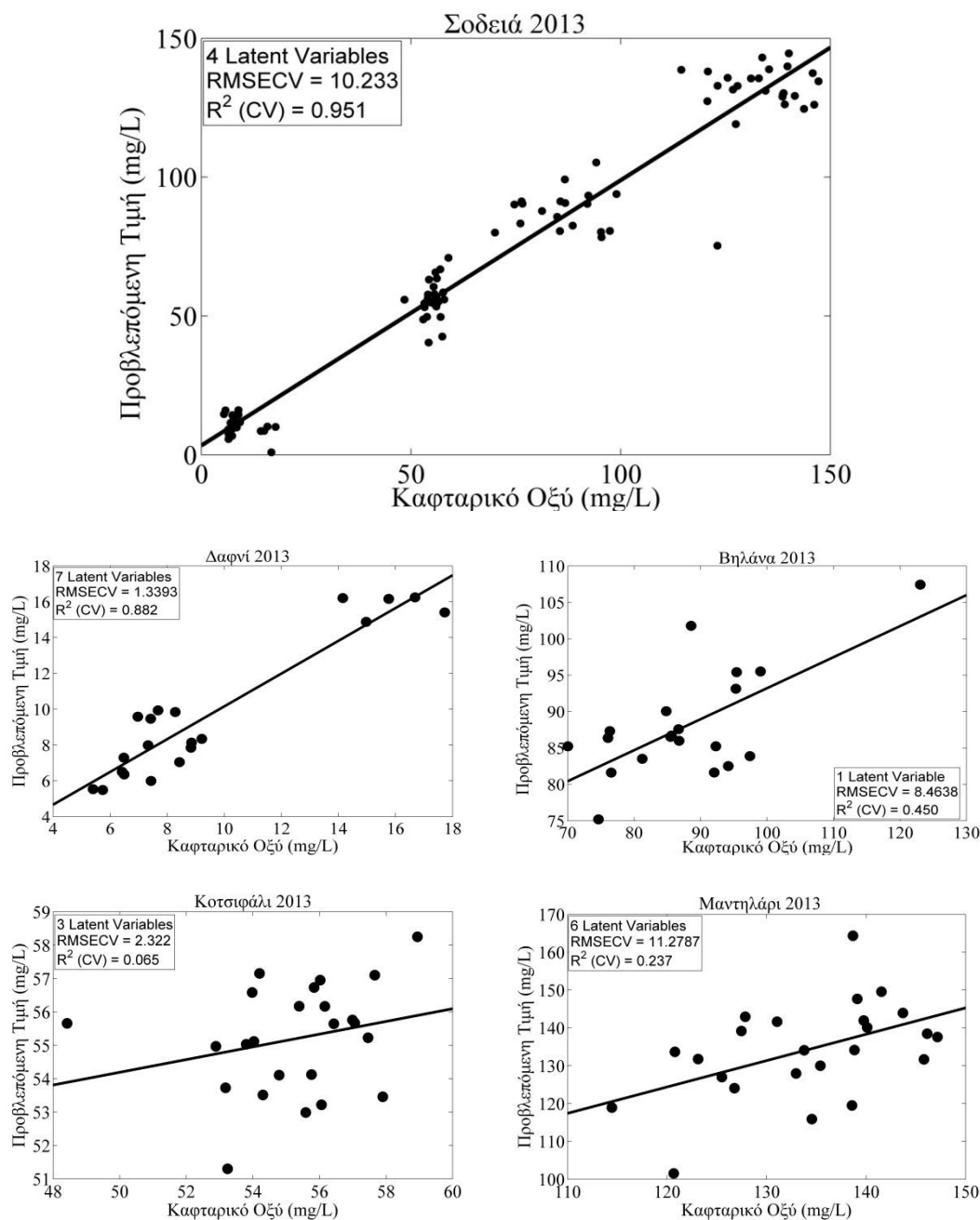
N: Αριθμός Δειγμάτων, Mean: Μέση Τιμή συγκέντρωσης Καφταρικού οξέος (mg/L), SD: Τυπική Απόκλιση (mg/L), r²: Συντελεστής συσχέτισης, SECV: Σφάλμα Πρόβλεψης (mg/L), RPD: Υπολειμματική Προβλεπτική Απόκλιση

Στην **Εικόνα 10.6** και στην **Εικόνα 10.7** απεικονίζονται οι προβλεπτικές ικανότητες των μοντέλων τόσο για τα δείγματα της σοδειάς του 2012 όσο και για τα δείγματα της σοδειάς του 2013 (όλες οι ποικιλίες μαζί και κάθε ποικιλία μεμονωμένα). Έχοντας ως κριτήριο αξιολόγησης την τιμή RPD, εξαιρετικά μοντέλα έχουμε στις περιπτώσεις στις οποίες τα δείγματα προέρχονται από όλες τις ποικιλίες μαζί, αλλά και στην περίπτωση της ποικιλίας Δαφνί της σοδειάς 2013. Για την περίπτωση της ποικιλίας Βηλάνα σοδειά 2013 έχουμε ένα αξιόπιστο μοντέλο, ενώ στη μεμονωμένη εξέταση των άλλων ποικιλιών τα μοντέλα είναι ανεπαρκή. Στην

αξιολόγηση όμως των μοντέλων θα πρέπει να ληφθεί υπόψη η χαμηλή συγκέντρωση του Καφταρικού οξέος στον οίνο. Όπως προαναφέρθηκε στην περίπτωση της Τυροσόλης, ένα φάσμα απορρόφησης στο υπεριώδες προκύπτει από την συνεισφορά πολλών χημικών ενώσεων κάνοντας έτσι δύσκολη τη συσχέτιση με μία μόνο από αυτές.



Εικόνα 10.6. Σύγκριση της προβλεπόμενης τιμής η οποία προκύπτει από τη φασματοσκοπία απορρόφησης υπεριώδους 240-400 nm για τη συγκέντρωση του Καφταρικού οξέος (mg/L) δειγμάτων οίνου της σοδειάς του 2012 με την αντίστοιχη τιμή από τη φασματοσκοπία-NMR (μέθοδος αναφοράς)



Εικόνα 10.7. Σύγκριση της προβλεπόμενης τιμής η οποία προκύπτει από τη φασματοσκοπία απορρόφησης υπεριώδους 240-400 nm για τη συγκέντρωση του Καφταρικού οξέος (mg/L) δειγμάτων οίνου της σοδειάς του 2013 με την αντίστοιχη τιμή από τη φασματοσκοπία-NMR (μέθοδος αναφοράς)

10.3 Συσχέτιση Φασματοσκοπίας Απορρόφησης Υπεριώδους με Οργανοληπτικά Χαρακτηριστικά του οίνου

Στην παρούσα ενότητα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μελέτης μας όσον αφορά στην ικανότητα της φασματοσκοπίας απορρόφησης υπεριώδους 240-400 nm στην πρόβλεψη οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του οίνου. Ως μέθοδος

αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η βαθμολογία σε γευσιγνωστικές δοκιμές από πάνελ εμπειρών γευσιγνωστών [11], οι οποίες πραγματοποιήθηκαν στο πλαίσιο του ερευνητικού έργου Θαλής «Παλιός Οίνος». Από τα διάφορα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τα οποία μελετήθηκαν επιλέχθηκε να γίνει συσχέτιση με την **αίσθηση στυφού** και την **αίσθηση πικρού**, οι οποίες μετρήθηκαν σε βαθμολογική κλίμακα από 0-10. Αυτά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά φαίνεται να συνδέονται άμεσα με την παρουσία φαινολικών ενώσεων στον οίνο [12], επομένως μία τέτοιου είδους συσχέτιση φαίνεται απόλυτα λογική.

Αίσθηση Στυφού

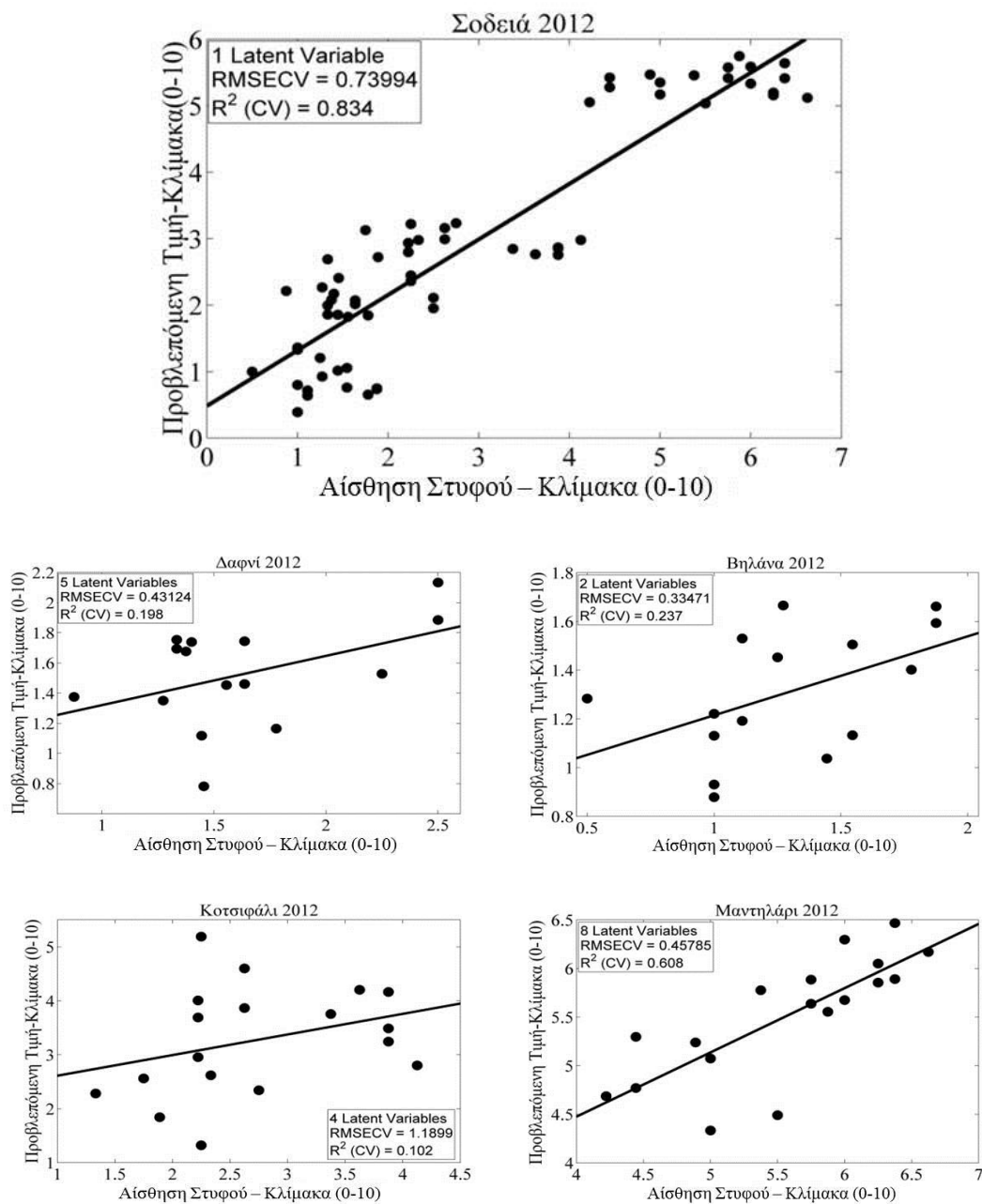
Η αίσθηση του στυφού θεωρείται ένα από τα κύρια οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου και το οποίο συνδέεται με τις ταννίνες και άλλες φαινολικές ενώσεις, οι οποίες απορροφούν στο υπεριώδες. Στον **Πίνακα 10.4** περιγράφονται οι στατιστικοί δείκτες από τη συσχέτιση της φασματοσκοπίας απορρόφησης με τη βαθμολογία από πάνελ εμπειρών γευσιγνωστών.

