

Εκχύλιση στεμφύλων για ανάκτηση φαινολικών ενώσεων, ποσοτικός προσδιορισμός τους και μέτρηση της αντιοξειδωτικής τους δράσης

Γιαννόπουλος Νικόλαος
Ξένος Δημήτριος

Αλεξάνδρειο Τεχνολογικό Ίδρυμα Θεσσαλονίκης (ΑΤΕΙ), Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων, 57400 Θεσσαλονίκη ΤΘ 141

Υποβολή Πτυχιακής διατριβής που αποτελεί μέρος των απαιτήσεων για την απονομή του Πτυχίου του Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων του ΤΕΙ Θεσσαλονίκης.

Θεσσαλονίκη 2012

Εισηγητής: Καλογιάννης Σταύρος

Ευχαριστίες

Ευχαριστούμε τις οικογένειες μας για την συμπαράστασή τους και την υπομονή τους.

Ευχαριστούμε τους επόπτες καθηγητές για την καθοδήγησή τους και την αμέριστη συμπαράστασή τους.

Ευχαριστούμε το προσωπικό του εργαστηρίου Βιοχημείας για την συνεργασία τους και την πολύτιμη βοήθειά τους.

Ευχαριστούμε τους συμφοιτητές μας που με οποιοδήποτε τρόπο βοήθησαν στην αποπεράτωση της εργασίας.

Ευχαριστούμε τον κ. Βλαχάβα Γιώργο για την πολύτιμη βοήθειά του στην στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Εκχύλιση στεμφύλων για ανάκτηση φαινολικών ενώσεων, ποσοτικός προσδιορισμός τους και μέτρηση της αντιοξειδωτικής τους δράσης

Γιαννόπουλος Νικόλαος
Ξένος Δημήτριος

Αλεξάνδρειο Τεχνολογικό Ίδρυμα Θεσσαλονίκης (ΑΤΕΙ), Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων, 57400 Θεσσαλονίκη ΤΘ 141

Περίληψη

Οι φαινολικές ενώσεις του κρασιού κατέχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες κάτι που τις καθιστά πολύτιμα συστατικά μιας ισορροπημένης διατροφής. Εκτός από το ίδιο το κρασί και τα στέμφυλα σταφυλής, παραπροϊόντα της οινοποίησης, περιέχουν σημαντική ποσότητα φαινολικών ενώσεων. Στην παρούσα μελέτη θα εξεταστεί η δυνατότητα αυξημένης ανάκτησης φαινολικών ενώσεων από στέμφυλα των ποικιλιών ξινόμαυρο και μοσχάτο με τη χρήση ενζύμων που χρησιμοποιούνται σε διάφορα στάδια της οινοποίησης με υδρολυτική δράση στα πολυμερή τβν κυτταρικών τοιχωμάτων των φυτών. Η αξιολόγηση των εκχυλιζόμενων φαινολικών συστατικών έγινε με τη μέθοδο μέτρησης ολικών φαινολικών Folin – Ciocalteu ενώ παράλληλα μετρήθηκε και η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων με το αντιδραστήριο της διφαινυλοπικρυλυδραζίνης (DPPH).

Τα ένζυμα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν κατά την διαδικασία της εκχύλισης ήταν τα εμπορικά συσκευάσματα Pectinex Smash XXL, Cellubrix L και Novoferm 61. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η χρήση και των τριών ενζυμικών συσκευασμάτων οδήγησε σε εκχυλίσματα με αυξημένο φαινολικό φορτίο και μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση και στις δύο ποικιλίες κρασιών και η εκχύλιση επηρεάζεται από τη συγκέντρωση του ενζύμου και το χρόνο εκχύλισης. Τα εκχυλίσματα ξινόμαυρου με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση φαινολικών συστατικών ήταν αυτά όπου χρησιμοποιήθηκε 500 μL του ενζύμου Novoferm σε 24 και 72 ώρες εκχύλισης με $146,77 \pm 0,898$ και $145,74 \pm 0,594$ $\mu\text{g/L}$ ισοδύναμα γαλλικού οξέος, αντίστοιχα χωρίς στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Τα εκχυλίσματα ξινόμαυρου με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση αντιοξειδωτική δράση ήταν αυτά όπου χρησιμοποιήθηκε 500 μL του ενζύμου Novoferm σε 24 και 72 ώρες εκχύλισης $220,45 \pm 1,83$ και $222,20 \pm 2,64$ μM Trolox, αντίστοιχα, και με 150 μL του ίδιου ενζύμου σε 72 ώρες $212,26 \pm 1,83$ μM Trolox, χωρίς στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ τους.

Τα εκχυλίσματα μοσχάτου με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση φαινολικών συστατικών ήταν αυτά όπου χρησιμοποιήθηκε 150 μL των ενζύμων Cellubrix και Novoferm σε 72 ώρες εκχύλισης με $71,122 \pm 0,560$ και $71,023 \pm 1,307$ $\mu\text{g/L}$ ισοδύναμα γαλλικού οξέος, αντίστοιχα, και 150 μL Cellubrix σε 24 ώρες με $68,94 \pm 4,06$ $\mu\text{g/L}$ ισοδύναμα γαλλικού, χωρίς στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Τα εκχυλίσματα μοσχάτου με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση αντιοξειδωτική δράση ήταν πάλι αυτά όπου χρησιμοποιήθηκε 150 μL των ενζύμων Cellubrix και Novoferm σε 72 ώρες εκχύλισης με $189,30 \pm 3,08$ και με $189,30 \pm 3,78$ μM Trolox, αντίστοιχα.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα εμπορικά ενζυμικά παρασκευάσματα που χρησιμοποιούνται στην οινοποιία με τη δυνατότητα να υδρολύουν τα πολυμερή συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών μπορούν να βελτιώσουν την ανάκτηση φαινολικών συστατικών από στέμφυλα σταφυλής με εκχύλιση. Ωστόσο, περαιτέρω έρευνα απαιτείται ώστε να αριστοποιηθούν οι συνθήκες εκχύλισης οι οποίες φαίνεται πως εξαρτώνται και τόσο από το χρησιμοποιούμενο ένζυμο όσο και από την ποικιλία σταφυλιού, ώστε να μεγιστοποιηθεί η ανάκτηση αποφεύγοντας ταυτόχρονα την οξείδωση των φαινολικών συστατικών.

Λέξεις κλειδιά: Εκχύλιση, φαινόλες, ένζυμα, αντιοξειδωτικά.

Περιεχόμενα	Σελίδα
1.Εισαγωγή	7
2.Βιβλιογραφική ανασκόπηση	8
2.1.Φαινολικές ενώσεις σε σταφύλια και οίνους	8
2.1.1.Αξιοποίηση παραπροϊόντων οινοποιείου	10
2.1.2.Ο φλοιός του σταφυλιού	10
2.1.3.Σπόροι και μίσχοι	11
2.2.Ανάκτηση φαινολών με εκχύλιση	11
2.2.1.Μέθοδοι εκχύλισης	12
2.2.2.Εκχύλιση με την βοήθεια ενζύμων	12
2.3.Προσδιορισμός ολικών φαινολών	14
2.3.1.Μέθοδος του υπερμαγγανικού οξέος	14
2.3.2.Μέθοδος Folin-Ciocalteu	15
2.3.3.Μέθοδος ολικών πολυφαινολών (D.O.280)	15
2.4.Αντιοξειδωτικές ουσίες	15
2.4.1.Αντιοξειδωτικές ουσίες και μηχανισμός δράσης τους	15
2.4.2.Αντιοξειδωτική δράση φαινολικών ουσιών	17
2.5.Μέθοδοι μέτρησης αντιοξειδωτικής δράσης	18
2.5.1.Μέθοδος DPPH	18
2.5.2.Μέθοδος ABTS	18
2.5.3.Αντιοξειδωτική δράση φαινολών από στέμφυλα μετρημένη με τις μεθόδους DPP H και ABTS	19
3.Σκοπός της εργασίας	20
4.Πειραματικό μέρος	21
4.1.Υλικά και μέθοδοι	21
4.1.1.Στέμφυλα	21
4.1.2.Αντιδραστήρια	21
4.1.3.Ένζυμα	21
4.1.4.Όργανα	21
4.1.5.Εκχύλιση στέμφυλων (Δοκιμαστικά σχέδια πειράματος)	22
4.1.6. Εκχύλιση στέμφυλων (ποικιλίας Μοσχάτο)	23
4.1.7. Εκχύλιση στέμφυλων (ποικιλίας Ξινόμαυρο)	23
4.1.8.Παρασκευή διαλυμάτων ενζύμων	24
4.2.Μέθοδοι ανάλυσης	25
4.2.1,Προσδιορισμός ολικών φαινολών	25
4.2.2.Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης φαινολών	26
5.Αποτελέσματα-συζήτηση	28
5.1.Εκχύλιση στέμφυλων (π.Μοσχάτο) με ένζυμο Pectinex Smash XXL	31
5.1.1.Προσδιορισμός ολικών φαινολών	31
5.1.2.Αντιοξειδωτική δράση φαινολών	32
5.2. Εκχύλιση στέμφυλων (π.Μοσχάτο) με ένζυμο Celubrix L	33
5.2.1. Προσδιορισμός ολικών φαινολών	33
5.2.2.Αντιοξειδωτική δράση φαινολών	34
5.3. Εκχύλιση στέμφυλων (π.Μοσχάτο) με ένζυμο Novoferm 61	35
5.3.1. Προσδιορισμός ολικών φαινολών	35
5.3.2. Αντιοξειδωτική δράση φαινολών	35
5.4. Εκχύλιση στέμφυλων (π.Ξινόμαυρο) με ένζυμο Pectinex Smash XXL	37
5.4.1.Προσδιορισμός ολικών φαινολών	37

5.4.2.Αντιοξειδωτική δράση φαινολών	38
5.5. Εκχύλιση στέμφυλων (π.Ξινόμαυρο) με ένζυμο Celubrix L	39
5.5.1. Προσδιορισμός ολικών φαινολών	39
5.5.2.Αντιοξειδωτική δράση φαινολών	40
5.6. Εκχύλιση στέμφυλων (π.Ξινόμαυρο) με ένζυμο Novoferm 61	41
5.6.1. Προσδιορισμός ολικών φαινολών	41
5.6.2. Αντιοξειδωτική δράση φαινολών	42
6.Συμπεράσματα	43
7.Βιβλιογραφία	45
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	49

1.Εισαγωγή

Φαινολικές ενώσεις υπάρχουν παντού στα τρόφιμα φυτικής προέλευσης και επομένως αποτελούν αναπόσπαστο μέρος της ανθρώπινης διατροφής. Πρόσφατα διαπιστώθηκε ότι οι φαινολικές ενώσεις εμπλέκονται στην μείωση εκφυλιστικών διαδικασιών όπως οι καρδιοαγγειακές παθήσεις και ο καρκίνος (Bravo et al. , 2000).

Το κρασί είναι μια εξαιρετική πηγή των διαφόρων κατηγοριών φαινολικών ενώσεων που οι αντιοξειδωτικές του ιδιότητες σχετίζονται με το περιεχόμενο του σε φλαβόνες, ανθοκυάνες και ταννικό οξύ αν και πιστεύεται ότι οι αντιοξειδωτικές του ιδιότητες συνδέονται με την συνολική συγκέντρωση σε φαινολικές ενώσεις παρά σε κάποια μεμονωμένα (Makris et al.,2003)

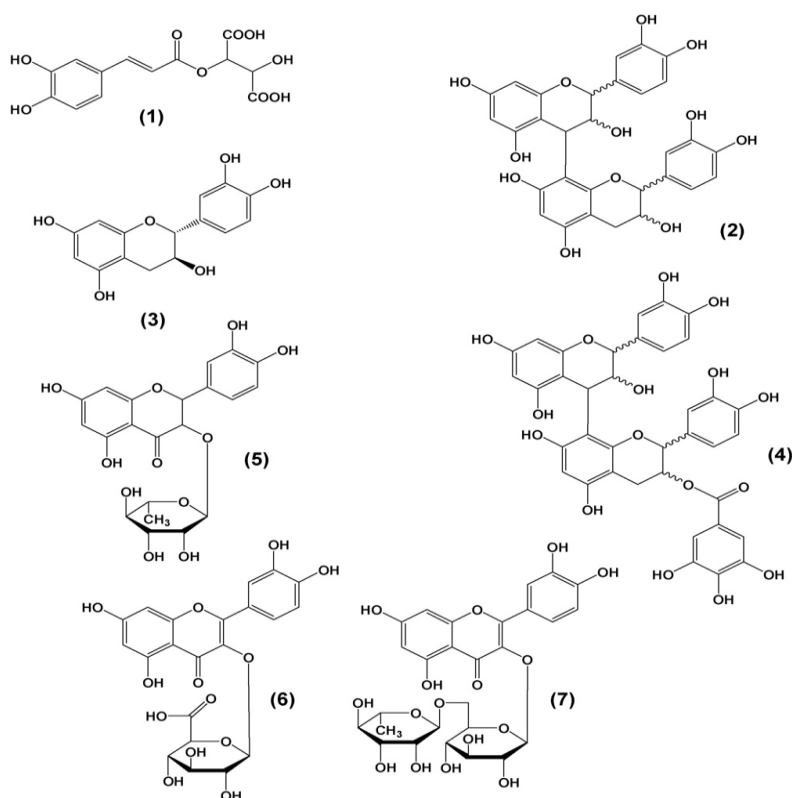
Η διαπίστωση ότι όλο και περισσότερο τα αντιοξειδωτικά και οι ελεύθερες ρίζες παίζουν ρόλο στην υγεία του ανθρώπου και στην γήρανση, έχει σαν αποτέλεσμα το μεγάλο ενδιαφέρον για τις φαινολικές ενώσεις. Οι ελεύθερες ρίζες είναι εξαιρετικά επιβλαβείς για τους ζωντανούς οργανισμούς και η επιθετικότητα τους σε διάφορα συστατικά του κυττάρου οδηγεί στην επιτάχυνση της γήρανσης και μερικές φορές στην καταστροφή των κυττάρων. Οι φαινολικές ενώσεις με την αντιοξειδωτική τους δράση παίζουν ρόλο στην πρόληψη των εκφυλιστικών ασθενειών του ανθρώπου. Η σύνθεση των οίνων σε φαινολικές ενώσεις εξαρτάται από τα σταφύλια καθώς και από τις συνθήκες οινοποίησης σύμφωνα με τους Cheynier et al (1997).Η παρουσία φλαβονοειδών στο κόκκινο κρασί έχει προταθεί ως εξήγηση για το “παράδοξο” των Γάλλων να εμφανίζουν χαμηλή συχνότητα εμφάνισης στεφανιαίας καρδιοπάθειας παρά το γεγονός ότι η δίαιτά τους περιλαμβάνει τροφές πλούσιες σε λίπος και είναι καπνιστές σύμφωνα με τον Aguama (1997).Ευρύ φάσμα μελετών έχουν δείξει ότι η αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών ενώσεων βοηθά στην προστασία από την αρτηριοσκλήρυνση και την στεφανιαία νόσο (Minussi et al.,2003).

Σκοπός της εργασίας είναι η βελτίωση της ανάκτησης φαινολικών συστατικών από στέμφυλα με εκχύλιση, με διαλύτη νερό στους 35⁰C σε δύο χρόνους (24 h και 72 h) με την προσθήκη εμπορικών ενζυμικών σκευασμάτων με υδρολυτική δράση στα πολυμερή των κυτταρικών τοιχωμάτων που χρησιμοποιούνται σε διαφορετικά στάδια της διαδικασίας οινοποίησης. Εκτίμηση της αποτελεσματικότητας της εκχύλισης έγινε με ποσοτικό προσδιορισμό των ολικών φαινολών που εκχυλίστηκαν και μέτρηση της αντιοξειδωτικής τους δράσης.

2. Βιβλιογραφική ανασκόπηση

2.1. Φαινολικές ενώσεις σε σταφύλια και οίνους

Φαινολικές καλούνται οι αρωματικές ενώσεις που περιέχουν στο μορίό τους τη χαρακτηριστική ομάδα της φαινόλης. Στους οίνους υπάρχουν διάφορες οικογένειες φαινολικών ενώσεων όπως τα φαινολικά οξέα, οι φλαβόνες, οι ανθοκυάνες και οι ταννίνες. Τα συστατικά αυτά είναι υπεύθυνα για το χρώμα των οίνων, συμμετέχουν στη διαμόρφωση ορισμένων γευστικών χαρακτηριστικών (στυφάδα, τραχύτητα), προσφέρουν στους οίνους αντιβακτηριακή και αντιοξειδωτική προστασία και παίζουν αποφασιστικό ρόλο στην παλαίωση και στις διάφορες τεχνολογικές κατεργασίες (Σουφλερός 1995)



Σχήμα 1 : Τύποι μερικών φαινολικών ενώσεων. 1 Καφταρικό οξύ, 2 Επικατεχίνη, 3 Κατεχίνη, 4 Γαλλική επικατεχίνη, 5 Αστιλβίνη, 6 Κερκετίνη, 7 Ρουτίνη (Karvela et al, 2009)

Κατά την διάρκεια παραγωγής του κρασιού η μεταφορά των φαινολικών ενώσεων από τα σταφύλια στο μούστο, γίνεται κυρίως από τις φλούδες κατά το στάδιο της διαβροχής. Η διαδικασία οινοποίησης περιλαμβάνει την μεταφορά των φαινολών από την φλούδα των σταφυλιών (και εν μέρει από τους σπόρους και τους μίσχους) στο μούστο και στο κρασί. Το φαινολικό περιεχόμενο στις φλούδες σταφυλιών κυμαίνεται από 285 mg έως 550 mg πολυφαινολών ανά Kg φλούδας, ανάλογα με το σταφύλι, την ποικιλία και το είδος της επεξεργασίας. Πρόσφατα, το σταφύλι και οι φαινόλες του κρασιού ιδίως εκείνες που προέρχονται από υποπροϊόντα οινοποιείου έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον για την πιθανή εφαρμογή τους ως αντιοξειδωτικά τροφίμων. (Pinelo et al, 2006)

Στον πίνακα 1 δίνονται οι συνηθέστερες φαινολικές ενώσεις που συναντιούνται στο σταφύλι καθώς και η πηγή προέλευσή τους.

Πίνακας 1. Φαινολικές ενώσεις στα σταφύλια

Ένωση	Στέμφυλα	Φλοιός	Σπόρια	Μίσχος
Γαλλικό οξύ	0,03-0,11	0,03	0,10-0,11	-
Κουταρικό οξύ	0-1,23	0,03-1,23	-	-
Καρταρικό οξύ	0-6,97	0,11-6,97	-	0,04
Κατεχίνη	0-0,18	0-0,16	2,14-2,15	0,06
Επικατεχίνη	0-0,16	0-0,13	0,88-0,91	0,28
Επικατεχίνη-3-γαλλική	0-0,03	0,04	0,25-0,31	0,07
Ταννίνες	0,22-2,32	1,61	3,56-6,15	0,22-0,89
Ολικές φλαβαν-3-όλες	0,34-4,25	0,12-3,38	3,56-6,15	0,22-0,89
Ολικές ανθοκυανίνες	11,47-29,82	11,47-29,82	-	-
Ολικές φλαβονόλες	0,03-0,63	0,48-0,63	0,02-0,05	0-0,22

Οι τιμές του πίνακα είναι σε mg/g
(Pinelo et al,2006)

Στον πίνακα 2 δίνεται η περιεκτικότητα διαφόρων οίνων σε ολικές φαινόλες.

Πίνακας 2. Ολικές φαινόλες σε διάφορους οίνους

Οίνος	Ολικές φαινόλες
Chardonnay (λευκός)	216
Blended (λευκός)	347
Cabernet Blanc (λευκός)	256
Greco di Tufo (λευκός)	854
Pinot Grigio (λευκός)	439
Blended (ροζέ)	1304
Blended (ερυθρός)	1947
Pinot (ερυθρός)	1984
Cabernet Suuvignon (ερυθρός)	2133
Barbera (ερυθρός)	3314
Monterpuulciano (ερυθρός)	4177

Οι τιμές του πίνακα είναι σε mg/L εκφρασμένες ως ισοδύναμα γαλλικού οξέος
(Pinelo et al.2006)

2.1.1. Αξιοποίηση παραπροϊόντων οινοποιείου

Όταν τα σταφύλια υποβάλλονται σε επεξεργασία για την παραγωγή οίνου, οι φλούδες και οι σπόροι βρίσκονται συνήθως σ' επαφή κατά τη ζύμωση του κρασιού για αρκετές ημέρες. Υπόκεινται έτσι σε μια ήπια αλλά παρατεταμένη αιθανολική εξόρυξη παρέχοντας στο κρασί υψηλή περιεκτικότητα σε φαινόλες. Παρόλα αυτά τα κατάλοιπα που μένουν μετά την ζύμωση, δηλαδή το κρασί από τον πυρήνα των σπόρων, οι φλούδες, οι σπόροι και οι μίσχοι εξακολουθούν να περιέχουν υψηλά επίπεδα πολυφαινολών με τις περισσότερες να διατηρούνται στο κεντρικό μέρος της φλούδας. Αυτές οι φαινόλες είναι αντιοξειδωτικά που δικαιολογούν την χρήση της φλούδας των σταφυλιών ως μια καλή πηγή φαινολικού περιεχομένου. (Pinelo et al, 2006)



Σχήμα 2 : Τομή σταφυλιού. Διακρίνονται ο Φλοιός και οι σπόροι.

2.1.2. Ο φλοιός του σταφυλιού

Σε γενικές γραμμές παρόλο που η φαινολική σύνθεση μπορεί έντονα να διαφέρει σε σχέση με την ποικιλία και τις συνθήκες καλλιέργειας, η φλούδα περιέχει το υψηλότερο ποσοστό των ταννινών στο σταφύλι. Οι ταννίνες διαφέρουν στα σταφύλια έχοντας ένα υψηλότερο βαθμό πολυμερισμού αλλά το χαμηλότερο ποσοστό των εστέρων του γαλλικού οξέος. Κατεχίνη, επικατεχίνη και γαλλική επικατεχίνη είναι τα συστατικά της ταννίνης. Οι ανθοκυανίνες στην φλούδα των σταφυλιών είναι υπεύθυνες για το κόκκινο χρώμα σταφυλιών και κρασιού. Η κερκετίνη, οι γλυκοζίτες, τα γλυκουρονίδια, το γαλλικό οξύ και η ρεσβερατρόλη ολοκληρώνουν την φαινολική σύσταση του φλοιού. Ο φλοιός αντιπροσωπεύει περίπου το 10% του συνολικού ξηρού βάρους των σταφυλιών και ενεργεί ως υδρόφοβο εμπόδιο για την προστασία τους από φυσικούς και τραυματισμούς κλιματολογικούς, αφυδάτωση, μυκητιασική λοίμωξη και υπεριώδες φως. Μπορεί να διαιρεθεί σε τρία στρώματα: Το πρώτο στρώμα είναι η επιδερμίδα που καλύπτεται από υδροξυλιωμένα λιπαρά οξέα, το δεύτερο στρώμα είναι η ενδιάμεση επιδερμίδα και το τρίτο στρώμα είναι το εσωτερικό στρώμα, το υποδερμικό που βρίσκεται πλησιέστερα προς τον πολτό. (Arnous, Meyer, 2009)

2.1.3. Σπόροι και μίσχοι

Οι ταννίνες των σπόρων έχουν την ίδια συστατική μονάδα όπως οι ταννίνες του φλοιού, αλλά στους σπόρους βρίσκονται σε μονομερή μορφή και όχι πολυμερισμένες. Η ποσότητά τους μειώνεται εντυπωσιακά στο στάδιο της ωρίμανσης. Το επίπεδο εστέρων του γαλλικού οξέος στους σπόρους είναι 30% υψηλότερο από εκείνο του φλοιού και των μίσχων. Οι μίσχοι είναι επίσης μια καλή πηγή φαινολών. Οι οίνοι από ολόκληρα σταφύλια γενικά περιέχουν υψηλότερα επίπεδα φαινολικών ενώσεων, απ' αυτούς που παρασκευάζονται μόνο από ρόγες σταφυλιών. (Pinelo et al,2006)

2.2. Ανάκτηση φαινολών με εκχύλιση

Η συνηθέστερη μέθοδος απελευθέρωσης φαινολών από τα σταφύλια ή τα υποπροϊόντα αυτών (στέμφυλα) κατά την διαδικασία της οινοποίησης, είναι με εκχύλιση. Οι σημαντικότεροι παράγοντες που επηρεάζουν την εκχύλιση είναι η θερμοκρασία, ο διαλύτης, ο χρόνος εκχύλισης και το μέγεθος των σωματιδίων.

- Η θερμοκρασία είναι μία από τις πιο κρίσιμες μεταβλητές που επηρεάζουν την απελευθέρωση των φαινολών από τον φλοιό των σταφυλιών. Η αύξηση της θερμοκρασίας εκχύλισης ενισχύει πολύ την διαλυτότητα της διαλυτής ουσίας και τον συντελεστή διάχυσης. Η αύξηση της εκχυλισθέντος φαινόλης παρατηρείται σε υψηλότερες τιμές θερμοκρασίας. Παρότι οι υψηλές θερμοκρασίες έχουν θετικές επιπτώσεις σχετικά με τις αποδόσεις εκχύλισης, η θερμοκρασία δεν μπορεί να αυξηθεί επ' αόριστον, λόγω αστάθειας των φαινολικών ενώσεων αλλά και την μετουσίωση των μεμβρανών πάνω από τους 50°C.
- Ο διαλύτης επηρεάζει την διαδικασία εκχύλισης. Η μεθανόλη, η αιθανόλη και το νερό είναι οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενοι διαλύτες για την εκχύλιση των φαινολών από φλοιούς σταφυλιών και από τον πυρήνα των σπόρων. Μεταξύ αυτών των διαλυτών η μεθανόλη επιδρά αποτελεσματικότερα για την απομάκρυνση των φαινολικών, στη συνέχεια η αιθανόλη και μετά το νερό. Όταν χρησιμοποιούνται οι αλκοόλες ως διαλύτες εκχύλισης γίνεται προοδευτική απελευθέρωση φαινολών από τους φλοιούς των σταφυλιών. Η αύξηση του διαλύτη σε σχέση με τα στερεά επίσης επηρεάζει θετικά την απόδοση της εκχύλισης.
- Αύξηση του λόγου διαλύτη προς τα στερεά, επίσης δείχνει ότι έχει θετική επίδραση στην απόδοση ανάκτησης φαινολών, αλλά θα πρέπει να υπάρξει μια ισορροπία στη χρήση λόγω του κόστους αλλά και των αποβλήτων.
- Ο χρόνος εκχύλισης δεν είναι σημαντικός όταν χρησιμοποιούμε το νερό ως διαλύτη αλλά επηρεάζει σημαντικά την απόδοση της εκχύλισης όταν χρησιμοποιούνται άλλοι διαλύτες ή γενικότερα άλλοι μέθοδοι εκχύλισης.
- Το μικρότερο μέγεθος των σωματιδίων σε συνδυασμό με την μεγάλη ποσότητα δείγματος ευνοούν την απελευθέρωση των φαινολών ιδιαίτερα σε συνεχή εξαγωγή. Σωματίδια και φλούδες που μπορεί να εμφανίζονται κατά την διαδικασία εκχύλισης μειώνουν την επιφανειακή επαφή των στερεών και των υγρών με αποτέλεσμα την μείωση της αποτελεσματικότητας της εκχύλισης.