Πίνακας 10.4. Στατιστικοί δείκτες από τη συσχέτιση της φασματοσκοπίας απορρόφησης υπεριώδους 240-400nm με τη βαθμολογία από πάνελ εμπειρών γευσιγνωστών στον προσδιορισμό της αίσθησης του στυφού

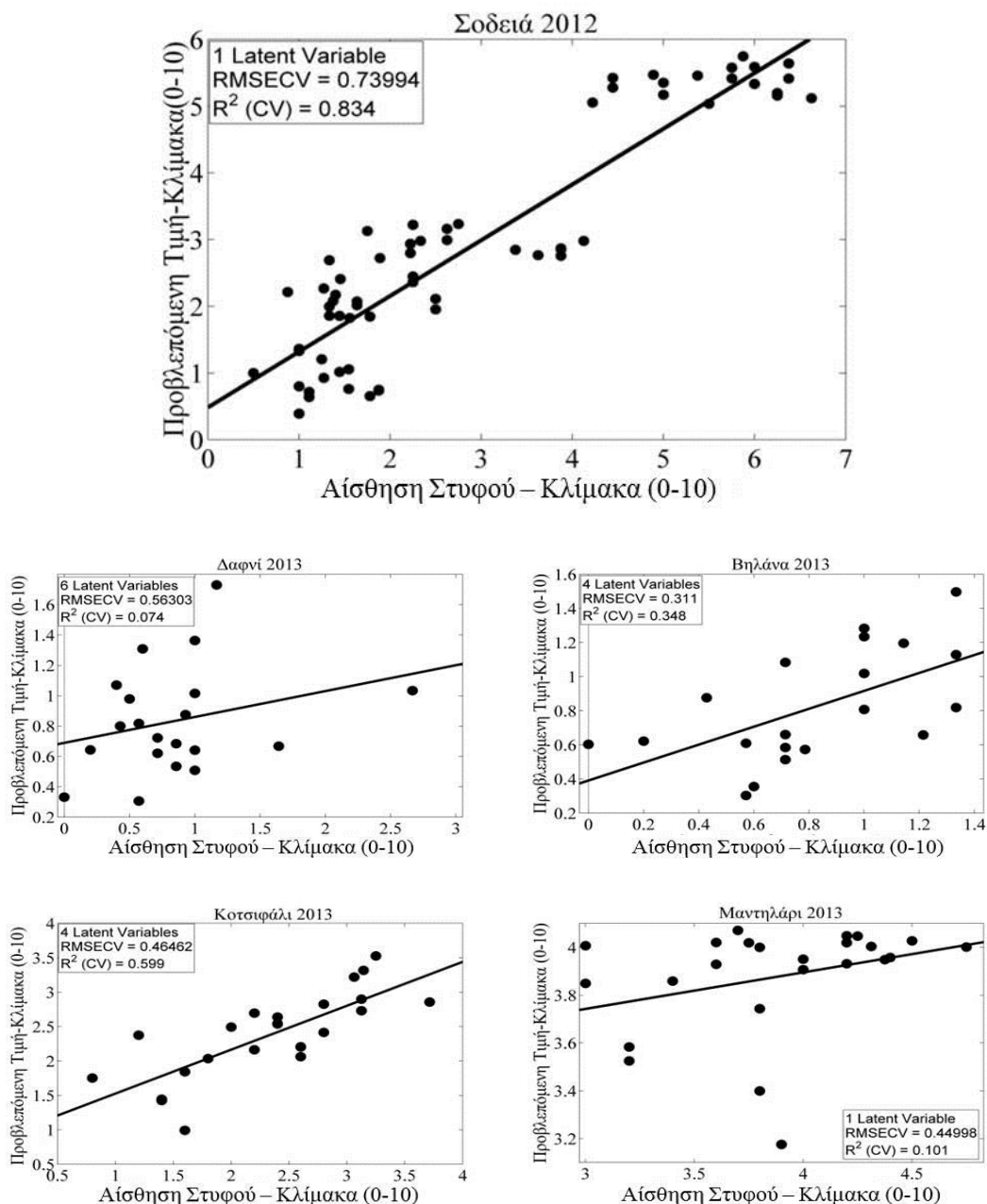
Σοδει	Ποικιλία	N	Mean	SD	r ²	SECV	RPD	Αποτίμηση
2012	Όλες	66	2.92	1.82	0.8	0.739	2.46	Εξαιρετικό
2012	Δαφνί	15	1.62	0.45	0.1	0.431	1.03	Ενδεικτικό
2012	Βηλάνα	15	1.29	0.37	0.2	0.334	1.12	Ενδεικτικό
2012	Κοτσιφάλι	18	2.73	0.82	0.1	1.189	0.69	Ανεπαρκές
2012	Μαντηλάρι	18	5.56	0.72	0.6	0.457	1.58	Αξιόπιστο
2013	Όλες	88	2.07	1.38	0.8	0.517	2.67	Εξαιρετικό
2013	Δαφνί	20	0.84	0.55	0.0	0.563	0.57	Ανεπαρκές
2013	Βηλάνα	20	0.82	0.36	0.3	0.311	1.16	Ενδεικτικό
2013	Κοτσιφάλι	24	2.34	0.73	0.5	0.464	1.57	Αξιόπιστο
2013	Μαντηλάρι	24	3.87	0.47	0.1	0.449	1.04	Ενδεικτικό

N: Αριθμός Δειγμάτων, Mean: Μέση Τιμή βαθμολογίας (αίσθηση στυφού) SD: Τυπική Απόκλιση, r²: Συντελεστής συσχέτισης, SECV: Σφάλμα Πρόβλεψης, RPD: Υπολειμματική Προβλεπτική Απόκλιση

Στην **Εικόνα 10.8** και στην **Εικόνα 10.9** φαίνονται οι προβλεπτικές ικανότητες των μοντέλων τόσο για τα δείγματα της σοδειάς του 2012 όσο και για τα δείγματα της σοδειάς του 2013 (όλες οι ποικιλίες μαζί και κάθε ποικιλία μεμονωμένα).



Εικόνα 10.8. Σύγκριση της προβλεπόμενης τιμής η οποία προκύπτει από τη φασματοσκοπία απορρόφησης υπεριώδους 240-400 nm για την αίσθηση στυφού δειγμάτων οίνου της σοδειάς του 2012 με την αντίστοιχη τιμή από πάνελ έμπειρων γευσιγνωστών (μέθοδος αναφοράς)



Εικόνα 10.9. Σύγκριση της προβλεπόμενης τιμής η οποία προκύπτει από τη φασματοσκοπία απορρόφησης υπεριώδους 240-400 nm για την αίσθηση στυφού δειγμάτων οίνου της σοδειάς του 2013 με την αντίστοιχη τιμή από πάνελ έμπειρων γευσιγνωστών (μέθοδος αναφοράς)

Με κριτήριο την τιμή RPD, εξαιρετικά μοντέλα έχουμε στις περιπτώσεις όπου τα δείγματα προέρχονται από όλες τις ποικιλίες μαζί αλλά και στην περίπτωση της ποικιλίας Μαντηλάρι της σοδειάς 2013. Για την περίπτωση της ποικιλίας Κοτσιφάλι σοδειά 2013 έχουμε ένα αξιόπιστο μοντέλο, ενώ στη μεμονωμένη εξέταση των άλλων ποικιλιών τα μοντέλα είναι απλά ενδεικτικά και ανεπαρκή.

Αίσθηση Πικρού

Όπως η αίσθηση του στυφού έτσι και η αίσθηση του πικρού ανήκει στην κατηγορία των πιο σημαντικών οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του οίνου, η οποία συνδέεται με τις φαινολικές ενώσεις οι οποίες απορροφούν στο υπεριώδες. Αντίστοιχα με τις προηγούμενες συσχετίσεις ο **Πίνακας 10.5** περιγράφει τα χαρακτηριστικά της κάθε ομάδας δειγμάτων, τη μέση τιμή στη βαθμολογία και τη τυπική απόκλιση, τους στατιστικούς δείκτες και την αποτίμηση της επιτυχίας του κάθε μοντέλου πρόβλεψης.