Άλλες μεταβλητές και τεχνικές που επηρεάζουν τις φαινολικές συγκεντρώσεις είναι το σκάσιμο των κυττάρων, η θερμοκρασία ζύμωσης, το διοξείδιο του θείου, η κατάψυξη, η θερμική προεργασία, τα πηκτινολυτικά ένζυμα και ο χρόνος διαβροχής. (Pinelo et al,2006)

2.2.1. Μέθοδοι εκχύλισης

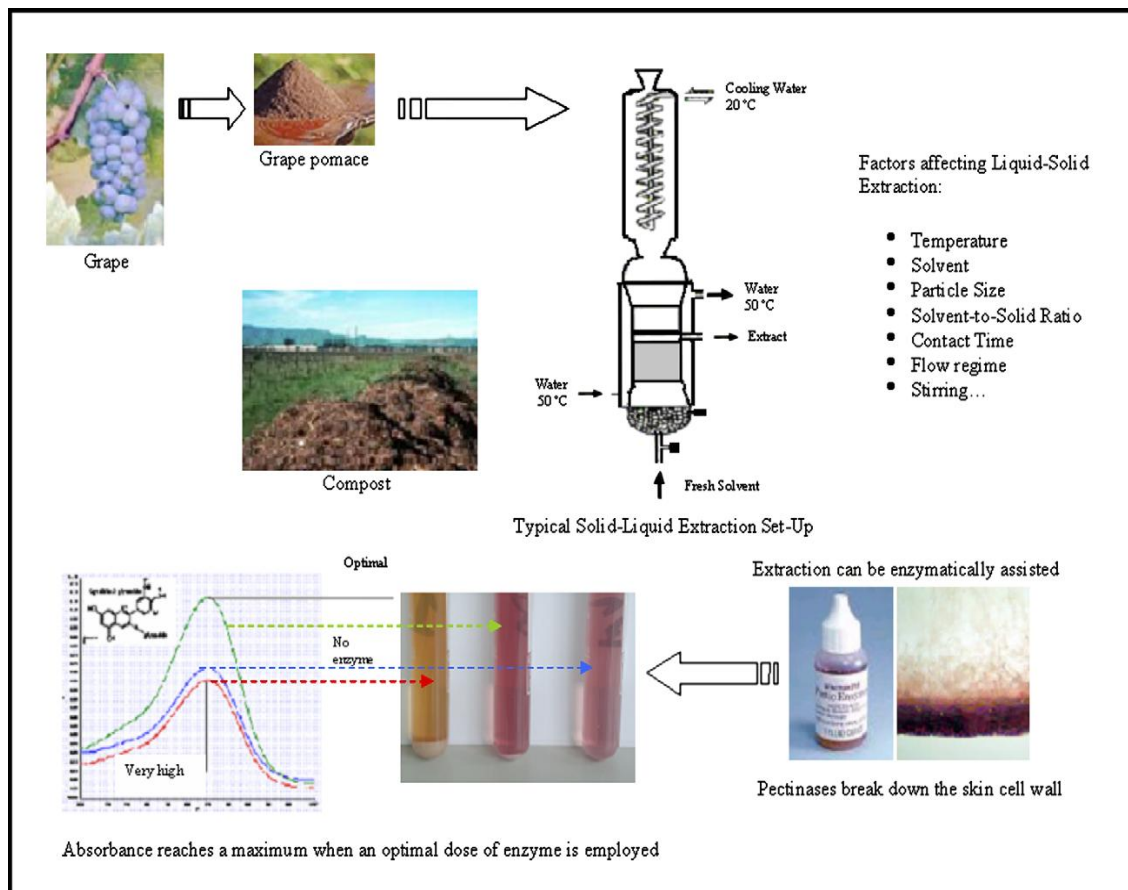
Παρακάτω αναφέρονται κάποιες από τις αρκετές μεθόδους εκχύλισης που έχουν χρησιμοποιηθεί για την παραλαβή φαινολικών ενώσεων.

- Εκχύλιση με 30 mL απεσταγμένου νερού, 40 mL διαλύματος αιθανόλης-νερού (10:90) και 5 g τρυγικού οξέος. (Pena et al,2007)
- Εκχύλιση με 70% διάλυμα ακετόνης (3X500 ml) στους 40°C σε περιστροφική συσκευή με μειωμένη πίεση και στη συνέχεια με εξάνιο (3X300 ml). (Lu & Foo,1997)
- Εκχύλιση με επίδραση HVED (high voltage electrical discharges) (40 KV) σε νωπά στέμφυλα, σε κατεψυγμένα στέμφυλα και σε στέμφυλα που προστέθηκε διοξειδίο του θείου, σε σταθερή θερμοκρασία 20-60°C. (Boussetta et al,2009)
- Εκχύλιση φαινολών με μεθανόλη (2 g δείγματος+20 mL μεθανόλης). Εκχύλιση ανθοκυανινών με διάλυμα 2% HCl σε μεθανόλη. (Chun Yi et al,2009)
- Εκχύλιση με ακετόνη, αιθυλακετόνη, αιθανόλη, νερό και/ή προσθήκη διοξειδίου του άνθρακα (στους 40°C & 60°C και πίεση 15 & 30 MPa). (Vatai et al,2009)
- Εκχύλιση με μεθανόλη & νερό για φλοιούς και σπόρια, με αιθανόλη & νερό για στέμφυλα. (Dopito et al,2007)
- Εκχύλιση με υδατικά διαλύματα αιθανόλης. 1^η Φάση με αιθανόλη (45°C & 60°C). 2^η Φάση με υδατικά διαλύματα αιθανόλης (10,20,30,40,50,60%) στους 60°C για 5 h. (Spigno et al,2007)
- Εκχύλιση με αιθανόλη & νερό (1:1) στους 70°C ή εφαρμογή ηλεκτρισμού (10 KV,8 KW) ή υψηλή υδροστατική πίεση (600 MPa) ή φυγοκεντρική εκχύλιση (35 KHz στους 70°C για 1 h). (Corrales et al,2008)
- Εκχύλιση με θειωμένο νερό (1 g/L) στους 60°C (Gomez-Plaza et al,2006)
- Εκχύλιση με μεθανόλη, ακετονιτρίλιο και ρεύμα αζώτου. Εκχύλιση με χλωροφόρμιο, χλωροφόρμιο-μεθανόλη (9:1), και μεθανόλη. (Cioffi et al,1010)
- Εκχύλιση με διάλυμα αιθανόλης, προσθήκη κιτρικού οξέος (1 g/L) και προσαρμογή στο επιθυμητό PH με NaOH 1N. (Karvela et al,2009)
- Εκχύλιση με 0,1% HCl σε μεθανόλη/ακετόνη/νερό (60/30/10). (Makris et al,2007)

2.2.2. Εκχύλιση με την βοήθεια ενζύμων

Πηκτινολυτικά και κυτταροπολυσακχαριτικά παρασκευάσματα ενζύμων έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανάκτηση των φαινολών από τα στέμφυλα. Πηκτινολυτικά ένζυμα χρησιμοποιούνται στην οινοποίηση κατά την διαδικασία της διαβροχής αλλά και κατά την διάρκεια της μεταποίησης και της διατήρησης και φαίνεται να έχουν θετική επίδραση στην συγκέντρωση των φαινολών και των ανθοκυανινών. Οι Pardo et al (1999) ανέφεραν αύξηση κατά 40% στην ποσότητα των ανθοκυανινών κατά την διάρκεια της οινοποίησης όταν χρησιμοποιήθηκαν πηκτινάσες, όπως και οι Bautista et al (2005) ανέφεραν σημαντικές διαφορές στην ποσότητα των ολικών φαινολών. Η ανάκτηση των φαινολών επηρεάζεται εκτός από το χρησιμοποιούμενο ένζυμο και από άλλους παράγοντες όπως ο χρόνος-θερμοκρασία επίδρασης του ενζύμου, η αναλογία ενζύμου υποστρώματος αλλά και το είδος της εκχύλισης. Κατά την ανάκτηση φαινολών από στέμφυλα όταν χρησιμοποιήθηκαν ένζυμα κατά την διάρκεια της εκχύλισης η συγκέντρωση των φαινολών κυμαίνονταν στα 6055 mg/L ισοδύναμα γαλλικού οξέος ενώ όταν δεν χρησιμοποιήθηκε ένζυμο η συγκέντρωση

των φαινολών ήταν σημαντικά μικρότερη (4615 mg/L ισοδύναμα γαλλικού οξέος) γεγονός που επιβεβαιώνει ότι η χρησιμοποίηση ενζύμου είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που βοηθούν στην ανάκτηση των φαινολών. Παρόλο που με την χρησιμοποίηση ενζύμων επιτυγχάνεται αύξηση της συγκέντρωσης των φαινολών που ανακτώνται από τα στέμφυλα κατά την εκχύλιση τους, από τα διαθέσιμα στοιχεία προκύπτει ότι μόνο το 5-10% κατά βάρος των φλοιών έχει υποβαθμιστεί, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο βαθμός των κυτταρικών πολυσακχαριτών είναι χαμηλός. Η επίδραση του ενζύμου επηρεάζεται αρνητικά από την παρουσία λιγνίνης και την παρουσία ferulate γι' αυτό και η καλύτερη γνώση για την επίδραση μεταξύ των κυτταρικών πολυσακχαριτών με την λιγνίνη αλλά και μια καλύτερη εικόνα για το πώς οι φαινόλες είναι ενσωματωμένες ή δεσμευμένες στο κυτταρικό τοίχωμα των σταφυλιών θα προετοιμάσει το έδαφος για την χρησιμοποίηση πιο συγκεκριμένων ενζύμων που θα πετύχουν μεγαλύτερη ανάκτηση φαινολών από τους φλοιούς των σταφυλιών. (Pinelo et al.2006)



Σχήμα 3: Τυπική συσκευή εκχύλισης στέμφυλων με την προσθήκη ή μη ενζύμων. (Pinelo et al,2006)

2.3.Προσδιορισμός ολικών φαινολών

Επειδή η έκφραση των αποτελεσμάτων του συνόλου των φαινολικών ενώσεων δεν είναι δυνατόν να γίνει σε μονάδες βάρους, επιβάλλεται ο προσδιορισμός ορισμένων δεικτών που θα εκφράζουν κατά συμβατικό τρόπο την ολική περιεκτικότητα των φαινολών.

2.3.1. Μέθοδος του υπερμαγγανικού οξέος (KMnO₄)

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος στηρίζεται στην οξείδωση των φαινολικών ενώσεων από το υπερμαγγανικό κάλιο, στην θερμοκρασία του περιβάλλοντος. Το τέλος της αντίδρασης σημειώνεται με την αλλαγή του χρώματος του δείκτη carmine-indigo, από το κυανούν στο κίτρινο. Ο δείκτης αυτός οξειδώνεται πριν από ορισμένα συστατικά του οίνου, αλλά μετά από τις φαινολικές ενώσεις. Η αλλαγή του χρώματός του συμπίπτει με το τέλος της οξείδωσης των φαινολικών ενώσεων, έτσι ώστε ν' αποφεύγεται παραπέρα κατανάλωση KMnO₄ για οξείδωση άλλων αδιάφορων συστατικών του οίνου.

Παρατηρήσεις

Ο δείκτης του KMnO₄ δεν αποτελεί ακριβή μέτρηση της περιεκτικότητας των ολικών φαινολών αλλά ενδεικτικό στοιχείο του μεγέθους αυτής, γιατί πολλοί παράγοντες παρεμβαίνουν στον προσδιορισμό του δείκτη:

- Η ποιότητα του carmin-indigo δεν είναι σταθερή.
- Η ταχύτητα προσδιορισμού επηρεάζει σημαντικά το τελικό αποτέλεσμα.
- Η διαπίστωση της αλλαγής του χρώματος είναι υποκειμενική.
- Ο τίτλος του KMnO₄ μεταβάλλεται πολύ γρήγορα, έτσι ώστε να απαιτείται καθημερινά νέα Παρασκευή του διαλύματος αυτού. (Σουφλερός, 1995)

2.3.2. Μέθοδος Folin-Ciocalteu

Αρχή της μεθόδου

Οι φαινολικές ενώσεις οξειδώνονται απ' το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu, που είναι μίγμα των οξέων φωσφοροβολφραμικό ($H_3PW_{12}O_{40}$) και φωσφορομολυβδενικό ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Κατά την οξείδωση των φαινολικών ενώσεων τα οξέα αυτά ανάγονται σ' ένα μίγμα, κυανών οξειδίων, του βολφραμίου (W_8O_{23}) και του μολυβδενίου (Mo_8O_{23}).

Ο παραγόμενος κυανούς χρωματισμός παρουσιάζει το μέγιστο της απορρόφησης στα 700-760 nm.

Η αντίδραση αυτή γίνεται σε αλκαλικό περιβάλλον και η ένταση του σχηματιζόμενου κυανού χρώματος είναι ανάλογη της ποσότητας των φαινολών. Ωστόσο το χρώμα αυτό δεν είναι σταθερό και εξελίσσεται σύμφωνα με το χρόνο: Στα πρώτα 30 min γίνεται κυανούν, ενώ στη συνέχεια περνάει στο βαθύ κυανούν.