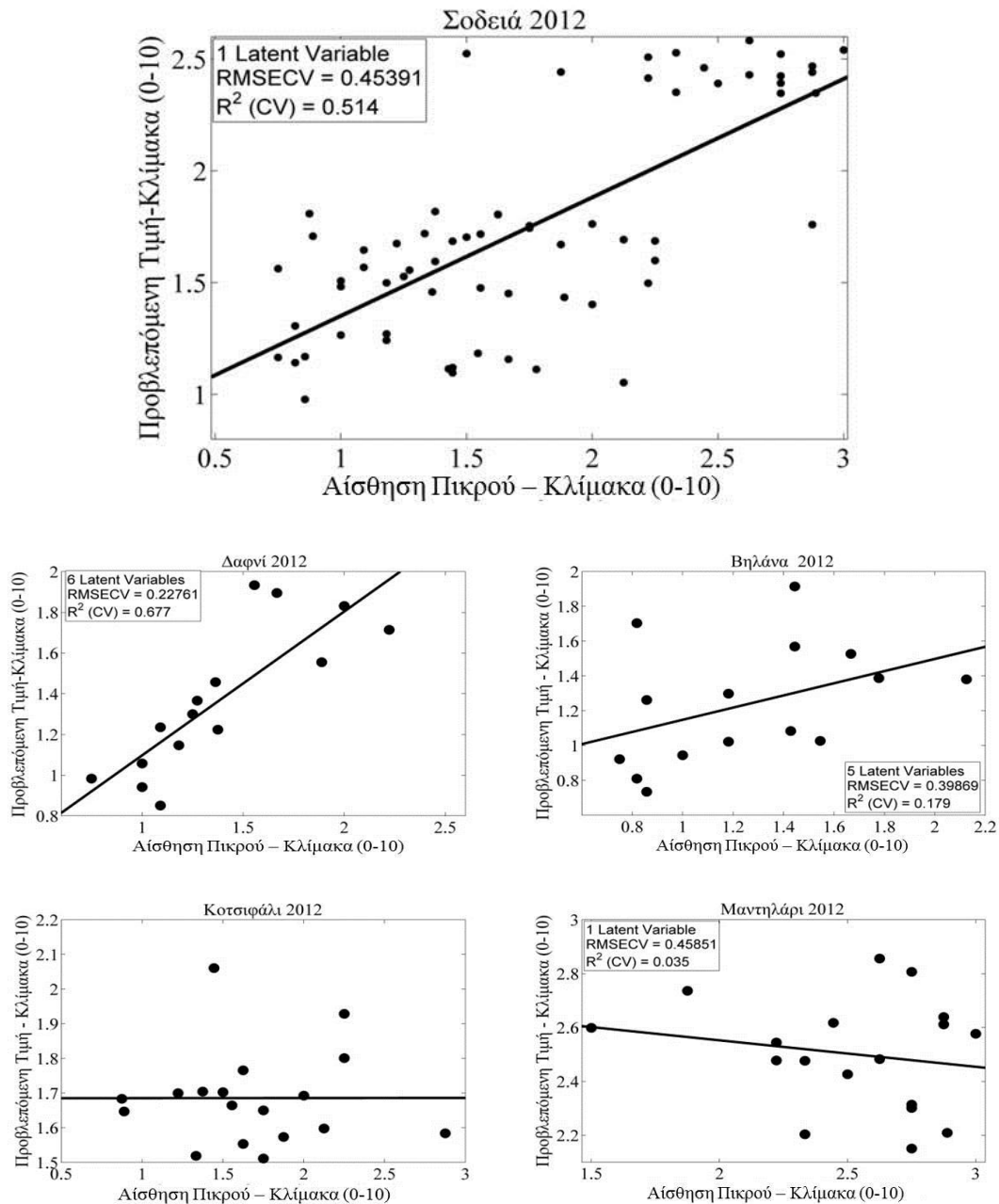
Πίνακας 10.5. Στατιστικοί δείκτες από τη συσχέτιση της φασματοσκοπίας απορρόφησης υπεριώδους 240-400 nm με τη βαθμολογία έμπειρων γευσιγνωστών στον προσδιορισμό της αίσθησης Πικρού

Σοδει	Ποικιλία	N	Mean	SD	r ²	SECV	RPD	Αποτίμηση
2012	Όλες	66	1.75	0.65	0.5	0.453	1.44	Αξιόπιστο
2012	Δαφνί	15	1.38	0.40	0.6	0.227	1.76	Αξιόπιστο
2012	Βηλόνα	15	1.26	0.40	0.1	0.398	1.01	Ενδεικτικό
2012	Κοτσιφάλι	18	1.68	0.48	0.0	0.504	0.95	Ανεπαρκές
2012	Μαντηλάρι	18	2.52	0.38	0.0	0.458	0.83	Ανεπαρκές
2013	Όλες	88	1.20	0.83	0.5	0.531	1.56	Αξιόπιστο
2013	Δαφνί	20	0.63	0.35	0.2	0.382	0.92	Ανεπαρκές
2013	Βηλόνα	20	0.68	0.35	0.2	0.344	1.02	Ενδεικτικό
2013	Κοτσιφάλι	24	1.22	0.59	0.2	0.528	1.12	Ενδεικτικό
2013	Μαντηλάρι	24	2.09	0.81	0.4	0.646	1.25	Ενδεικτικό

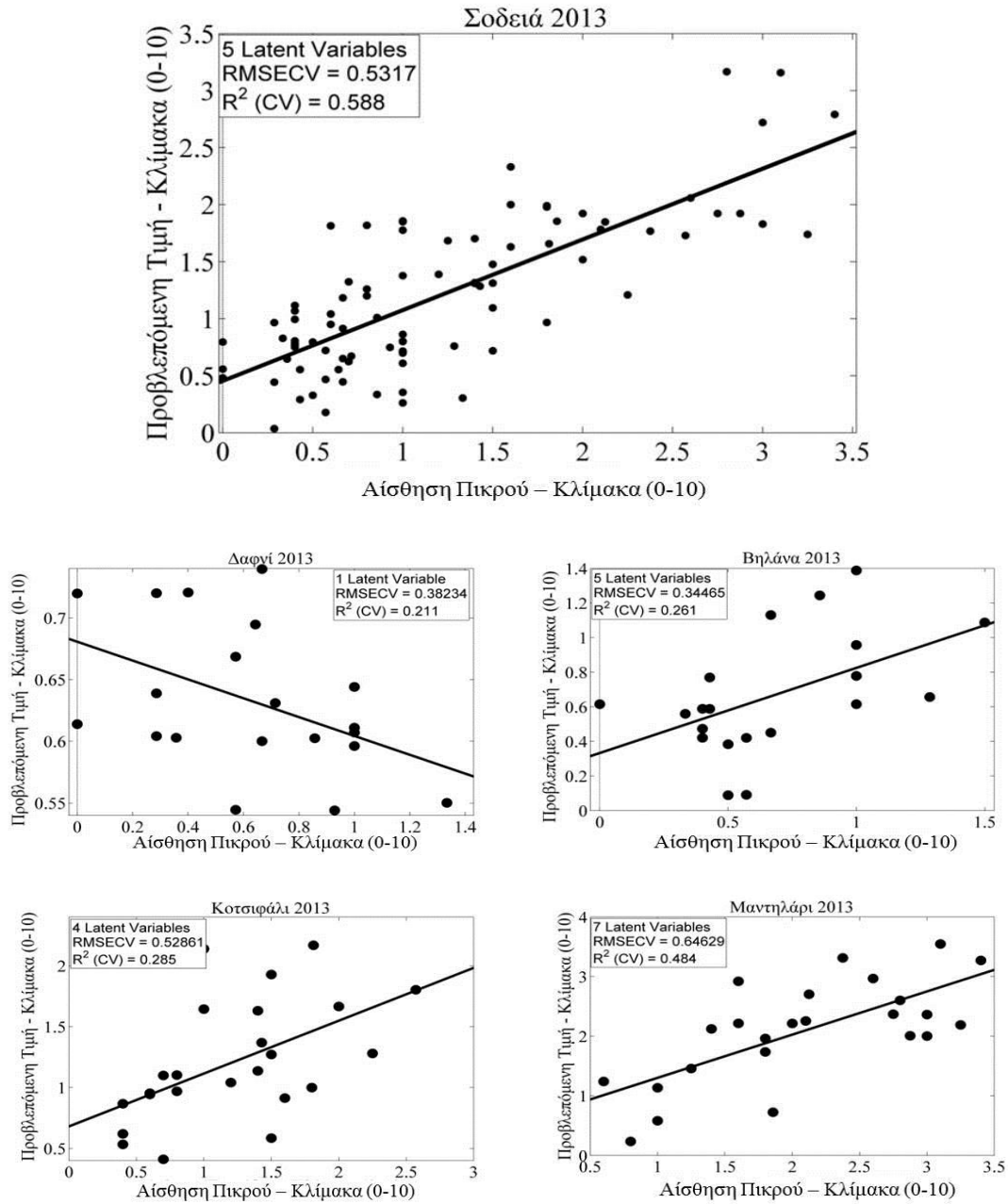
N: Αριθμός Δειγμάτων, Mean: Μέση Τιμή βαθμολογίας (αίσθηση πικρού) SD: Τυπική Απόκλιση, r²: Συντελεστής συσχέτισης, SECV: Σφάλμα Πρόβλεψης, RPD: Υπολειμματική Προβλεπτική Απόκλιση.

Στις **Εικόνες 10.10** και **10.11** απεικονίζονται οι προβλεπτικές ικανότητες των μοντέλων τόσο για τα δείγματα της σοδειάς του 2012 όσο και για τα δείγματα της σοδειάς του 2013 (όλες οι ποικιλίες μαζί και κάθε ποικιλία μεμονωμένα). Βάσει της τιμής RPD, αξιόπιστα μοντέλα αποκαλύπτονται στις περιπτώσεις όπου τα δείγματα προέρχονται από όλες τις ποικιλίες μαζί τόσο για τη σοδειά του 2012 όσο και για τη

σοδειά του 2013, αλλά και στην περίπτωση της ποικιλίας Δαφνί της σοδειάς 2013. Για τις υπόλοιπες μεμονωμένες περιπτώσεις τα μοντέλα χαρακτηρίζονται ως ενδεικτικά και ανεπαρκή.



Εικόνα 10.10. Σύγκριση της προβλεπόμενης τιμής η οποία προκύπτει από τη φασματοσκοπία απορρόφησης υπεριώδους 240-400 nm για την αίσθηση πικρού δειγμάτων οίνου της σοδειάς του 2012 με την αντίστοιχη τιμή από πάνελ έμπειρων γευστηγνωστών (μέθοδος αναφοράς)



Εικόνα 10.11. Σύγκριση της προβλεπόμενης τιμής η οποία προκύπτει από τη φασματοσκοπία απορρόφησης υπεριώδους 240-400 nm για την αίσθηση πικρού δειγμάτων οίνου της σοδειάς του 2013 με την αντίστοιχη τιμή από πάνελ έμπειρων γευστιγνωστών (μέθοδος αναφοράς)

10.4 Συσχέτιση Φασματοσκοπίας Απορρόφησης Ορατού με τη συγκέντρωση των Ανθοκυανών