Όπως προκύπτει από τα παραπάνω, για να είναι τα αποτελέσματά μας συγκρίσιμα, οι μετρήσεις της απορρόφησης πρέπει να γίνονται σε σταθερό χρόνο για όλα τα δείγματα.

Παρατηρήσεις

Η μέθοδος Folin-ciocalteu έχει μεγάλη πιστότητα αλλά απαιτεί υλικά και συσκευές που στοιχίζουν. (Σουφλερός, 1995)

2.3.3. Μέθοδος των ολικών πολυφαινολών (D.O.₂₈₀)

Αρχή της μεθόδου

Οι χαρακτηριστικοί βενζολικοί δακτύλιοι των φαινολικών ενώσεων παρουσιάζουν ισχυρή απορρόφηση στο υπεριώδες φως, το μέγιστο της οποίας παρατηρείται στα 280 nm.

Παρατηρήσεις

Ο δείκτης D_{280} ακολουθεί στενά τον δείκτη Folin-ciocalteu ωστόσο ο δείκτης Folin-ciocalteu είναι προτιμότερος γιατί είναι περισσότερο εξειδικευμένος στις φαινολικές ενώσεις και επιπλέον δεν απαιτεί φασματοφωτόμετρο U.V. που είναι αρκετά ακριβό. (Σουφλερός, 1995)

2.4. Αντιοξειδωτικές ουσίες

2.4.1. Αντιοξειδωτικές ουσίες και μηχανισμός δράσης τους

Ουσίες που προστίθενται στα τρόφιμα ώστε να επιβραδύνουν την οξείδωση και να καταστήσουν τα τρόφιμα εύληπτα για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

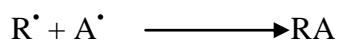
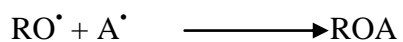
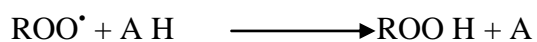
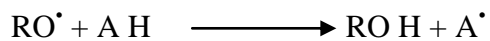
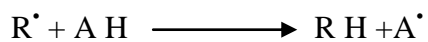
Μια αντιοξειδωτική ουσία πρέπει να συνδυάζει τις εξής ιδιότητες:

- α) Να είναι αποτελεσματική σε πολύ μικρή ποσότητα
- β) Να μην έχει καμιά βλαβερή επίδραση στην υγεία του ανθρώπου
- γ) Να μην προσδίδει στο τρόφιμο δυσάρεστη οσμή και γεύση
- δ) Να είναι λιποδιαλυτή
- ε) Να είναι όσο γίνεται σταθερή στα διάφορα στάδια επεξεργασίας του τροφίμου.

Τα πιο γνωστά αντιοξειδωτικά που χρησιμοποιούνται στην τεχνολογία των τροφίμων είναι:

1. Η βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη (BHA), μίγμα δύο ισομερών της 2-τρι-βούτυλο-4-μεθυλοφαινόλης και της 3-τρι-βούτυλο-4-μεθοξυφαινόλης
2. Το βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο (BHT): 2,6-δι-τρι-βούτυλο-παρακρεσόλη
3. Εστέρες του γαλλικού οξέος, όπως ο προπυλικός, οοκτυλικός και ο δωδεκυλικός
4. Η δι-τρι-βούτυλο-υδροκινόνη (TBHQ)

Τα φαινολικά αντιοξειδωτικά δρουν μέσω του μηχανισμού των ελευθέρων ριζών. Αντιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες και σχηματίζουν ενώσεις που δεν έχουν την τάση να δίνουν νέες ελεύθερες ρίζες, όπως φαίνεται παρακάτω:



Η δράση των φαινολικών αντιοξειδωτικών αυξάνεται όταν χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται συνέργεια ή συνεργισμός (synergism-synergistic). (Μπόσκου, 1986)

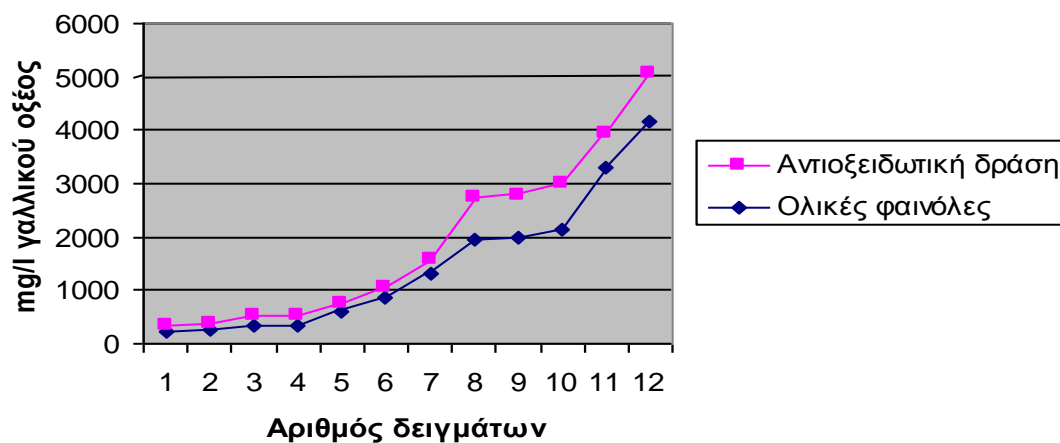
2.4.2.Αντιοξειδωτική δράση φαινολικών ουσιών

Η αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών ουσιών στους διάφορους οίνους είναι ανάλογη με την περιεκτικότητά τους όπως φαίνεται και στον παρακάτω πίνακα 3, και στο αντίστοιχο διάγραμμα 1. (Minussi et al,2003)

Πίνακας 3 : Ολικές φαινόλες και η αντιοξειδωτική τους δράση σε διάφορους οίνους

Οίνος	Ολικές φαινόλες	Αντιοξειδωτική δράση
Chardonnay (λευκός)	216	103
Carbenet Blanc (λευκός)	256	121
Blended (λευκός)	347	172
Rieslin g (λευκός)	353	165
Verdicchio (λευκός)	610	152
Greco di Tub (λευκός)	854	178
Blended (ροζέ)	1304	284
Blended (ερυθρός)	1947	808
Pinot (ερυθρός)	1984	807
Cabernet Sauvignon (ερυθρός)	2133	859
Barbera (ερυθρός)	3314	625
Monterpulciano (ερυθρός)	4177	868

Οι τιμές του πίνακα σε mg/L εκφρασμένες ως ισοδύναμα γαλλικού οξέος. (Minussi et al,2003)



Διάγραμμα 1: Σχέση μεταξύ ολικών φαινολών και αντιοξειδωτικής δράσης σε διάφορους οίνους. (Minussi et al,2003)

2.5. Μέθοδοι μέτρησης της αντιοξειδωτικής δράσης

2.5.1. Μέθοδος DPP H (1,1ΔΙΦΑΙΝΥΛΟ-2-ΠΙΚΡΥΛΟΥΔΡΑΖΥΛΟ)

Αρχή της μεθόδου: Οι φαινολικές ουσίες δεσμεύουν την ελεύθερη ρίζα DPP H και η μείωση της ελέγχεται με την μείωση της απορρόφησης στα 517 nm. Το χρώμα από μωβ στο αρχικό διάλυμα μετατρέπεται σε κίτρινο, όταν όλο το ποσό της ελεύθερης ρίζας DPP H έχει δεσμευτεί από τις αντιοξειδωτικές ουσίες.

2.5.2. Μέθοδος ABTS

Αρχή της μεθόδου: Η μέθοδος στηρίζεται στον αποχρωματισμό του ριζικού κατιόντος ABTS⁺, ο οποίος προκαλείται με την προσθήκη ενός δείγματος που περιέχει φαινολικό παράγοντα, λόγω της απομάκρυνσης των ελευθέρων ριζών.

Υπολογισμός: 0,1 mL δείγματος προστίθεται σε 3,9 mL διαλύματος ABTS (του αραιωμένου) και αφήνεται για 5-6 min σε σκοτεινό μέρος. Ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης στα 724 nm και τα αποτελέσματα εκφράζονται σε μM διαλύματος Trolox, που χρησιμοποιείται ως πρότυπο διάλυμα για την καμπύλη αναφοράς. (Xu et al,2010)

2.5.3.Αντιοξειδωτική δράση φαινολών του φλοιού και των σπόρων σταφυλιών

Οι φαινολικές ουσίες που συναντάμε στα σταφύλια όπως ήδη έχει αναφερθεί σε μεγάλο ποσοστό τις συναντάμε στον φλοιό τους και στα σπόρια τους. Η αντιοξειδωτική τους δράση μετρήθηκε με τις μεθόδους DPP H και ABTS και παρουσιάζονται στον πίνακα 4 για διάφορες ποικιλίες σταφυλιών. (Xu et al,2010)

Πίνακας 4: Αντιοξειδωτική δράση φαινολών του φλοιού και των σπόρων σταφυλιών

Ποικιλία	Φλοιός (DPPH)	Φλοιός (ABTS)	Σπόροι (DPPH)	Σπόροι (ABTS)
Black pearl	187	368	65	78
Sangye	275	507	107	164
Purple grape	136	168	52	76
Zuosanyi	152	192	77	120
Shuangyou	96	97	95	154
Kyoho	138	170	244	349
Cabernet	132	206	422	649
Noble	310	438	310	438
Fry	156	252	408	620

(Xu et al, 2010)

3. Σκοπός της εργασίας

Οι φαινολικές ουσίες του κόκκινου κρασιού θεωρούνται υπεύθυνες για την ευεργετική επίδραση του οίνου στην υγεία, κυρίως λόγω της αντιοξειδωτικής τους δράσης. Προέρχονται από τα στέμφυλα από τα οποία εκχυλίζονται ύστερα από παραμονή με το γλεύκος κατά το πρώτο στάδιο της οινοποίησης, και στη συνέχεια απορρίπτονται ως απόβλητα ή χρησιμοποιούνται για την παραγωγή αποστάγματος (τσίπουρο). Συνεπώς, σημαντικό ποσοστό των φαινολικών των στεμφύλων απορρίπτεται καθώς δεν εκχυλίζεται στο γλεύκος αλλά βρίσκεται παγιδευμένο στα κυτταρικά τοιχώματα των στεμφύλων. Για αυτόν το λόγο ένζυμα με υδρολυτική δράση στα πολυμερή των κυτταρικών τοιχωμάτων βελτιώνουν την ανάκτηση των φαινολικών συστατικών.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η βελτίωση της εκχύλισης φαινολικών συστατικών με αντιοξειδωτική δράση από στέμφυλα των ποικιλιών σταφυλής μοσχάτο και ξινόμαυρο που έχουν απορριφθεί από οινοποιείο με χρήση ενζύμων, ως προς το χρόνο εκχύλισης, το χρησιμοποιούμενο ένζυμο και την ποσότητα του ενζύμου.

Για την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας της εκχύλισης τα εκχυλισθέντα φαινολικά συστατικά προσδιορίζονται με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu και η αντιοξειδωτική δράση τους προσδιορίστηκε με το αντιδραστήριο DPPH.

Τα εμπορικά ενζυμικά παρασκευάσματα που χρησιμοποιήθηκαν, συστήνονται για χρήση σε διαφορετικά στάδια της οινοποιητικής διαδικασίας και σύμφωνα με τον κατασκευαστή έχει διαφορετική εξειδίκευση ως προς τη δράση του το καθένα:

Cellubrix L: κυτταρινάση

Pectinex SMASH XXL : πηκτινολύση

Novoferm 61 : πολυγαλακτουρονάση

Για την εκχύλιση δείγμα στεμφύλων ομογενοποιήθηκε, έγινε προσθήκη ύδατος και διαλυμάτων των ενζύμων και επώαση για 24 και 72 ώρες. Η προσθήκη των ενζύμων έγινε ώστε να επιτευχθεί η ίδια τελική συγκέντρωση πρωτεΐνης στα δείγματα.

4. Πειραματικό μέρος

4.1. Υλικά και μέθοδοι

4.1.1. Στέμφυλα

Η προμήθεια των στέμφυλων ως παραπροϊόν οينوποιητικής μονάδας ήταν ευγενική προσφορά της οινοποιίας Μπαμπατζιμόπουλος της Ν. Αγχιάλου του Νομού Θεσσαλονίκης. Αφορούσαν δύο ποικιλίες σταφυλιών, μοσχάτο και ξινόμαυρο, τα οποία τοποθετήθηκαν σε σακούλες πολυαιθυλενίου και συντηρήθηκαν, τα μεν στέμφυλα ποικιλίας μοσχάτου στο ψυγείο (4⁰C) ενώ τα στέμφυλα ποικιλίας ξινόμαυρου στην κατάψυξη (-18⁰C).

4.1.2. Αντιδραστήρια

Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην συγκεκριμένη εργασία ήταν αναλυτικής ή HPLC καθαρότητας.

4.1.3. Ένζυμα

Χρησιμοποιήθηκαν τα εμπορικά ενζυμικά παρασκευάσματα Pectinex Smash XXL, Cellubrix L και Novoferm 61 ευγενική προσφορά της Novozymes AG.

4.1.4. Όργανα

-Κλίβανος memmert για επίτευξη της θερμοκρασίας των 35⁰C στην οποία έγινε η εκχύλιση των στέμφυλων.

-Επιτραπέζια συσκευή ανάδευσης στην οποία τοποθετήθηκαν σε οριζόντια θέση οι σωλήνες με τα προς εκχύλιση δείγματα και ρυθμίστηκε στις 100 επαναλήψεις /λεπτό.

-Ομογενοποιητής οικιακού τύπου για την ομογενοποίηση των στέμφυλων με το διαλύτη (νερό) εκχύλισης, και τον διαμελισμό τους.