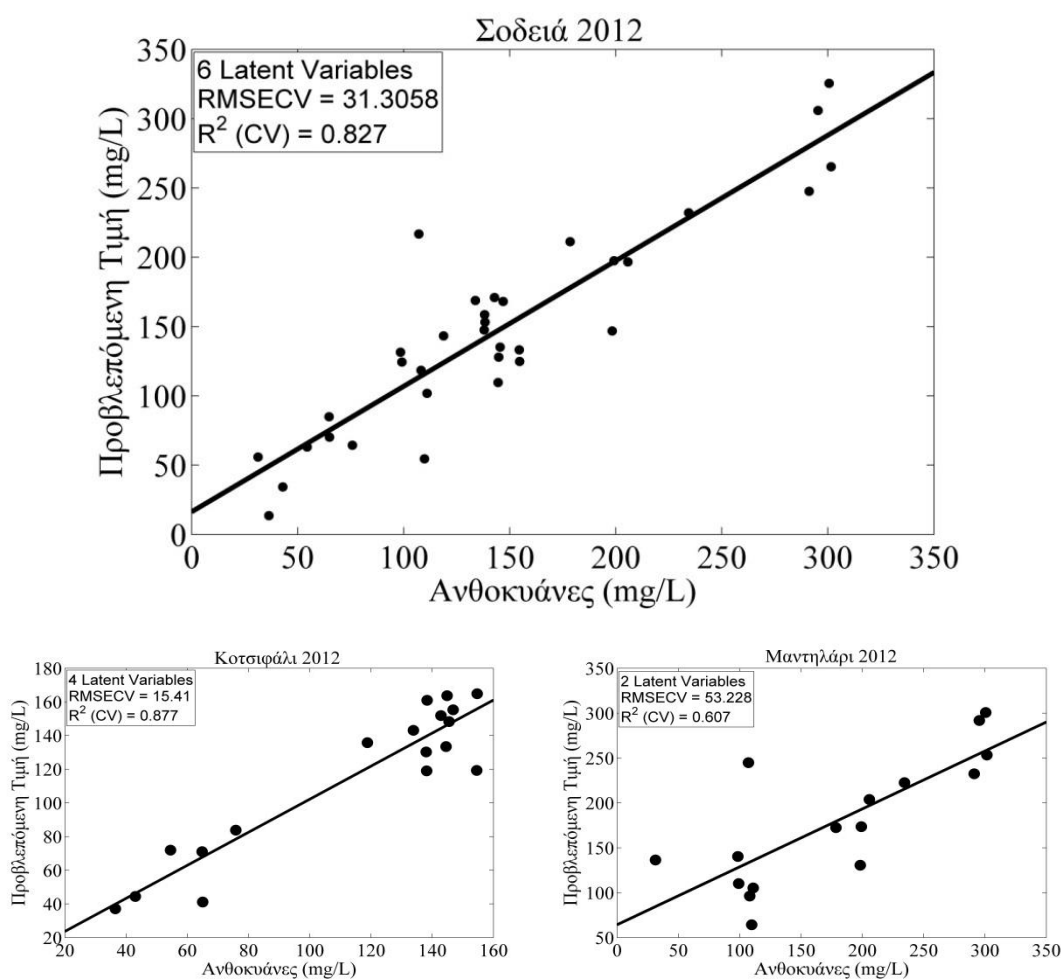
Στην ενότητα **10.4** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μελέτης μας όσον αφορά στην ικανότητα της φασματοσκοπίας απορρόφησης ορατού 400-600 nm στην πρόβλεψη της ανθοκυανικής σύστασης του οίνου. Ως μέθοδος αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η τροποποιημένη μέθοδος Somers, η οποία βασίζεται στη μέτρηση της απορρόφησης στα 520 nm μετά από αραίωση των δειγμάτων με πυκνό υδροχλωρικό οξύ HCl 1M και προσθήκη SO₂ [13]. Η εφαρμογή αυτής της μεθόδου πραγματοποιήθηκε από την επιστημονική ομάδα του ΤΕΙ Κρήτης στο πλαίσιο του ερευνητικού έργου Θαλής «Παλιός Οίνος». Η απορρόφηση του οίνου στο ορατό τμήμα του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος συνδέεται άμεσα με τη συγκέντρωση των ανθοκυανών (μονομερείς και πολυμερείς μορφές) επομένως μία τέτοιου είδους συσχέτιση θεωρείται απόλυτα λογική. Στον **Πίνακα 10.6** γίνεται πλήρης περιγραφή των χαρακτηριστικών της κάθε ομάδας δειγμάτων (σοδειά, ποικιλία και αριθμός δειγμάτων), της μέσης τιμής στη συγκέντρωση των ανθοκυανών και η τυπική απόκλιση. Επιπλέον περιγράφονται οι στατιστικοί δείκτες οι οποίοι προκύπτουν από την εφαρμογή της τεχνικής των μερικών ελαχίστων τετραγώνων και η αποτίμηση της επιτυχίας του κάθε μοντέλου πρόβλεψης.

Πίνακας 10.6. Στατιστικοί δείκτες από τη συσχέτιση της φασματοσκοπίας απορρόφησης ορατού 400-620 nm με την τροποποιημένη μέθοδο Somers για τον προσδιορισμό της Ανθοκυανικής σύστασης του οίνου (mg/L)

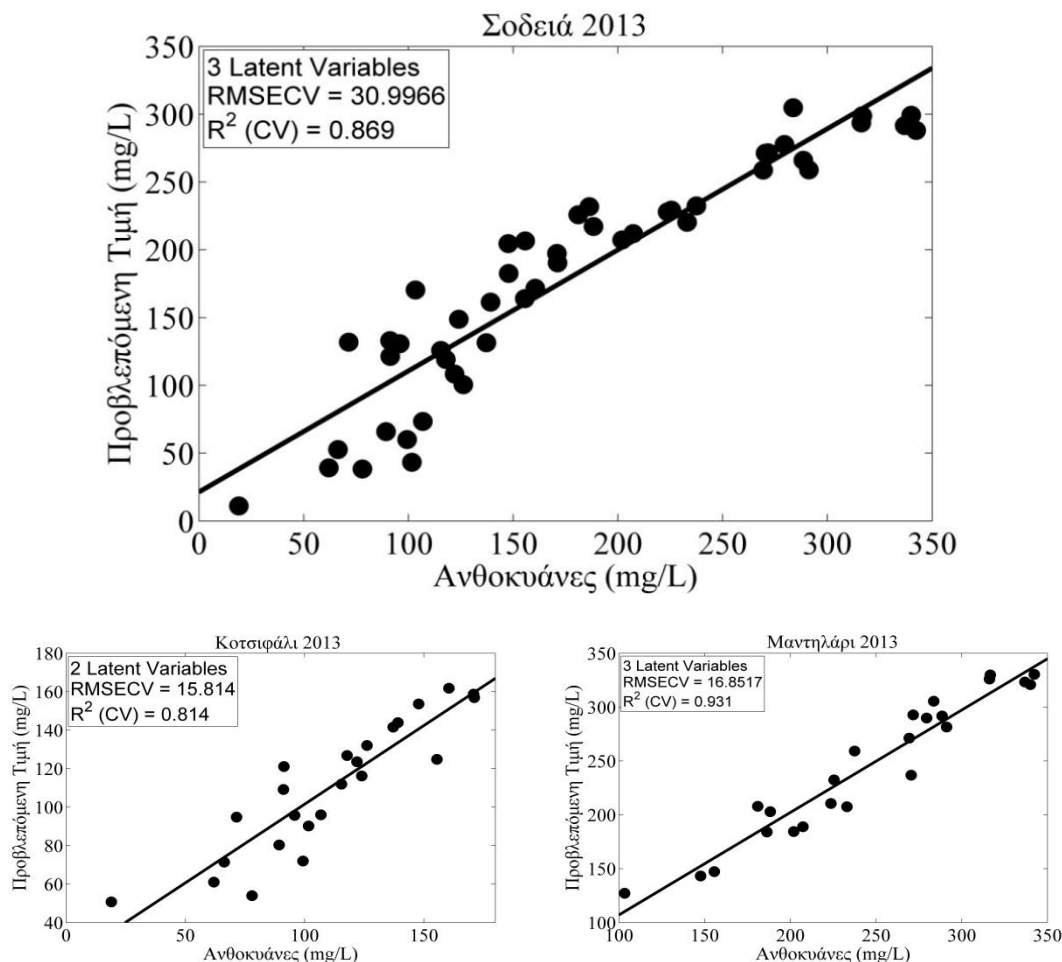
Σοδειά	Ποικιλία	N	Mean	SD	r ²	SECV	RPD	Αποτίμηση
2012	όλες	34	144.41	73.29	0.8	31.3	2.34	Εξαιρετικό
2012	Κοτσιφάλι	18	113.36	41.47	0.8	15.41	2.69	Εξαιρετικό
2012	Μαντηλάρι	16	179.35	84.66	0.6	53.22	1.59	Αξιόπιστο
2013	όλες	48	178.28	85.27	0.8	30.99	2.75	Εξαιρετικό
2013	Κοτσιφάλι	24	110.83	36.38	0.8	15.81	2.32	Εξαιρετικό
2013	Μαντηλάρι	24	245.73	64.02	0.9	16.85	3.80	Εξαιρετικό

N: Αριθμός Δειγμάτων, Mean: Μέση Τιμή συγκέντρωσης ανθοκυανών (mg/L), SD: Τυπική Απόκλιση (mg/L), r²: Συντελεστής συσχέτισης, SECV: Σφάλμα Πρόβλεψης (mg/L), RPD: Υπολειμματική Προβλεπτική Απόκλιση

Στις **Εικόνες 10.12** και **10.13** απεικονίζονται οι προβλεπτικές ικανότητες των μοντέλων τόσο για τα δείγματα της σοδειάς του 2012 όσο και για τα δείγματα της σοδειάς του 2013 (όλες οι ποικιλίες μαζί και κάθε ποικιλία μεμονωμένα). Το σύνολο της απορρόφησης του οίνου στο ορατό οφείλεται σε ανθοκυάνες και δεν υπάρχει συνεισφορά στην απορρόφηση από άλλες χημικές ενώσεις. Δεδομένου αυτού και θέτοντας ως κριτήριο αξιολόγησης την τιμή RPD, το σύνολο των μοντέλων πρόβλεψης χαρακτηρίζονται ως εξαιρετικά, με εξαίρεση την μεμονωμένη περίπτωση της ποικιλίας Μαντηλάρι της σοδειάς του 2012, το οποίο είναι απλά αξιόπιστο.