-Φυγόκεντρος Sigma-202C για φυγοκέντριση του αιωρήματος εκχύλισης στις 5000rpm για 5 min ώστε να επιτευχτεί ο διαχωρισμός της υγρής από την στερεή φάση.

-Φασματοφωτόμετρο UV-Vis για τις μετρήσεις της απορρόφησης στο επιθυμητό μήκος κύματος των μεθόδων για την μέτρηση των ολικών φαινολών και της αντιοξειδωτικής δράσης τους.

4.1.5. Εκχύλιση στέμφυλων (Δοκιμαστικά σχέδια πειράματος)

Επειδή από την βιβλιογραφία δεν προέκυψε κάποια μέθοδος εκχύλισης των στέμφυλων σε επίπεδο εργαστηρίου με διαλύτη το νερό και ταυτόχρονη προσθήκη ενζύμων, κρίθηκε σκόπιμο πριν την εφαρμογή κάποιας μεθόδου εκχύλισης να γίνουν κάποιες δοκιμές οι οποίες θα αποτελούσαν οδηγό για την εφαρμοζόμενη τελικά πειραματική διαδικασία εκχύλισης των στέμφυλων.

1^ο δοκιμαστικό σχέδιο πειράματος

-Ζυγίστηκαν 15 g στέμφυλων, στα οποία προστέθηκαν 50 mL νερού και ομογενοποιήθηκαν. Για την παραλαβή τους χρησιμοποιήθηκαν 30 mL νερού (15 mLx2) ώστε να ξεπλυθεί ο ομογενοποιητής και τελικά δημιουργήθηκε ένα αιώρημα που περιείχε 80 mL νερού και 15 g δείγματος.

-Από το αιώρημα αυτό παραλήφθηκαν 5 g και τοποθετήθηκαν σε σωλήνες με πώμα, στους οποίους προστέθηκαν τα διάφορα ένζυμα σε διάφορες ποσότητες.

Παρατήρηση: Με την διαδικασία που ακολουθήθηκε δεν επιτεύχθηκε παρόμοιο μέγεθος σωματιδίων του δείγματος καθώς και ομοιομορφία του δείγματος.

2^ο δοκιμαστικό σχέδιο πειράματος

-Ζυγίστηκαν 40 g στέμφυλων, στα οποία προστέθηκαν 100 mL νερού και ομογενοποιήθηκαν. Για την παραλαβή τους από τον ομογενοποιητή χρησιμοποιήθηκαν άλλα 100 mL νερού (50 mLx2) και τελικά δημιουργήθηκε ένα αιώρημα που περιείχε 200 mL νερού και 40 g δείγματος.

-Από το αιώρημα αυτό παραλήφθηκαν 8 g και τοποθετήθηκαν σε σωλήνες με πώμα, στους οποίους προστέθηκαν τα διάφορα ένζυμα σε ποσότητες 10 μ L και 500 μ L.

-Ακολούθησε απαέρωση (με άζωτο) για 15s.

-Έγινε εκχύλιση στους 35⁰C και σε δύο διαφορετικούς χρόνους (24 h και 72 h).

-Μετά τη εκχύλιση ακολούθησε φυγοκέντριση για τον διαχωρισμό της υγρής φάσης η οποία και παραλήφθηκε.

-Ακολούθησαν μετρήσεις για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολών με την μέθοδο Folin-Ciocalteu.

Παρατήρηση: Με την διαδικασία που ακολουθήθηκε κρίθηκε ότι η ποσότητα των 10 μ L ενζύμου είναι πολύ μικρή ώστε να χρησιμοποιηθεί κατά την διαδικασία της εκχύλισης.

4.1.6.Εκχύλιση στέμφυλων (ποικιλίας μοσχάτο)

Για την εκχύλιση των στέμφυλων ποικιλίας σταφυλιού μοσχάτου εφαρμόστηκε η παρακάτω πειραματική διαδικασία:

-Ζυγίστηκαν 40 g στέμφυλων, στα οποία προστέθηκαν 100 mL νερού και ομογενοποιήθηκαν. Για την παραλαβή τους από τον ομογενοποιητή χρησιμοποιήθηκαν άλλα 100 mL νερού (50 mLx2) και τελικά δημιουργήθηκε ένα αιώρημα που περιείχε 200 mL νερού και 40 g δείγματος.

-Από το αιώρημα αυτό παραλήφθηκαν 8 g και τοποθετήθηκαν σε σωλήνες με πώμα, στους οποίους προστέθηκαν τα διάφορα ένζυμα σε ποσότητες 50 μ L, 150 μ L και 500 μ L.

-Ακολούθησε απαέρωση (με άζωτο) για 15 s.

-Έγινε εκχύλιση στους 35⁰C και σε δύο διαφορετικούς χρόνους (24 h και 72 h), με συνεχή ανάδευση.

-Μετά τη εκχύλιση ακολούθησε φυγοκέντριση για τον διαχωρισμό της υγρής φάσης η οποία και παραλήφθηκε.

-Ακολούθησαν μετρήσεις για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολών με την μέθοδο Folin-Ciocalteu και μετρήσεις για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής τους δράσης με την μέθοδο DPPH.

4.1.7.Εκχύλιση στέμφυλων (ποικιλίας ξινόμαυρο)

Για την εκχύλιση των στέμφυλων ποικιλίας σταφυλιού ξινόμαυρου εφαρμόστηκε η παρακάτω πειραματική διαδικασία:

-Ζυγίστηκαν 40 g στέμφυλων, στα οποία προστέθηκαν 100 mL νερού και ομογενοποιήθηκαν. Για την παραλαβή τους από τον ομογενοποιητή χρησιμοποιήθηκαν άλλα 100 mL νερού (50 mLx2) και τελικά δημιουργήθηκε ένα αιώρημα που περιείχε 200 mL νερού και 40 g δείγματος.

-Από το αιώρημα αυτό παραλήφθηκαν 8 g και τοποθετήθηκαν σε σωλήνες με πώμα, στους οποίους προστέθηκαν τα διάφορα ένζυμα σε ποσότητες 50 μ L 100 μ L και 150 μ L από διαλύματα ενζύμων που παρασκευάστηκαν έτσι ώστε να περιέχουν όλα την ίδια ποσότητα πρωτεΐνης, με την διαδικασία που αναφέρεται στην επόμενη παράγραφο (4.1.8.)

-Ακολούθησε απαέρωση (με άζωτο) για 15s.

-Έγινε εκχύλιση στους 35⁰C και σε δύο διαφορετικούς χρόνους (24 h και 72 h), με συνεχή ανάδευση.

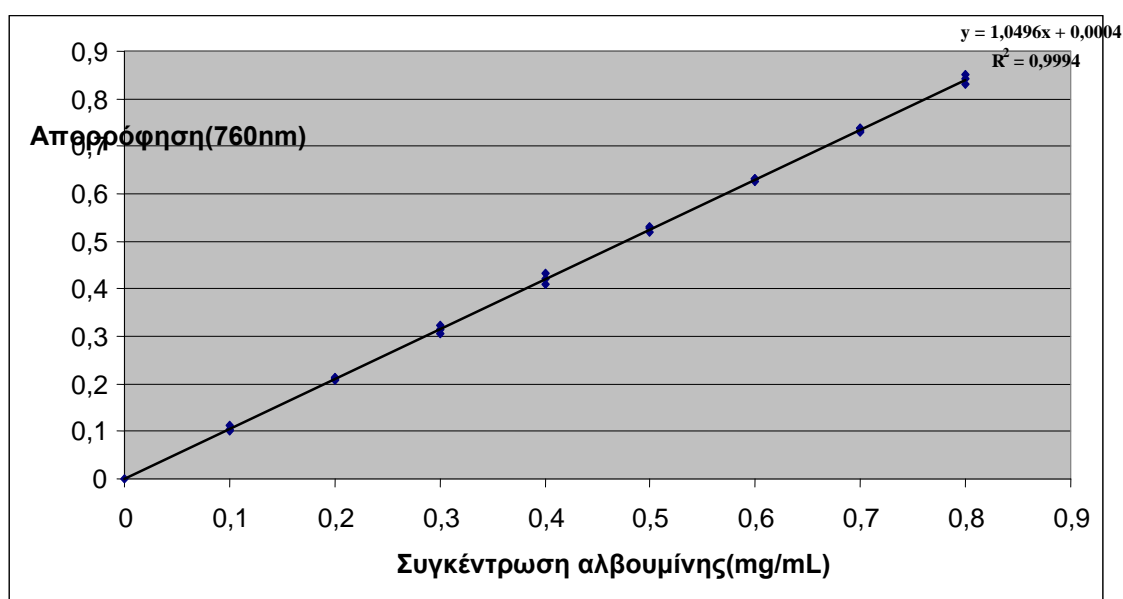
-Μετά τη εκχύλιση ακολούθησε φυγοκέντριση για τον διαχωρισμό της υγρής φάσης η οποία και παραλήφθηκε.

-Ακολούθησαν μετρήσεις για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολών με την μέθοδο Folin-Ciocalteu και μετρήσεις για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής τους δράσης με την μέθοδο DPPH.

4.1.8. Παρασκευή διαλυμάτων ενζύμων

Επειδή με την μέθοδο Folin-Ciocalteu εκτός από τις ολικές φαινόλες μετρείται και η ποσότητα των πρωτεϊνών, έπρεπε κάθε φορά να αφαιρείται η απορρόφηση που αφορούσε τις πρωτεΐνες. Για το λόγο αυτό αποφασίστηκε αντί για την χρησιμοποίηση των εμπορικών συσκευασμάτων ενζύμων να χρησιμοποιηθούν διαλύματα ενζύμων που περιέχουν την ίδια ποσότητα πρωτεΐνης έτσι ώστε όλα να έχουν την ίδια απορρόφηση. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για να γίνει αυτό αναφέρεται παρακάτω:

-Δημιουργήθηκε πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης, με διάλυμα αλβουμίνης (0 έως 0,8 mg/mL)



Διάγραμμα 2: Πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης για τον προσδιορισμό πρωτεϊνών

-Τα εμπορικά διαλύματα ενζύμων αραιώθηκαν με νερό έτσι ώστε να δίνουν απορρόφηση στα 760 nm μεταξύ 0,4 και 0,6 και με βάση τις τιμές $a=1,0496$ και $b=0,0004$ της πρότυπης καμπύλης παρασκευάστηκαν διαλύματα ενζύμων των 1,5 mL που όλα περιείχαν 10 mg πρωτεΐνης/ mL διαλύματος.

Έτσι προέκυψαν τα παρακάτω διαλύματα ενζύμων:

Διάλυμα ενζύμου Pectinex Smash XXL

898 μ L νερού + 602 μ L αραιωμένου εμπορικού σκευάσματος

Διάλυμα ενζύμου Cellubrix L

1410 μ L νερού + 90 μ L αραιωμένου εμπορικού σκευάσματος

Διάλυμα ενζύμου Novoferm 61

1155 μ L νερού + 345 μ L αραιωμένου εμπορικού σκευάσματος

4.2.Μέθοδοι ανάλυσης

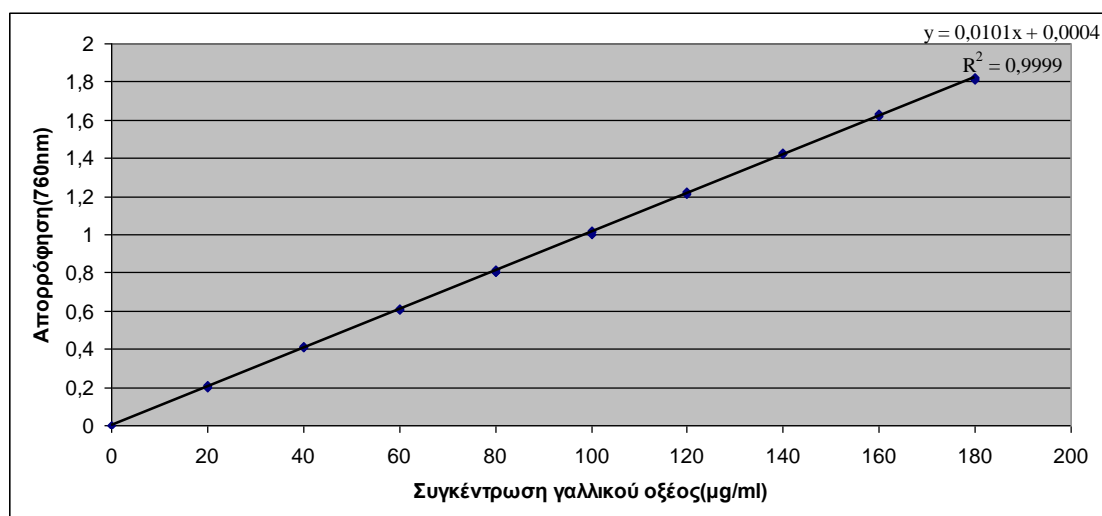
4.2.1.Προσδιορισμός ολικών φαινολών

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολών είναι η μέθοδος Folin-Ciocalteu.

Όργανα και υλικά

- Φασματοφωτόμετρο για μέτρηση στα 760 nm
- Κυψελίδες χαλαζία μήκους οπτικής διαδρομής 1 cm
- Ογκομετρική φιάλη των 100 mL
- Σιφόνια μεταφοράς των 10, 5, 1 mL
- Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu: Διατίθεται στο εμπόριο (Merck) και παρασκευάζεται ως εξής: 100 g βολφραμικού νατρίου (tungstate de sodium) και 25 g μολυβδενικού νατρίου (molybdate de sodium) διαλύονται σε 700 mL αποσταγμένου νερού. Προστίθενται 50 mL H₃PO₄ 85%, 100 mL πυκνού HCl και φέρεται σε βρασμό για 10 ώρες, κάτω από κατακόρυφο ψυκτήρα. Στη συνέχεια προστίθενται 150 g θεικού λιθίου, μερικές σταγόνες βρωμίου και φέρεται πάλι σε βρασμό για 15 min. Το μίγμα ψύχεται και συμπληρώνεται ο όγκος του στο 1 L με αποσταγμένο νερό.
- Διάλυμα άνυδρου Na₂CO₃ 20%
- Διάλυμα CuSO₄, 5H₂O 1%
- Διάλυμα Τρυγικό K – Na 2%

1 mL δείγματος προστέθηκαν σε 0,5 mL διαλύματος Folin (Αραίωση 1:1) και μετά από έντονη ανάδευση αφήθηκαν για 5min σε σκοτεινό μέρος. Στην συνέχεια προστέθηκαν 5 mL του Solution 1 (Διάλυμα άνυδρου Na₂CO₃ 20%, Διάλυμα CuSO₄, 5H₂O 1%, Διάλυμα Τρυγικό K – Na 2%), έγινε έντονη ανάδευση, αφήθηκαν για 5 min σε σκοτεινό μέρος και τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο για 5 min στους 50⁰C. Τέλος μετά από ψύξη μετρήθηκε η απορρόφησή τους στα 760 nm. Με βάση την τιμή της απορρόφησης υπολογίστηκε η συγκέντρωση των ολικών φαινολών από πρότυπη καμπύλη με διάλυμα γαλλικού οξέος σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (από 0 έως 180 µg/mL, διάγραμμα 3)



Διάγραμμα 3: Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος για τον προσδιορισμό φαινολών

Διαδικασία προσδιορισμού

Σε δοκιμαστικό σωλήνα τοποθετούνται 1ml δείγματος και 0,5ml αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu(αραίωση 1:1), ακολουθεί έντονη ανάδευση και αφήνεται στο σκοτάδι για 10min. Ακολουθεί προσθήκη 5ml του διαλύματος 1(1ml διαλύματος $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1%+1ml διαλύματος τρυγικού K-Na 2%+98ml διαλύματος άνυδρου NaCO_3 20%), ακολουθεί έντονη ανάδευση και παραμονή σε ηρεμία για 20min. Στην συνέχεια τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους 50°C για 5min, ψύχεται και μετριέται η απορρόφηση σε μήκος κύματος 760nm.

Υπολογισμός

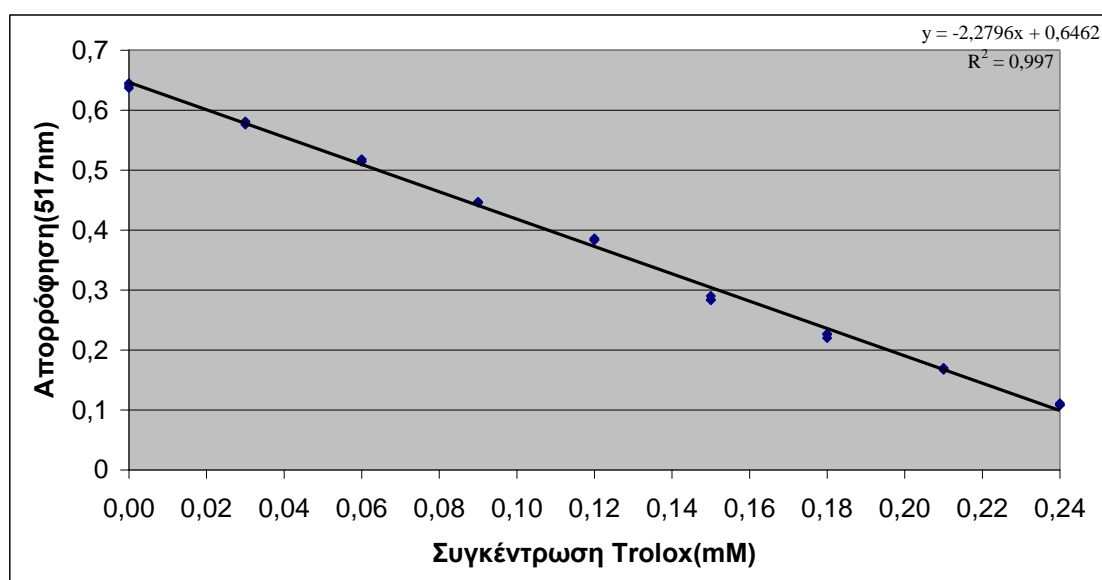
Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των φαινολικών κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη αναφοράς με διάλυμα γαλλικού οξέος($\mu\text{g/L}$) με μέτρηση της απορρόφησης διαφορετικών συγκεντρώσεων στα 760nm.

4.2.2. Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης φαινολών

Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης των φαινολών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος DPPH.

0,2 mL δείγματος προστέθηκαν σε 1,8 mL διαλύματος DPPH που παρασκευάστηκε από πυκνότερο διάλυμα (αραίωση με αιθανόλη) έτσι ώστε να δίνει απορρόφηση 0,7 στα 517 nm. Στην συνέχεια αφέθηκαν σε σκοτεινό μέρος για 30 min, αφού προηγήθηκε έντονη ανάδευση. Τέλος μετρήθηκε η απορρόφησή τους στα 517 nm.

Με βάση την τιμή της απορρόφησης υπολογίστηκε η αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών ενώσεων από πρότυπη καμπύλη με διάλυμα Trolox σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (από 0 έως 0,24 mM, διάγραμμα 4)



Διάγραμμα 4: Πρότυπη καμπύλη Trolox για τον προσδιορισμό αντιοξειδωτικής δράσης φαινολών

Παρασκευή διαλύματος DPPH: Ζυγίζονται 0,0197 g DPP H και διαλύονται με καθαρή αιθανόλη σε ογκομετρική φιάλη των 100ml. Από το παραπάνω αιθανολικό διάλυμα λαμβάνεται ορισμένη ποσότητα διαλύματος (5-6 ml) και αραιώνεται με καθαρή αλκοόλη έως ότου το διάλυμα δίνει απορρόφηση 0,7 στα 517 nm του φασματοφωτόμετρου.

Υπολογισμός: 0,2 mL του δείγματος προστίθεται σε 1,8 mL διαλύματος DPP H (του αραιωμένου) και αφήνεται για 30min σε σκοτεινό μέρος, αφού προηγηθεί έντονη ανάδευση. Ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης στα 517 nm. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε μM διαλύματος Trolox, που χρησιμοποιείται ως πρότυπο διάλυμα για την καμπύλη αναφοράς. (Xu et al, 2010)

5. Αποτελέσματα-Συζήτηση

Οι μετρήσεις ολικών φαινολών και μέτρησης αντιοξειδωτικής δράσης που πραγματοποιήθηκαν υποβλήθηκαν σε στατιστικό έλεγχο, Analysis of Variance (ANOVA) και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους Πίνακες 5, 6, 7 και 8.

Πίνακας 5: Τιμές P για τους παράγοντες και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους για τη μέτρηση των ολικών φαινολών.

Παράγοντας	P
Ποικιλία	<0,001
Χρόνος	<0,001
Ένζυμο	<0,001
Ποσότητα ενζύμου	<0,001
Ποικιλία *Χρόνος	<0,001
Ποικιλία *Ένζυμο	<0,001
Ποικιλία *Ποσότητα ενζύμου	<0,001
Χρόνος*Ένζυμο	<0,001
Χρόνος*Ποσότητα ενζύμου	<0,001
Ένζυμο*Ποσότητα ενζύμου	<0,001
Κρασί*Χρόνος*Ένζυμο	<0,001
Κρασί*Χρόνος*Ποσότητα ενζύμου	<0,001
Κρασί*Ένζυμο*Ποσότητα ενζύμου	<0,001
Χρόνος*Ένζυμο*Ποσότητα ενζύμου	<0,001
Κρασί*Χρόνος*Ένζυμο*Ποσότητα	<0,001

Σύμφωνα με τις τιμές P που φαίνονται στον Πίνακα 5, όλοι οι κύριοι παράγοντες και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους είναι στατιστικά σημαντικοί.

Πίνακας 6: Μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις για την μέτρηση των ολικών φαινολών (μg/L ισοδύναμα γαλλικού οξέος).

Mean ± stdev

	Μοσχάτο	Ένζυμο					
		Cellubrix		Novoferm		Pectinex	
		Χρόνος:		24 h	72 h	24 h	72 h
Ποσότητα (μL)	0	21,914 ± 0,114 s	24,983 ± 0,936 S	21,914 ± 0,114 s	24,983 ± 0,936 s	21,914 ± 0,114 s	24,983 ± 0,936 s
	50	31,023 ± 1,181 q,r	40,743 ± 0,880 P	29,571 ± 0,618 r	54,488 ± 0,400 p	33,069 ± 0,700 q	36,898 ± 1,692
	150	55,677 ± 0,343 m,n	55,875 ± 0,748 m,n	45,017 ± 0,545 o	69,505 ± 1,443 n	46,040 ± 0,714 o	45,512 ± 0,206 o
	500	68,94 ± 4,06 j,k,l	71,122 ± 0,560 J	58,399 ± 0,630 m	71,023 ± 1,307 J,k	55,842 ± 0,893 m,n	66,073 ± 0,659 l

	Ξινόμαυρο	Ένζυμο					
		Cellubrix		Novoferm		Pectinex	
		Χρόνος:	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h
Ποσότητα	0	68,350 ± 1,059 j,k,l	67,459 ± 0,920 k,l	68,350 ± 1,059 j,k,l	67,459 ± 0,920 k,l	68,350 ± 1,059 j,k,l	67,459 ± 0,920 k,l
(μL)	50	98,416 ± 0,865 h,i	99,175 ± 0,498 H	102,61 ± 0,468 g	101,32 ± 0,824 g,h	95,677 ± 0,702 i	95,941 ± 0,524 i
	100	127,06 ± 0,348 d	127,23 ± 0,396 D	138,91 ± 0,560 b	137,82 ± 0,693 b,c	121,39 ± 0,980 f	123,60 ± 0,249 e,f
	150	136,14 ± 1,04 b,c	135,35 ± 0,786 C	146,77 ± 0,898 a	145,74 ± 0,594 a	125,97 ± 0,750 d,e	128,09 ± 0,659 d

Οι μέσοι όροι που δεν μοιράζονται το ίδιο γράμμα, διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους.

Όπως προκύπτει από τον πίνακα 6 το ξινόμαυρο δίνει μεγαλύτερες ποσότητες φαινολικών ουσιών. Το γράμμα a υπάρχει στον συνδυασμό 150 μL τόσο στις 24 h όσο και στις 72 h, στο ένζυμο Novoferm. Αλλά και κάθε συνδυασμός του ξινόμαυρου δίνει μεγαλύτερη περιεκτικότητα από την αντίστοιχη του Μοσχάτου.

Στην ποικιλία Μοσχάτο με ποσότητα ενζύμου 500 μL και χρόνο εκχύλισης 72 h, μεγαλύτερη ποσότητα φαινολικών ουσιών δίνουν το ένζυμο Cellubrix το οποίο όμως δεν διαφέρει στατιστικά από το ένζυμο Novoferm διαφέρουν όμως και τα 2 από το ένζυμο Pectinex.

Πίνακας 7: Τιμές P για τους παράγοντες και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους για την μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης.

Παράγοντας	P
Ποικιλία	<0,001
Χρόνος	<0,001
Ένζυμο	<0,001
Ποσότητα ενζύμου	<0,001
Ποικιλία *Χρόνος	<0,001
Ποικιλία *Ένζυμο	<0,001
Ποικιλία *Ποσότητα ενζύμου	<0,001
Χρόνος*Ένζυμο	<0,001
Χρόνος*Ποσότητα ενζύμου	<0,001
Ένζυμο*Ποσότητα ενζύμου	<0,001
Κρασί*Χρόνος*Ένζυμο	<0,001
Κρασί*Χρόνος*Ποσότητα ενζύμου	<0,001
Κρασί*Ένζυμο*Ποσότητα ενζύμου	<0,001
Χρόνος*Ένζυμο*Ποσότητα ενζύμου	<0,001
Κρασί*Χρόνος*Ένζυμο*Ποσότητα	<0,001

Σύμφωνα με τις τιμές P που φαίνονται στον Πίνακα 7, όλοι οι κύριοι παράγοντες και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους είναι στατιστικά σημαντικοί.