Εικόνα 10.12. Σύγκριση της προβλεπόμενης τιμής η οποία προκύπτει από τη φασματοσκοπία απορρόφησης ορατού 400-620 nm για την ανθοκυανική σύσταση δειγμάτων οίνου της σοδειάς του 2012 με την αντίστοιχη τιμή από την τροποποιημένη μέθοδο Somers (μέθοδος αναφοράς)



Εικόνα 10.13. Σύγκριση της προβλεπόμενης τιμής η οποία προκύπτει από τη φασματοσκοπία απορρόφησης ορατού 400-620 nm για την ανθοκυανική σύσταση δειγμάτων οίνου της σοδειάς του 2013 με την αντίστοιχη τιμή από την τροποποιημένη μέθοδο Somers (μέθοδος αναφοράς)

10.5 Συσχέτιση Φασματοσκοπίας Απορρόφησης Υπεριώδους με τη συγκέντρωση των Ταννινών

Στην παρούσα ενότητα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μελέτης μας όσον αφορά στην ικανότητα της φασματοσκοπίας απορρόφησης υπεριώδους 240-400 nm στην πρόβλεψη της ταννινικής σύστασης του οίνου. Ως μέθοδος αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η προτεινόμενη μέθοδος από τους Ribéreau-Gayon & Stonestreet (1965) βάσει της οποίας τα δείγματα θερμαίνονται σε όξινο περιβάλλον (HCl) προκαλώντας τη διάσπαση των ταννινών σε κυανιδίνη και στη συνέχεια μετράται η απορρόφηση στα 550 nm [14]. Η εφαρμογή αυτής της μεθόδου πραγματοποιήθηκε από την επιστημονική ομάδα του ΤΕΙ Κρήτης στο πλαίσιο του ερευνητικού έργου

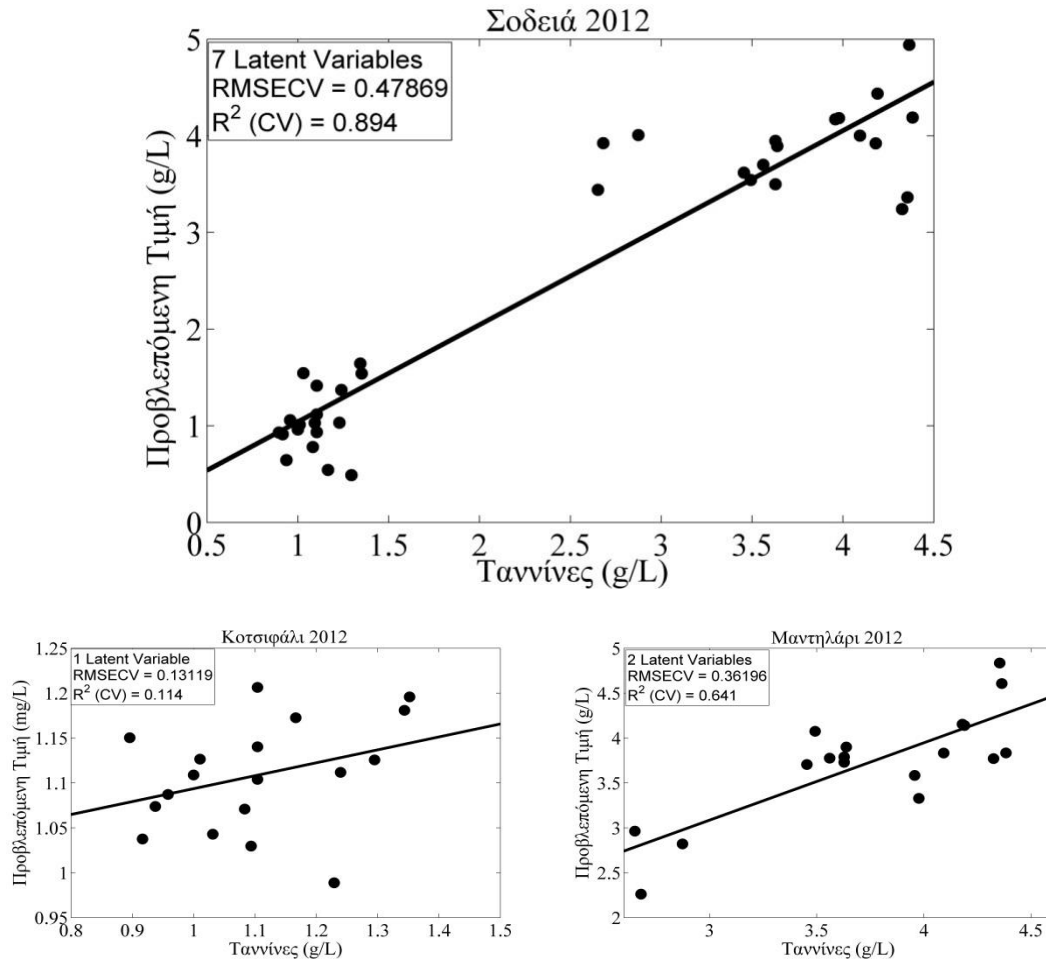
Θαλής «Παλαιός Οίνος». Η απορρόφηση του οίνου στο υπεριώδες τμήμα του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος συνδέεται άμεσα με τη συγκέντρωση των Ταννινών, επομένως μία τέτοιου είδους συσχέτιση θεωρείται απόλυτα λογική. Όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις στον **Πίνακα 10.7** περιγράφονται τα χαρακτηριστικά της κάθε ομάδας δειγμάτων και οι στατιστικοί δείκτες με την αποτίμηση της επιτυχίας του κάθε μοντέλου πρόβλεψης. Στις **Εικόνες 10.14** και **10.15** απεικονίζονται οι προβλεπτικές ικανότητες των μοντέλων τόσο για τα δείγματα της σοδειάς του 2012 όσο και για τα δείγματα της σοδειάς του 2013 (όλες οι ποικιλίες μαζί και κάθε ποικιλία μεμονωμένα).

Πίνακας 10.7. Στατιστικοί δείκτες από τη συσχέτιση της φασματοσκοπίας απορρόφησης υπεριώδους 240-400 nm με την προτεινόμενη μέθοδο από τους Ribéreau-Gayon & Stonestreet στον προσδιορισμό της Ταννινικής σύστασης (g/L)

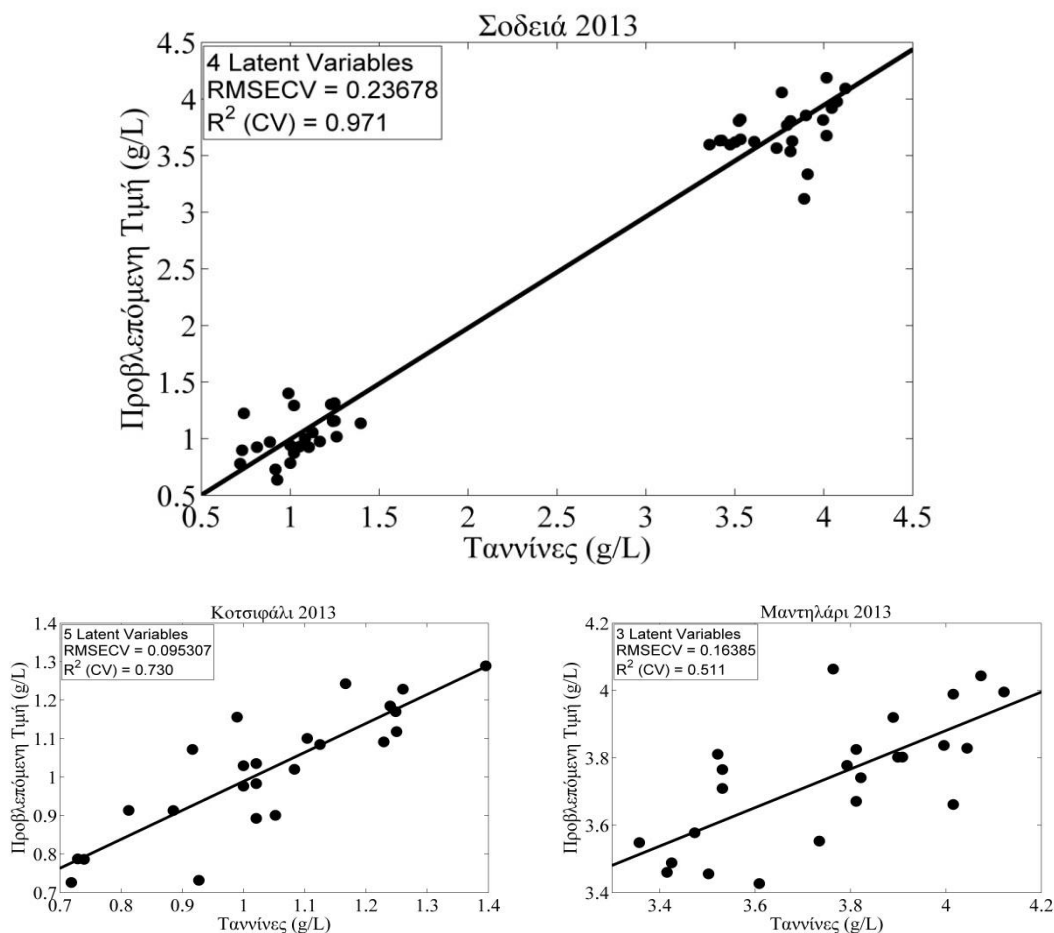
Σοδει	Ποικιλία	N	Mean	SD	r ²	SECV	RPD	Αποτίμηση
2012	όλες	36	2.42	1.38	0.8	0.478	2.89	Εξαιρετικό
2012	Κοτσιφάλι	18	1.1	0.14	0.1	0.131	1.07	Ενδεικτικό
2012	Μαντηλάρι	18	3.75	0.55	0.6	0.361	1.52	Αξιόπιστο
2013	όλες	48	2.40	1.37	0.9	0.236	5.81	Εξαιρετικό
2013	Κοτσιφάλι	24	1.04	0.18	0.7	0.095	1.89	Αξιόπιστο
2013	Μαντηλάρι	24	3.75	0.23	0.5	0.163	1.41	Αξιόπιστο

N: Αριθμός Δειγμάτων, Mean: Μέση Τιμή συγκέντρωσης ταννινών (g/L), SD: Τυπική Απόκλιση (g/L), r²: Συντελεστής συσχέτισης, SECV: Σφάλμα Πρόβλεψης (g/L), RPD: Υπολειμματική Προβλεπτική Απόκλιση

Με βάση την τιμή RPD, εξαιρετικά μοντέλα έχουμε στις περιπτώσεις όπου τα δείγματα προέρχονται από όλες τις ποικιλίες μαζί, αλλά και στην περίπτωση της ποικιλίας Κοτσιφάλι της σοδειάς 2012. Για τις υπόλοιπες περιπτώσεις τα μοντέλα είναι απλά αξιόπιστα.