Πίνακας 8: Μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις για την μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης (μM ισοδύναμα Trolox)

Mean \pm stdev

Μοσχάτο		Ένζυμο					
		Cellubrix		Novoferm		Pectinex	
Ποσότητα	Χρόνος:	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h
		0	0,04600 \pm 0,00257 u	0,05434 \pm 0,00285 U	0,04600 \pm 0,00257 u	0,05434 \pm 0,00285 u	0,04600 \pm 0,00257 u
(μL)	50	0,09996 \pm 0,00473 r,s	0,10990 \pm 0,00299 p,q,r	0,10076 \pm 0,00527 q,r,s	0,16927 \pm 0,00680 h,i,j	0,10815 \pm 0,00584 q,r	0,11604 \pm 0,00177 p,q
	150	0,15626 \pm 0,00244 j,k,l,m	0,18638 \pm 0,00713 e,f,g	0,12350 \pm 0,00584 p	0,14119 \pm 0,01060 n,o	0,13798 \pm 0,00953 o	0,15114 \pm 0,00242 l,m,n,o
	500	0,17600 \pm 0,00418 f,g,h	0,18930 \pm 0,00308 d,e,f	0,16605 \pm 0,00592 h,i,j,k	0,18930 \pm 0,00378 d,e,f	0,16167 \pm 0,00545 i,j,k,l	0,17307 \pm 0,00242 g,h,i

Ξινόμαυρο		Ένζυμο					
		Cellubrix		Novoferm		Pectinex	
Ποσότητα	Χρόνος:	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h
		0	0,08153 \pm 0,00422 t	0,087676 \pm 0,000253 s,t	0,08153 \pm 0,00422 T	0,087676 \pm 0,000253 s,t	0,08153 \pm 0,00422 t
(μL)	50	0,14777 \pm 0,00242 m,n,o	0,15245 \pm 0,000913 k,l,m,n	0,15348 \pm 0,00249 k,l,m,n	0,15991 \pm 0,00141 i,j,k,l,m	0,14894 \pm 0,00755 l,m,n,o	0,14894 \pm 0,00154 l,m,n,o
	100	0,18565 \pm 0,00316 f,g	0,18872 \pm 0,00116 d,e,f	0,20685 \pm 0,00225 b,c	0,21226 \pm 0,00183 a,b,c	0,18609 \pm 0,00432 e,f,g	0,18755 \pm 0,00221 e,f
	150	0,20144 \pm 0,00288 c,d	0,20378 \pm 0,00110 c	0,22045 \pm 0,00183 a,b	0,22220 \pm 0,00264 a	0,19968 \pm 0,00307 c,d,e	0,20159 \pm 0,00166 c,d

Μέσοι όροι που δεν μοιράζονται το ίδιο γράμμα, διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους.

Όπως προκύπτει από τον πίνακα 8 η μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση παρατηρείται στο χρόνο εκχύλισης 72 h με ποσότητα ενζύμου 150 μL στην ποικιλία ξινόμαυρο, όταν χρησιμοποιούμε το ένζυμο Novoferm. Η αντιοξειδωτική δραστηριότητα αυτή δεν διαφέρει στατιστικά από την αντίστοιχη με 24 εκχύλιση και από την αντίστοιχη με 150 μL ποσότητας ενζύμου.

Στο ξινόμαυρο παρατηρείται ότι έχουμε μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση σε όλα τα επίπεδα παραγόντων από τα αντίστοιχα του Μοσχάτου. Στο Μοσχάτο η μεγαλύτερη

αντιοξειδωτική δραστηριότητα εμφανίζεται σε ποσότητα 500 μL , χρόνο εκχύλισης 72 h και είναι ίδια μεταξύ των ενζύμων Cellubrix και Novoferm.

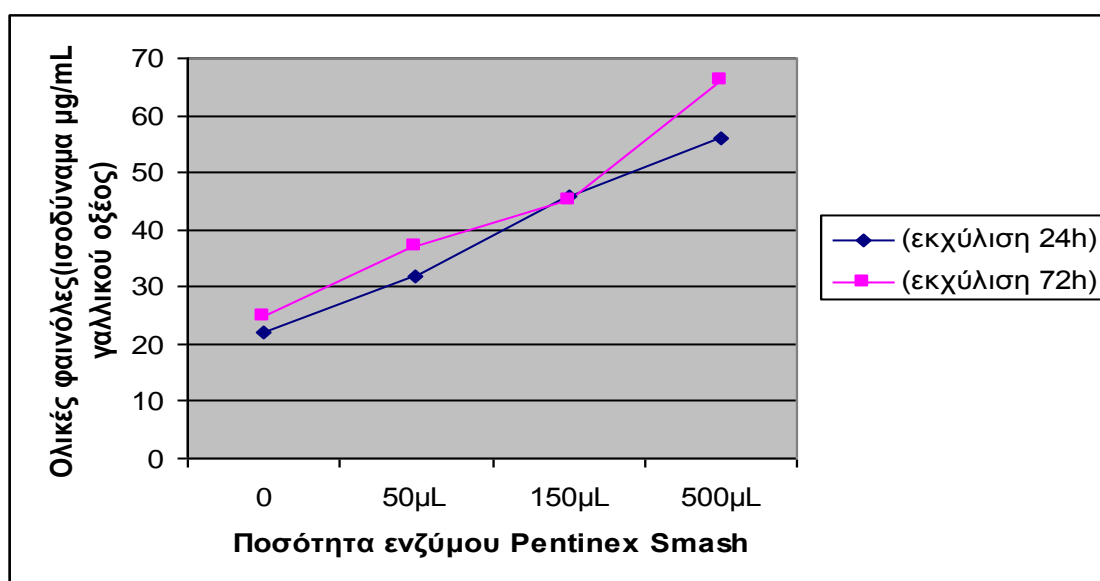
5.1. Εκχύλιση στέμφυλων (π.Μοσχάτο) με ένζυμο Pectinex Smash XXL

Η εκχύλιση έγινε με την μέθοδο που περιγράφηκε (4.1.6.) στους 35°C για 24 h και 72 h με την προσθήκη 50 μL , 150 μL , 500 μL ενζύμου Pectinex Smash XXL και νερό ως διαλύτη. Ακολούθησαν οι μετρήσεις για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολών και της αντιοξειδωτικής τους δράσης.

5.1.1. Προσδιορισμός ολικών φαινολών

Ο προσδιορισμός των ολικών φαινολών έγινε με την μέθοδο Folin-Ciocalteu (4.2.1.). Μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στα 760nm και αφαιρέθηκε η απορρόφηση που αφορούσε τις πρωτεΐνες έτσι ώστε η διαφορά απορρόφησης να αφορά τις ολικές φαινόλες.

Με βάση τις απορροφήσεις που αφορούν τις ολικές φαινόλες από την πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος και με βάση την εξίσωση $y=0,0101 x+0,0004$ προσδιορίστηκε η ποσότητα των ολικών φαινολών εκφρασμένη σε $\mu\text{g}/\text{mL}$ γαλλικού οξέος και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο διάγραμμα 5.

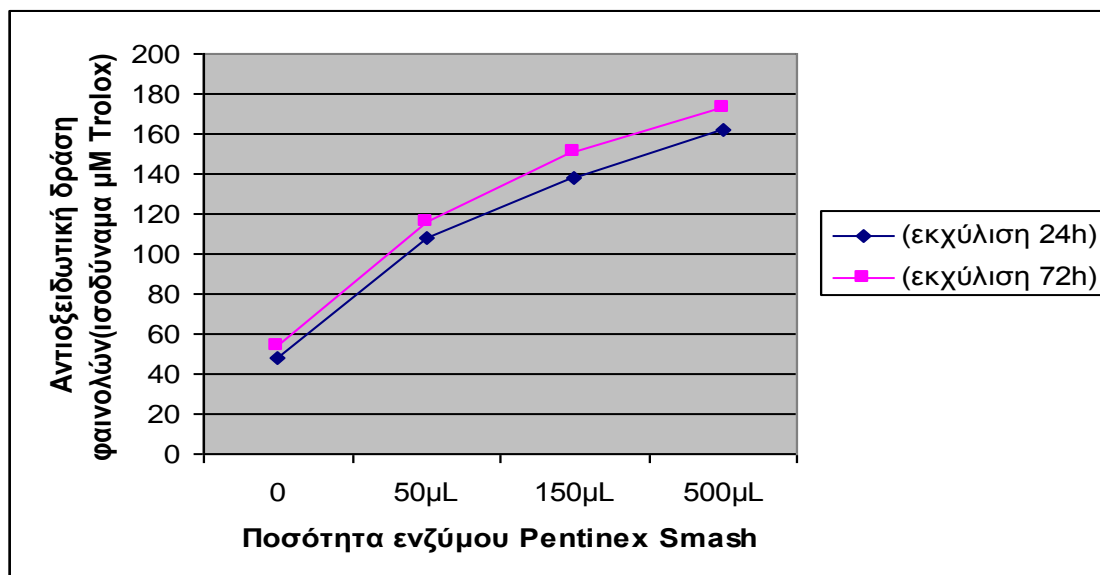


Διάγραμμα 5: Ολικές φαινόλες της εκχύλισης στέμφυλων (π.Μοσχάτο) με ένζυμο Pectinex Smash XXL για 24 h & 72 h.

Στο διάγραμμα αυτό φαίνεται η επίδραση της ποσότητας του ενζύμου Pectinex και του χρόνου εκχύλισης στις ολικές φαινόλες της ποικιλίας μοσχάτο. Παρατηρούμε ότι αύξηση της ποσότητας του ενζύμου προκαλεί αύξηση των ολικών φαινολών ενώ με την παράταση της εκχύλισης από 24 ώρες σε 72 δεν εμφανίζεται στατιστικώς σημαντική αύξηση των εκχυλιζόμενων ολικών φαινολών εκτός από την προσθήκη 500 μL .

5.1.2. Αντιοξειδωτική δράση

Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των φαινολικών ουσιών έγινε με τη μέθοδο DPP H (4.2.2.). Μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στα 517 nm και με βάση τις απορροφήσεις, από την πρότυπη καμπύλη Trolox και μέσω της εξίσωσης $y = -2,2796x + 0,6462$ προσδιορίστηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των φαινολών και εκφράστηκε σε μM Trolox (διάγραμμα 6).



Διάγραμμα 6: Αντιοξειδωτική δράση φαινολών της εκχύλισης στέμφυλων (π.Μοσχάτο) με ένζυμο Pectinex Smash XXL για 24 h & 72 h.

Στο διάγραμμα αυτό φαίνεται η αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών ουσιών που προκύπτει από το ένζυμο Pectinex της ποικιλίας μοσχάτο. Παρατηρείται ότι αντίστοιχα με τις ολικές φαινόλες, η αύξηση της ποσότητας του ενζύμου προκαλεί αύξηση ενώ με την παράταση της εκχύλισης από 24 ώρες σε 72 δεν εμφανίζεται στατιστικώς σημαντική αύξηση.

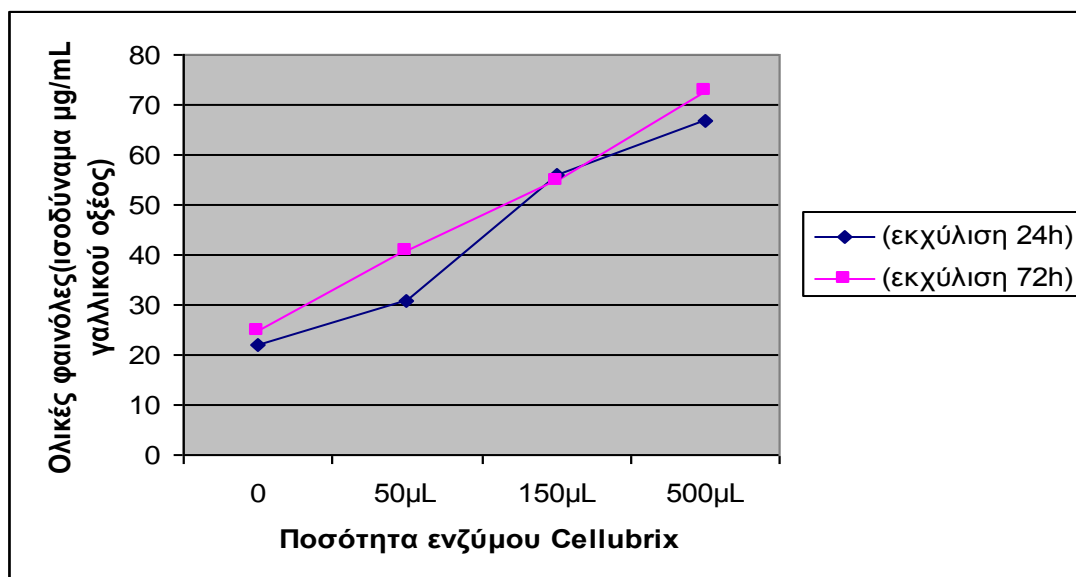
5.2.Εκχύλιση στέμφυλων (π.Μοσχάτο) με ένζυμο Cellubrix L

Η εκχύλιση έγινε με την μέθοδο που περιγράφηκε (4.1.6.) στους 35⁰C για 24 h και 72 h με την προσθήκη 50 μL, 150 μL, 500 μL ενζύμου Cellubrix L και νερό ως διαλύτη. Ακολούθησαν οι μετρήσεις για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολών και της αντιοξειδωτικής τους δράσης.

5.2.1.Προσδιορισμός ολικών φαινολών

Ο προσδιορισμός των ολικών φαινολών έγινε με την μέθοδο Folin-Ciocalteu (4.2.1.).Μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στα 760nm και αφαιρέθηκε η απορρόφηση που αφορούσε τις πρωτεΐνες έτσι ώστε η διαφορά απορρόφησης να αφορά τις ολικές φαινόλες.

Με βάση τις απορροφήσεις που αφορούν τις ολικές φαινόλες από την πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος και με βάση την εξίσωση $y=0,0101x+0,0004$ προσδιορίστηκε η ποσότητα των ολικών φαινολών εκφρασμένη σε μg/ mL γαλλικού οξέος και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο διάγραμμα 7.