Εικόνα 10.14. Σύγκριση της προβλεπόμενης τιμής η οποία προκύπτει από τη φασματοσκοπία απορρόφησης υπεριώδους 240-400 nm για την ταννινική σύσταση δειγμάτων οίνου της σοδειάς του 2012 με την αντίστοιχη τιμή από τη μέθοδο Ribéreau-Gayon & Stonestreet (1965) (μέθοδος αναφοράς)

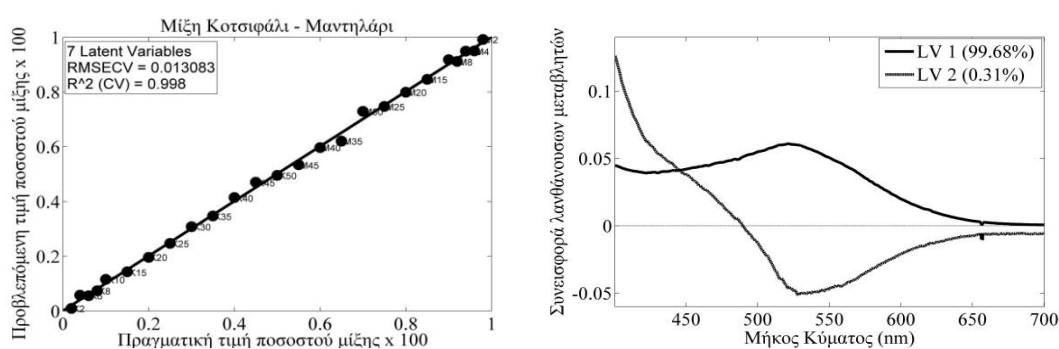


Εικόνα 10.15. Σύγκριση της προβλεπόμενης τιμής η οποία προκύπτει από τη φασματοσκοπία απορρόφησης υπεριώδους 240-400 nm για την ταννινική σύσταση δειγμάτων οίνου της σοδειάς του 2013 με την αντίστοιχη τιμή από τη μέθοδο Ribéreau-Gayon & Stonestreet (1965) (μέθοδος αναφοράς)

10.6 Πρόσδιορισμός Ποσοστού Μίξης με τη Φασματοσκοπία Απορρόφησης Ορατού

Στην τελευταία ενότητα, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μελέτης μας όσον αφορά στην ικανότητα της φασματοσκοπίας απορρόφησης ορατού 400-700 nm στην πρόβλεψη του επί της εκατό ποσοστού % παρουσίας μίας ποικιλίας σε μίγματα οίνου τα οποία προκύπτουν από την ανάμιξη δύο ποικιλιών μετά την οινοποίηση τους. Στην περίπτωση μας μελετήθηκε η ανάμιξη των ερυθρών ποικιλιών Κοτσιφάλι και Μαντηλάρι. Παρασκευάστηκαν 13 δείγματα με ποσοστά 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 και 50 % της ποικιλίας Κοτσιφάλι στην ποικιλία Μαντηλάρι και 12 δείγματα με ποσοστά 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 και 45 % της ποικιλίας Μαντηλάρι στην ποικιλία Κοτσιφάλι. Ο συνολικός αριθμός των δειγμάτων ήταν 25.

Η συσχέτιση των δεδομένων από τα φάσματα απορρόφησης (ανεξάρτητες μεταβλητές) με το ποσοστό μίξης του κάθε δείγματος (εξαρτημένες μεταβλητές) μέσω της τεχνικής των μερικών ελαχίστων τετραγώνων μας δίνει ένα εξαιρετικό μαθηματικό μοντέλο πρόβλεψης. Το μοντέλο αποτελείται από επτά λανθάνουσες μεταβλητές και εξηγεί το 100% της διακύμανσης των ανεξάρτητων μεταβλητών καθώς και το 100% της διακύμανσης των εξαρτημένων μεταβλητών. Ο συντελεστής συσχέτισης r^2 έχει τιμή 0.998, ενώ το σφάλμα στην πρόβλεψη του επί της εκατό ποσοστού παρουσίας της μίας ποικιλίας στην άλλη (μετά την εσωτερική του αξιολόγηση) είναι 1.3%. Η υψηλή τιμή RPD επιβεβαιώνει την αξιοπιστία του μαθηματικού μοντέλου.



Εικόνα 10.16. Μοντέλο πρόβλεψης από την τεχνική Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων α) Συσχέτιση της προβλεπόμενης τιμής η οποία προκύπτει από τη φασματοσκοπία απορρόφησης υπεριώδους 240-400 nm με την πραγματική τιμή του ποσοστού μίξης β) Loading Plot με την συνεισφορά των λανθάνουσων μεταβλητών

Στην **Εικόνα 10.16α** παρουσιάζεται η απόλυτα γραμμική σχέση του πραγματικού ποσοστού μίξης με την προβλεπόμενη τιμή του, ενώ στο Loading Plot της **Εικόνας 10.16β** φαίνεται ότι η κορυφή απορρόφησης γύρω στα 520 nm είναι υπεύθυνη για τον προσδιορισμό του ποσοστού μίξης. Κατά τη δημιουργία του μοντέλου πρόβλεψης τα φασματοσκοπικά δεδομένα δεν υπέστησαν κάποια προεπεξεργασία (Raw-Data). Η ικανότητα της φασματοσκοπίας απορρόφησης στον προσδιορισμό του ποσοστού μίξης μεταξύ των δύο οίνων με ένα τόσο χαμηλό σφάλμα της τάξεως του 1.3 %, καθιστά την τεχνική αυτή ως κατάλληλη για τον εντοπισμό πιθανής νοθείας ενός οίνου με έναν άλλο οίνο χαμηλότερης ποιότητας.

Βιβλιογραφία

1. J.T. Alander, V. Bochko, B. Martinkauppi, S. Saranwong, T. Mantere, A Review of Optical Nondestructive Visual and Near-Infrared Methods for Food Quality and Safety. *International Journal of Spectroscopy*. 2013, Article ID 341402, 36 pages
2. C.A. Teixeira dos Santos, R.N.M.J. Páscoa, J.A. Lopez, A review on the application of vibrational spectroscopy in the wine industry: From soil to bottle. *Trends in Analytical Chemistry*. 2017, **88**, 100-118
3. C. García-Jares and B. Médina, Prediction of Some Physico-chemical Parameters in Red Wines from Ultraviolet-Visible Spectra Using a Partial Least-squares Model in Latent Variables. *Analyst*. 1995, **120**, 1891-1896
4. D. Cozzolino, M.J. Kwiatkowski, M. Parker, W.U. Cynkar, R.G. Damberg, M. Gishen, M.J. Herderich, Prediction of phenolic compounds in red wine fermentations by visible and near infrared spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*. 2004, **513**, 73-80
5. D. Cozzolino, H.E. Smyth, K.A. Lattey, W. Cynkar, L. Janik, R.G. Damberg, I.L. Francis, M. Gishen, Relationship between sensory analysis and near infrared spectroscopy in Australian Riesling and Chardonnay wines. *Analytica Chimica Acta*. 2005, **539**, 341-348
6. A. L. Waterhouse, Determination of total Phenolics. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. 2003, I:11:11.1.
7. Old wine - Evaluation and Optimization of the quality factors during wine maturation produced from Cretan red and white grape varieties. [Online] <http://eilotas.chemistry.uoc.gr/oldwine/index.php/>.
8. P. Ribéreau-Gayon, Y. Glories, A. Maujean, D. Dubourdieu, Handbook of Enology Vol. 2: The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments. Wiley. (2006), pp. 200-201.
9. A. Spyros and P. Dais, NMR Spectroscopy in Food Analysis. *Royal Society of Chemistry*, , Chap. 8, pp. 202-240, Cambridge, UK, (2013)

10. Μ. Αμαργιανιτάκη, Ανάλυση και Βελτιστοποίηση της Διαδικασίας Παλαίωσης του Οίνου με την Φασματοσκοπία NMR. Διδακτορική Διατριβή. Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο (2015)
11. K. Grainger, Wine quality: tasting and selection. John Wiley & Sons (2009)
12. R. Jackson, Wine tasting: a professional handbook. Academic Press (2009)
13. P. Ribéreau-Gayon and E. Stonestreet, Le dosage des anthocyanes dans le vin rouge. *Bull. Soc. Chim. Fr.* 1965, **9**, 2649-2652
14. M.D. Mercurio, R.G. Damberg, M.J. Herderich, P. A. Smith, High throughput analysis of red wine and grape phenolics - Adaptation and validation of methyl cellulose precipitable tannin assay and modified somers color assay to a rapid 96 well plate format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2007, **55**, 4651-4657

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11

Συμπεράσματα

Παράγοντες Επιρροής στη μέτρηση της Απορρόφησης

- Μεταβάλλοντας το pH οίνου προς όξινες συνθήκες παρατηρείται μία υπερχρωμική μετατόπιση στο φάσμα απορρόφησης UV-VIS (αύξηση στην τιμή της απορρόφησης). Αντίστοιχη μεταβολή του pH προς βασικές συνθήκες, οδηγεί σε μία βαθυχρωμική μετατόπιση (μετακίνηση της κορυφής απορρόφησης σε μεγαλύτερα μήκη κύματος).
- Η μεταβολή της κατ' όγκο συγκέντρωσης του οίνου, εμφανίζει μία καλή γραμμική σχέση με τη μετρούμενη τιμή της απορρόφησης.
- Από την παραγωγή του νόμου Beer-Lambert και την επίλυση ως προς το σχετικό σφάλμα της απορρόφησης (dA/A), φαίνεται ότι η τιμή του σχετικού σφάλματος είναι ελάχιστη για τιμές απορρόφησης από 0 έως 1.

Παράγοντες Επιρροής στη μέτρηση του Φθορισμού

- Μεταβάλλοντας το pH είτε προς όξινες είτε προς βασικές συνθήκες, παρατηρείται μία πτώση στην ένταση του φθορισμού, η οποία θα μπορούσε να συνδεθεί με μεταβολή της ισορροπίας μεταξύ των διαφόρων μορφών των φθορίζουσών ουσιών.
- Φαινόμενα αυτό-απορρόφησης, είναι κυρίως υπεύθυνα για την παρατηρούμενη εκθετική μείωση της έντασης του φθορισμού με την αύξηση της συγκέντρωσης. Για την εξάλειψη τέτοιων φαινομένων απαιτείται είτε η αραιώση των δειγμάτων οίνου έτσι ώστε η απορρόφηση τους να είναι μικρότερη από την τιμή 0.05, είτε η μέτρηση του φθορισμού σε διάταξη εμπρόσθιας όψης.
- Ο χάρτης φθορισμού ο οποίος προκύπτει στη διάταξη εμπρόσθιας όψης (Front-Face) διαφέρει από τον χάρτη φθορισμού στη διάταξη ορθής γωνίας (Right-Angle).

Διαχωρισμός Βοτανικής Προέλευσης

- Η φασματοσκοπία απορρόφησης υπεριώδους είναι μία τεχνική ικανή να διαχωρίσει με απόλυτη (100%) επιτυχία δείγματα Οίνου με βάση τη Βοτανική τους προέλευση (Δαφνί, Βηλάνα, Κοτσιφάλι, Μαντηλάρι). Ο διαχωρισμός οφείλεται στο διαφορετικό φαινολικό δυναμικό της κάθε ποικιλίας. Οι μεγαλύτερες διαφορές εμφανίζονται μεταξύ των ποικιλιών Βηλάνα και Μαντηλάρι και οι μικρότερες μεταξύ των ποικιλιών Δαφνί και Κοτσιφάλι.
- Η φασματοσκοπία απορρόφησης ορατού είναι μία τεχνική ικανή να διαχωρίσει με απόλυτη (100%) επιτυχία δείγματα ερυθρού Οίνου με βάση τη Βοτανική τους προέλευση (Κοτσιφάλι και Μαντηλάρι). Ο διαχωρισμός οφείλεται στη διαφορετική ανθοκυανική σύσταση της κάθε ποικιλίας. Η ποικιλία Μαντηλάρι με μεγαλύτερη συγκέντρωση και μικρότερη διακύμανση σε ανθοκυάνες εμφανίζει σταθερότερο χρώμα σε σχέση με την ερυθρή ποικιλία Κοτσιφάλι.
- Η φασματοσκοπία απορρόφησης εγγύς υπέρυθρου είναι μία τεχνική ικανή να διαχωρίσει με απόλυτη (100%) επιτυχία δείγματα Οίνου με βάση τη Βοτανική τους προέλευση (Δαφνί, Βηλάνα, Κοτσιφάλι, Μαντηλάρι) σε ένα συγκεκριμένο στάδιο ωρίμανσης. Ο διαχωρισμός πιθανότατα οφείλεται στη διαφορετική σύσταση της κάθε ποικιλίας σε νερό, αιθανόλη και άλλες οργανικές ενώσεις.
- Η φασματοσκοπία φθορισμού είναι μία τεχνική ικανή να διαχωρίσει με επιτυχία δείγματα Οίνου με βάση τη Βοτανική τους προέλευση (Δαφνί, Βηλάνα, Κοτσιφάλι, Μαντηλάρι). Ο διαχωρισμός οφείλεται στη διαφορετική σύσταση φθορίζουσών ουσιών οι οποίες εμπεριέχονται στον οίνο. Ο διαχωρισμός οφείλεται σε φθορίζουσες ουσίες οι οποίες φθορίζουν στις ακόλουθες περιοχές Διέγερσης/Εκπομπής: 368 nm/445 nm, 332 nm/415 nm, 284 nm/370 nm, 416 nm/520 nm.

Διαχωρισμός Σταδίου Ωρίμανσης

- Η φασματοσκοπία απορρόφησης υπεριώδους είναι μία τεχνική ικανή να διαχωρίσει με επιτυχία δείγματα Οίνου με βάση το στάδιο ωρίμανσης. Το ποσοστό επιτυχίας στις μελετώμενες ποικιλίες οίνου κυμαίνεται από 60-100%.

Ο παρατηρούμενος διαχωρισμός οφείλεται στις μεταβολές του φαινολικού δυναμικού κατά την ωρίμανση.

- Η φασματοσκοπία απορρόφησης ορατού είναι μία τεχνική ικανή να διαχωρίσει με επιτυχία δείγματα κόκκινου Οίνου με βάση το στάδιο ωρίμανσης. Το ποσοστό επιτυχίας στις μελετώμενες ποικιλίες οίνου κυμαίνεται από 60-100%, ενώ ο διαχωρισμός οφείλεται σε μία πτωτική τάση στην κύρια κορυφή απορρόφησης των ανθοκυανών στα 520 nm, η οποία παρατηρείται με την εξέλιξη της ωρίμανσης.
- Η φασματοσκοπία απορρόφησης εγγύς υπέρυθρου είναι μία τεχνική ικανή να διαχωρίσει με απόλυτη (100%) επιτυχία δείγματα Οίνου μεταξύ δύο σταδίων ωρίμανσης.
- Η φασματοσκοπία φθορισμού είναι μία τεχνική ικανή να διαχωρίσει με επιτυχία δείγματα Οίνου με βάση το στάδιο ωρίμανσης για τις περισσότερες των μελετώμενων περιπτώσεων. Ο διαχωρισμός πιθανότατα οφείλεται στη μεταβολή της σύστασης των φθορίζουσών ουσιών του οίνου κατά την ωρίμανση.

Διαχωρισμός με βάση τον τρόπο Ωρίμανσης

- Η φασματοσκοπία απορρόφησης υπεριώδους είναι μία τεχνική ικανή να διαχωρίσει με επιτυχία δείγματα Οίνου με βάση το τρόπο ωρίμανσης, ειδικότερα όταν έχουμε να κάνουμε με λευκές ποικιλίες και βαρέλια τα οποία χρησιμοποιούνται για πρώτη φορά. Το ποσοστό επιτυχίας σε κάποιες περιπτώσεις είναι 100%, ενώ ο διαχωρισμός οφείλεται στις μεταβολές του φαινολικού δυναμικού του οίνου κατά την επαφή του με το ξύλο. Τα ξύλα με την εντονότερη επιρροή είναι της ακακίας και της καστανιάς.
- Η φασματοσκοπία απορρόφησης ορατού μπορεί να προσφέρει ένα μέτριο διαχωρισμό κόκκινων δειγμάτων Οίνου με βάση τον τρόπο ωρίμανσης. Τα ξύλα τα οποία ξεχωρίζουν είναι της ακακίας και της καστανιάς.
- Η φασματοσκοπία απορρόφησης εγγύς υπέρυθρου δεν είναι ικανή να διαχωρίσει δείγματα Οίνου με βάση τον τρόπο ωρίμανσης.
- Η φασματοσκοπία φθορισμού είναι μία τεχνική ικανή να διαχωρίσει με επιτυχία δείγματα Οίνου με βάση τον τρόπο ωρίμανσης μόνο στην περίπτωση της ποικιλίας Δαφνί (2012 και 2013). Στις υπόλοιπες περιπτώσεις η εικόνα δεν

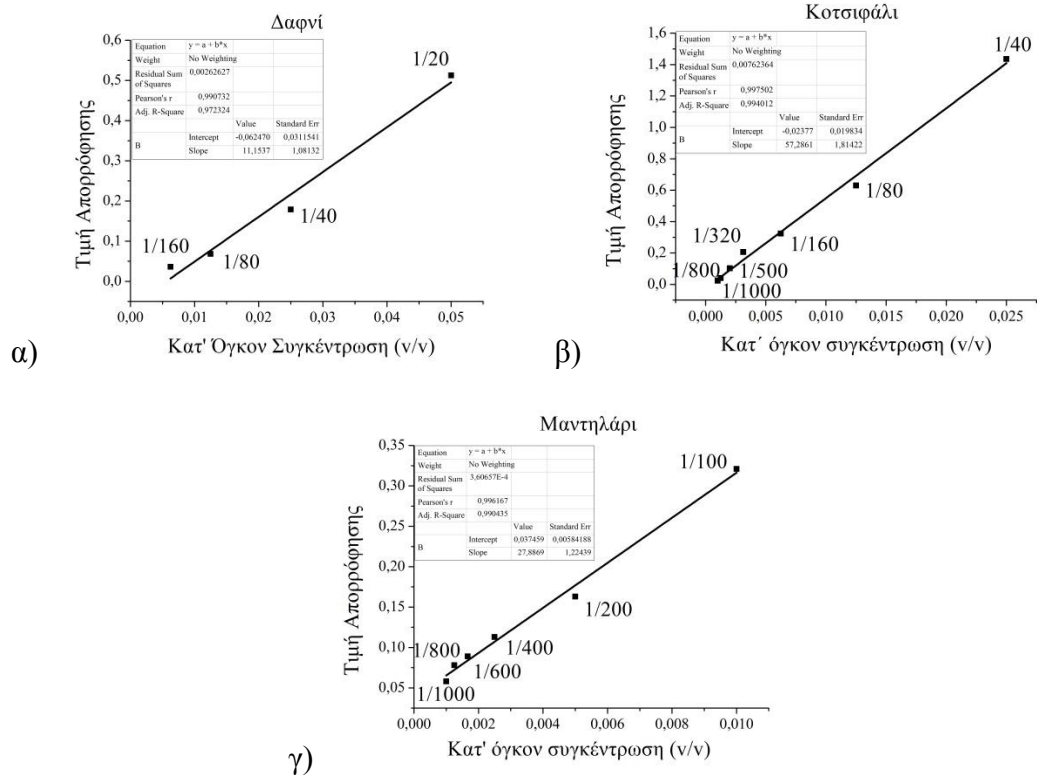
είναι σαφής, παρόλα αυτά ξύλα με έντονη επιρροή στο φαινολικό δυναμικό του οίνου (όπως η ακακία και η καστανιά) δείχνουν μία τάση διαχωρισμού.

Συσχετίσεις και Μοντέλα Πρόβλεψης

- Η συσχέτιση της φαινολικής σύστασης του Οίνου με φάσματα απορρόφησης υπεριώδους αποτιμάται ως εξαιρετική, αξιόπιστη ή απλά ενδεικτική σε κάποιες περιπτώσεις.
- Η συσχέτιση της συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων Τυροσόλη και Καφταρικό Οξύ με φάσματα απορρόφησης υπεριώδους αποτιμάται ως εξαιρετική, αξιόπιστη, ενδεικτική, αλλά και ανεπαρκής σε κάποιες περιπτώσεις.
- Η συσχέτιση της βαθμολογίας στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της αίσθησης Στυφού και της αίσθησης Πικρού με φάσματα απορρόφησης υπεριώδους δίνει εξαιρετικά, αξιόπιστα, ενδεικτικά, αλλά και ανεπαρκή μοντέλα πρόβλεψης.
- Από τη συσχέτιση της ανθοκυανικής σύστασης του Οίνου με φάσματα απορρόφησης ορατού, προκύπτουν εξαιρετικά μοντέλα πρόβλεψης σχεδόν για όλες τις περιπτώσεις των εξεταζόμενων δειγμάτων.
- Από τη συσχέτιση της ταννινικής σύστασης του Οίνου με φάσματα απορρόφησης υπεριώδους, προκύπτουν εξαιρετικά και αξιόπιστα μοντέλα πρόβλεψης.
- Όσον αφορά στην ικανότητα της φασματοσκοπίας απορρόφησης ορατού στον προσδιορισμό του ποσοστού μίξης σε μίγμα οίνου δύο ερυθρών ποικιλιών, διαπιστώθηκε ότι κάτι τέτοιο είναι δυνατό με ένα σφάλμα της τάξεως του 1.3%.

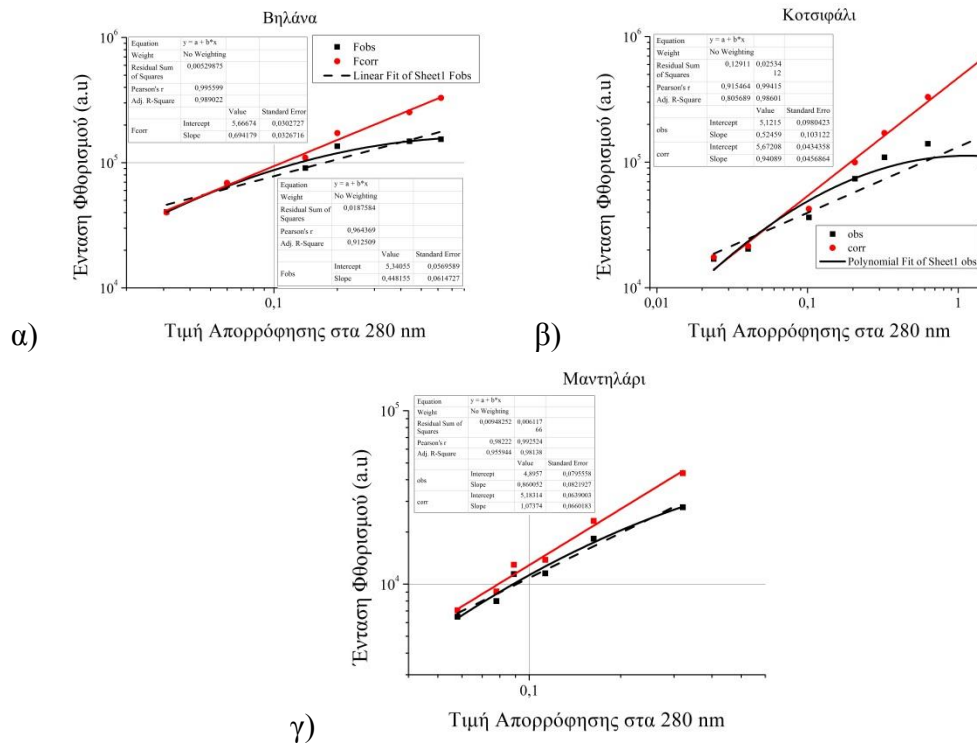
Παράρτημα

Π6.2 Έλεγχος γραμμικότητας μεταξύ κατ' όγκο συγκέντρωσης οίνου και τιμής Απορρόφησης



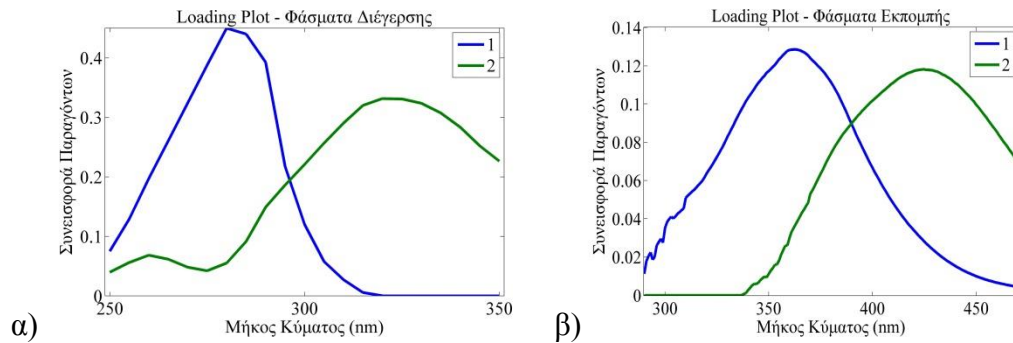
Εικόνα 6.6. Γραμμική σχέση απορρόφησης μεταξύ κατ' όγκο συγκέντρωσης και τιμής απορρόφησης στη κύρια κορυφή λ_{\max} στα 280 nm (διαλύματα ποικιλιών Δαφνί, Κοτσιφάλι και Μαντηλάρι)

Π6.3 Εκθετική - Γραμμική Σχέση κατ' όγκο συγκέντρωσης οίνου και έντασης εκπομπής Φθορισμού

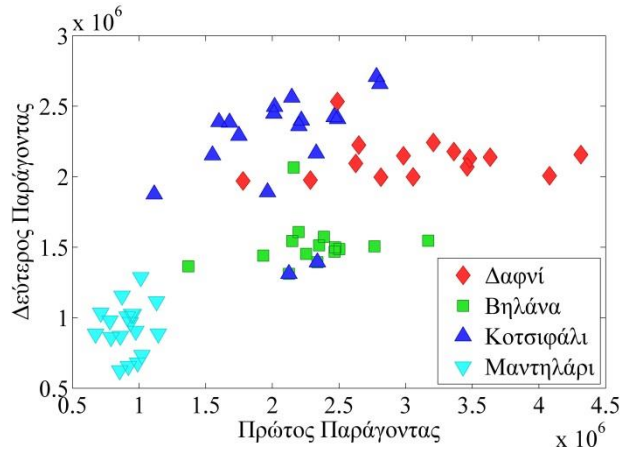


Εικόνα 6.7. Διορθωμένη γραμμική σχέση μεταξύ κατ' όγκο συγκέντρωσης και έντασης εκπομπής φθορισμού (διαλύματα οίνου των ποικιλιών Βηλάννα, Κοτσιφάλι και Μαντηλάρι $\lambda_{exc}=280$ nm, $\lambda_{em} = 360$ nm)

Π7.4 Διαχωρισμός Βοτανικής Προέλευσης Οίνου με τη Φασματοσκοπία Φθορισμού

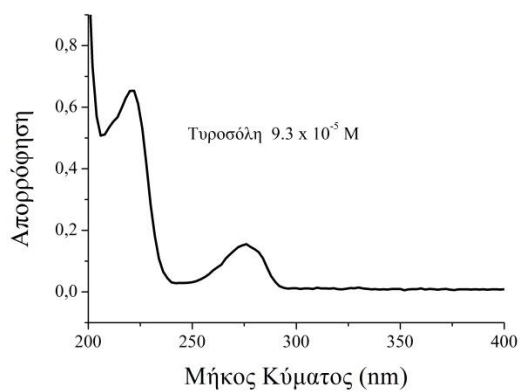


Εικόνα 7.11. Διερευνητική μελέτη με την ανάλυση παράλληλων παραγόντων, Loading plots α) Φάσματα διέγερσης παραγόντων β) Φάσματα εκπομπής παραγόντων (σοδειά 2012)

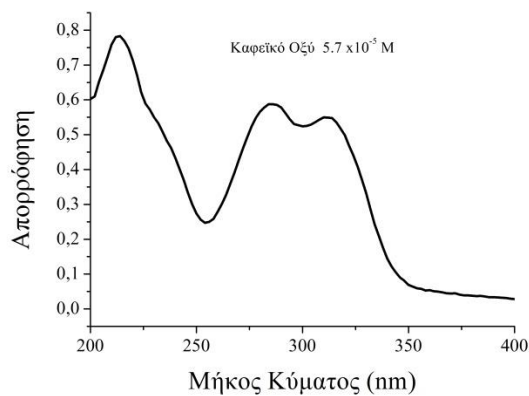


Εικόνα 7.12. Διερευνητική μελέτη με την ανάλυση παράλληλων παραγόντων, Score Plots 1^{ου} έναντι 2^{ου} παράγοντα (σοδειά 2012)

Π10.2 Συσχέτιση Φασματοσκοπίας Απορρόφησης Υπεριώδους με τη Φασματοσκοπική Τεχνική NMR



α)



β)

Εικόνα 10.17. Φάσματα Απορρόφησης υπεριώδους από τα δεδομένα των οποίων μπορεί να υπολογιστεί ο συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας της κάθε ένωσης
α) Τυροσόλη β) Καφεϊκό Οξύ

Συντομεύσεις

Λατινικοί Χαρακτήρες

- **AAS:** Atomic Absorption Spectroscopy.
- **CI:** Colour Intensity.
- **DA:** Discriminant Analysis.
- **DPLS:** Discriminant Partial Least Squares.
- **EEM:** Emission Excitation Matrices.
- **FT-IR:** Fourier Transform Infrared spectroscopy.
- **GC:** Gas Chromatography.
- **HCA:** Hierarchical Cluster Analysis.
- **HOMO:** Highest Occupied Molecular Orbital.
- **HPLC:** High Performance Liquid Chromatography.
- **ICP-MS:** Induced Coupled Plasma Mass Spectrometry.
- **ICP-OES:** Induced Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry.
- **KNN:** K Nearest Neighbors.
- **LDA:** Linear Discriminant Analysis.
- **LIBS:** Laser Induced Breakdown Spectroscopy.
- **LUMO:** Lowest Unoccupied Molecular Orbital.
- **LV:** Latent Variables.
- **Matlab:** Matrix Laboratory.
- **NIR:** Near Infrared Spectroscopy.
- **NMR:** Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy.
- **OD:** Optical Density.
- **OIV:** International Organisation of Vine and Wine.
- **PARAFAC:** Parallel Factor Analysis.
- **PCA:** Principal Component Analysis.
- **PCR:** Principal Component Regression.
- **PLS:** Partial Least Squares Regression.
- **PLS-DA:** Partial Least Squares Discriminant Analysis.
- **RPD:** Residual Predictive Deviation.
- **RMSECV:** Root Mean Square Error of Cross Validation.
- **RMSEP:** Root Mean Square Error of Prediction.

- **SECV:** Standard Error of Cross Validation.
- **SEP:** Standard Error of Prediction.
- **SIMCA:** Soft Independent Modeling of Class Analogy.
- **SNV:** Standard Normal Variate transformation.
- **U-PCA:** Unfolded Principal Component Analysis.
- **UV-VIS:** Ultraviolet-Visible Spectroscopy.
- **VB:** Venetian Blinds.

Ελληνικοί Χαρακτήρες

- **ΟΠΑΠ:** Ονομασία Προελεύσεως Ανωτέρας Ποιότητας.
- **ΟΠΕ:** Ονομασία Προελεύσεως Ελεγχόμενη.
- **ΠΟΠ:** Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης.
- **ΠΓΕ:** Προστατευόμενη Γεωγραφική Ένδειξη.

Δημοσιεύσεις

- ✓ **E. Poulakis**, A. Philippidis, M. Velegrakis. UV-Visible absorption spectroscopy as a tool for the discrimination of Cretan grape varieties and type of barrel during wine aging process. (In Preparation)
- ✓ A. Philippidis, **E. Poulakis**, M. Basalekou, A. Strataridaki, S. Kallithraka, M. Velegrakis, Characterization of Greek Wine by Ultraviolet-Visible Absorption Spectrometry and Statistical Multivariate Methods. *Analytical Letters* (2017), **50**(12), 1950-1963
- ✓ A. Philippidis, **E. Poulakis**, A. Papadaki, and M. Velegrakis, Comparative Study using Raman and Visible Spectroscopy of Cretan Extra Virgin Olive Oil Adulteration with Sunflower Oil. *Analytical Letters* (2017), **50**, 1-14

Συμμετοχές σε συνέδρια

- ✓ **E. Poulakis**, A. Philippidis, M. Velegrakis, Investigation on Greek White and Red Wines using Optical Absorption and Fluorescence Spectroscopy in combination with Chemometrics. *9th International Conference on "Instrumental Methods of Analysis-Modern Trends and Applications*, Kalamata, September 2015 (Poster).
- ✓ **E. Poulakis**, A. Philippidis, M. Velegrakis, Monitoring Wine maturation in different barrels with UV-Vis and Fluorescence spectroscopy. *XVI International Symposium on Luminescence Spectrometry*, Rhodes, September 2014 (Poster).
- ✓ A. Philippidis, **E. Poulakis**, M. Velegrakis, Investigation on Greek White and Red Wines by UV-VIS Absorption and Fluorescence Spectroscopy in combination with statistical multivariate methods. *XVI International Symposium on Luminescence Spectrometry*, Rhodes, September 2014 (Oral Presentation).