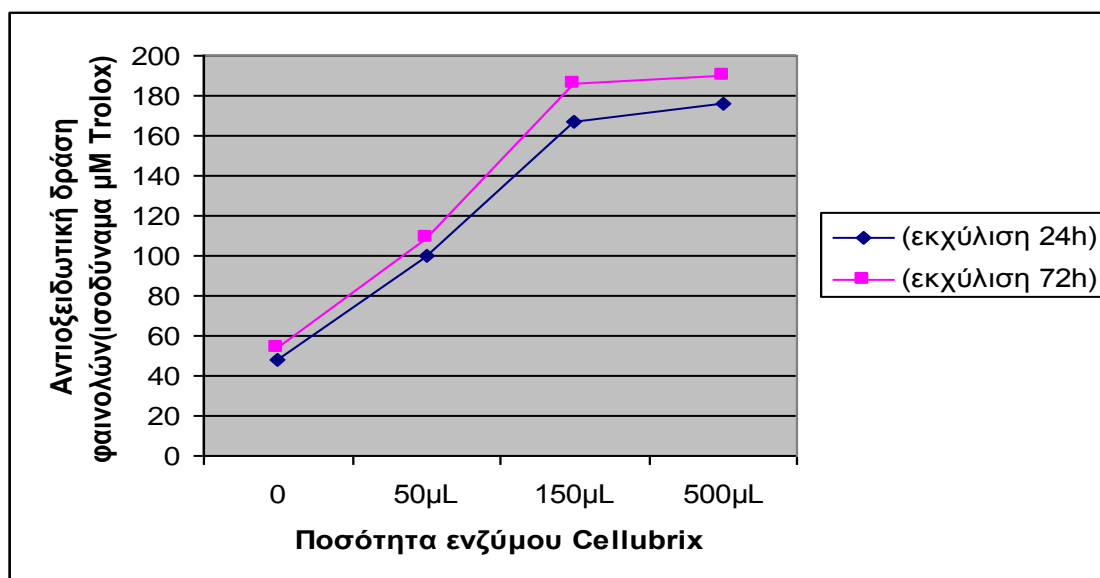


Διάγραμμα 7: Ολικές φαινόλες της εκχύλισης στέμφυλων (π.Μοσχάτο) με ένζυμο Cellubrix L για 24 h & 72 h.

Στο διάγραμμα αυτό φαίνεται η επίδραση της ποσότητας του ενζύμου Cellubrix και του χρόνου εκχύλισης στις ολικές φαινόλες της ποικιλίας μοσχάτο. Παρατηρείται ότι αύξηση της ποσότητας του ενζύμου προκαλεί αύξηση ενώ με την παράταση της εκχύλισης από 24 ώρες σε 72 μόνο μικρή στατιστικώς σημαντική αύξηση των εκχυλιζόμενων ολικών φαινολών.

5.2.2. Αντιοξειδωτική δράση φαινολών

Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των φαινολικών ουσιών έγινε με τη μέθοδο DPP H (4.2.2.). Μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στα 517 nm και με βάση τις απορροφήσεις, από την πρότυπη καμπύλη Trolox και μέσω της εξίσωσης $y = -2,2796x + 0,6462$ προσδιορίστηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των φαινολών και εκφράστηκε σε μM Trolox (διάγραμμα 8).



Διάγραμμα 8: Αντιοξειδωτική δράση φαινολών της εκχύλισης στέμφυλων (π.Μοσχάτο) με ένζυμο Cellubrix για 24 h & 72 h.

Στο διάγραμμα αυτό φαίνεται η αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών ουσιών που προκύπτει από το ένζυμο Cellubrix της ποικιλίας μοσχάτο. Παρατηρείται ότι αύξηση της ποσότητας του ενζύμου προκαλεί αύξηση μέχρι την προσθήκη 150 μL , ενώ με την παράταση της εκχύλισης από 24 ώρες σε 72 δεν εμφανίζεται στατιστικώς σημαντική αύξηση της αντιοξειδωτικής δράσης.

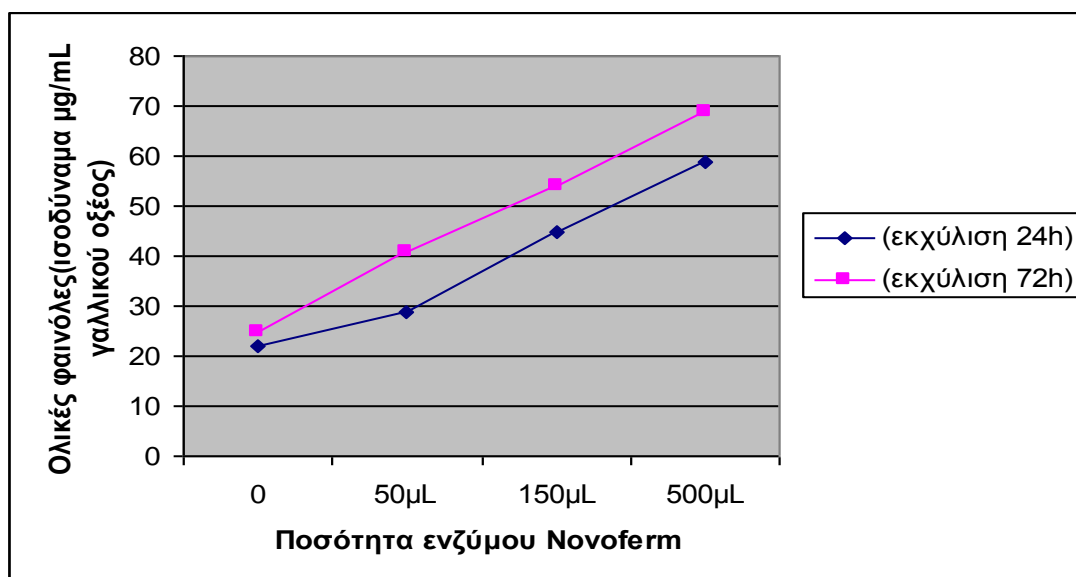
5.3.Εκχύλιση στέμφυλων (π.Μοσχάτο) με ένζυμο Novoferm 61.

Η εκχύλιση έγινε με την μέθοδο που περιγράφηκε (4.1.6.) στους 35°C για 24 h και 72 h με την προσθήκη 50 μL , 150 μL , 500 μL ενζύμου Novoferm 61 και νερό ως διαλύτη. Ακολούθησαν οι μετρήσεις για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολών και της αντιοξειδωτικής τους δράσης.

5.3.1.Προσδιορισμός ολικών φαινολών

Ο προσδιορισμός των ολικών φαινολών έγινε με την μέθοδο Folin-Ciocalteu (4.2.1.).Μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στα 760nm και αφαιρέθηκε η απορρόφηση που αφορούσε τις πρωτεΐνες έτσι ώστε η διαφορά απορρόφησης να αφορά τις ολικές φαινόλες.

Με βάση τις απορροφήσεις που αφορούν τις ολικές φαινόλες από την πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος και με βάση την εξίσωση $y=0,0101x+0,0004$ προσδιορίστηκε η ποσότητα των ολικών φαινολών εκφρασμένη σε $\mu\text{g}/\text{mL}$ γαλλικού οξέος και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο διάγραμμα 9.

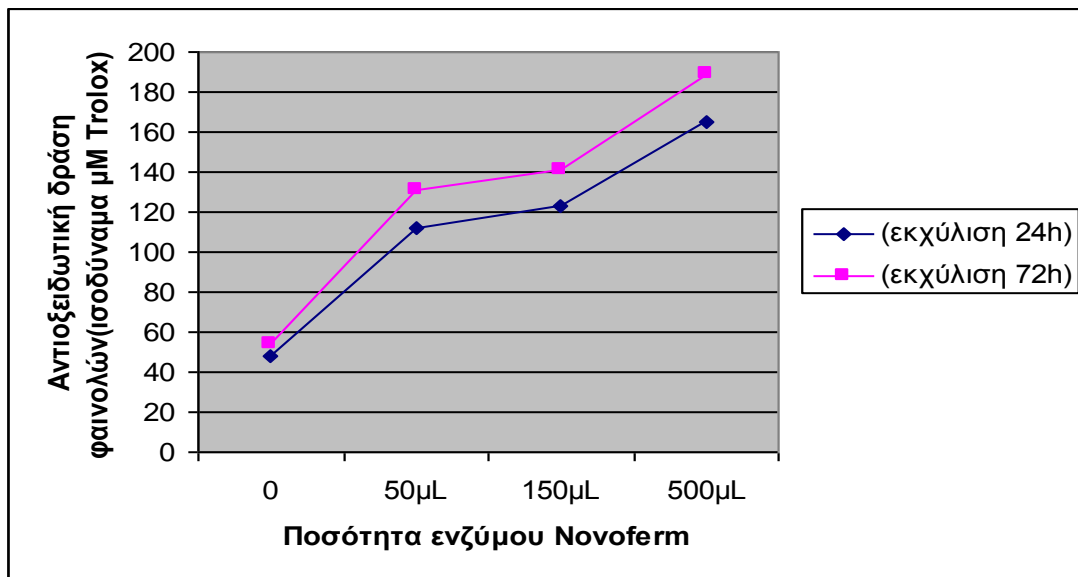


Διάγραμμα 9: Ολικές φαινόλες της εκχύλισης στέμφυλων (π.Μοσχάτο) με ένζυμο Novoferm 61 για 24 h & 72 h.

Στο διάγραμμα αυτό φαίνεται η επίδραση της ποσότητας του ενζύμου Novoferm και του χρόνου εκχύλισης στις ολικές φαινόλες της ποικιλίας μοσχάτο. Παρατηρείται ότι αύξηση της ποσότητας του ενζύμου προκαλεί αύξηση ενώ με την παράταση της εκχύλισης από 24 ώρες σε 72 εμφανίζεται μόνο μικρή στατιστικώς σημαντική αύξηση.

5.3.2. Αντιοξειδωτική δράση φαινολών

Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των φαινολικών ουσιών έγινε με τη μέθοδο DPP H (4.2.2.). Μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στα 517 nm και με βάση τις απορροφήσεις, από την πρότυπη καμπύλη Trolox και μέσω της εξίσωσης $y=-2,2796x+0,6462$ προσδιορίστηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των φαινολών και εκφράστηκε σε μM Trolox (διάγραμμα 10).



Διάγραμμα 10: Αντιοξειδωτική δράση φαινολών της εκχύλισης στέμφυλων (π.Μοσχάτο) με ένζυμο Novoferm 61 για 24 h & 72 h.

Στο διάγραμμα αυτό φαίνεται η αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών ουσιών που προκύπτει από το ένζυμο Novoferm της ποικιλίας μοσχάτο. Παρατηρείται ότι αύξηση της ποσότητας του ενζύμου προκαλεί αύξηση ενώ με την παράταση της εκχύλισης από 24 ώρες σε 72 εμφανίζεται μόνο μικρή στατιστικώς σημαντική αύξηση.

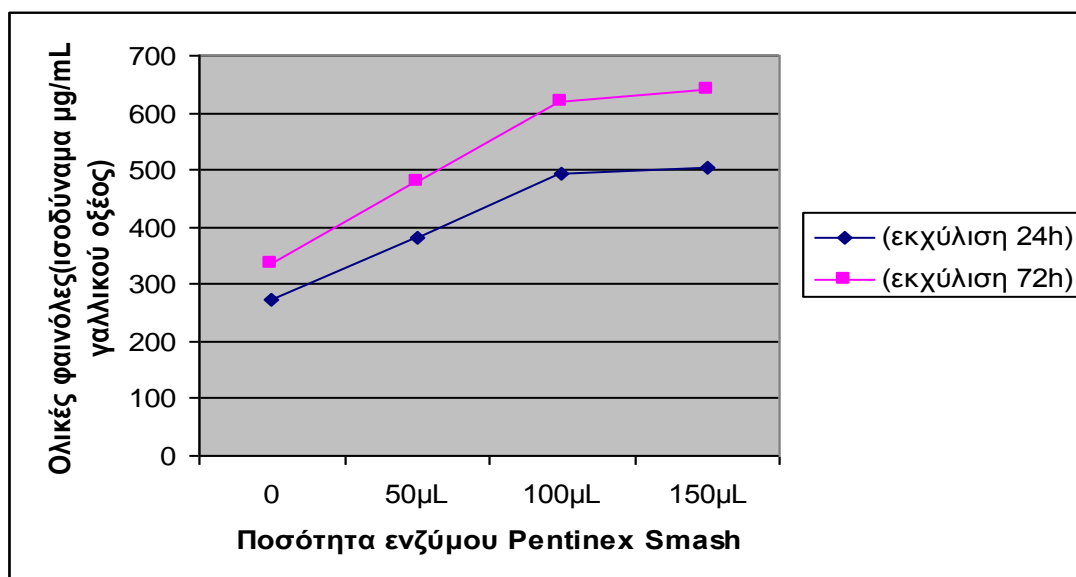
5.4.Εκχύλιση στέμφυλων (π.Ξινόμαυρο) με ένζυμο Pectinex Smash XXL

Η εκχύλιση έγινε με την μέθοδο που περιγράφηκε (4.1.6.) στους 35°C για 24 h και 72 h με την προσθήκη 50 μL, 100 μL, 150 μL ενζύμου Pectinex Smash XXL και νερό ως διαλύτη. Ακολούθησαν οι μετρήσεις για τον προσδιορισμό των ολικών φαινόλων και της αντιοξειδωτικής τους δράσης.

5.4.1.Προσδιορισμός ολικών φαινόλων

Ο προσδιορισμός των ολικών φαινόλων έγινε με την μέθοδο Folin-Ciocalteu (4.2.1.).Μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στα 760nm και αφαιρέθηκε η απορρόφηση που αφορούσε τις πρωτεΐνες έτσι ώστε η διαφορά απορρόφησης να αφορά τις ολικές φαινόλες.

Με βάση τις απορροφήσεις που αφορούν τις ολικές φαινόλες από την πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος και με βάση την εξίσωση $y=0,0101x+0,0004$, και λαμβάνοντας υπόψη ότι έγινε αραιώση των προς μέτρηση δειγμάτων 1:4 για όσα εκχυλίστηκαν 24 h και αραιώση 1:5 για όσα εκχυλίστηκαν 72 h, προσδιορίστηκε η ποσότητα των ολικών φαινόλων εκφρασμένη σε μg/ mL γαλλικού οξέος και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο διάγραμμα 11.

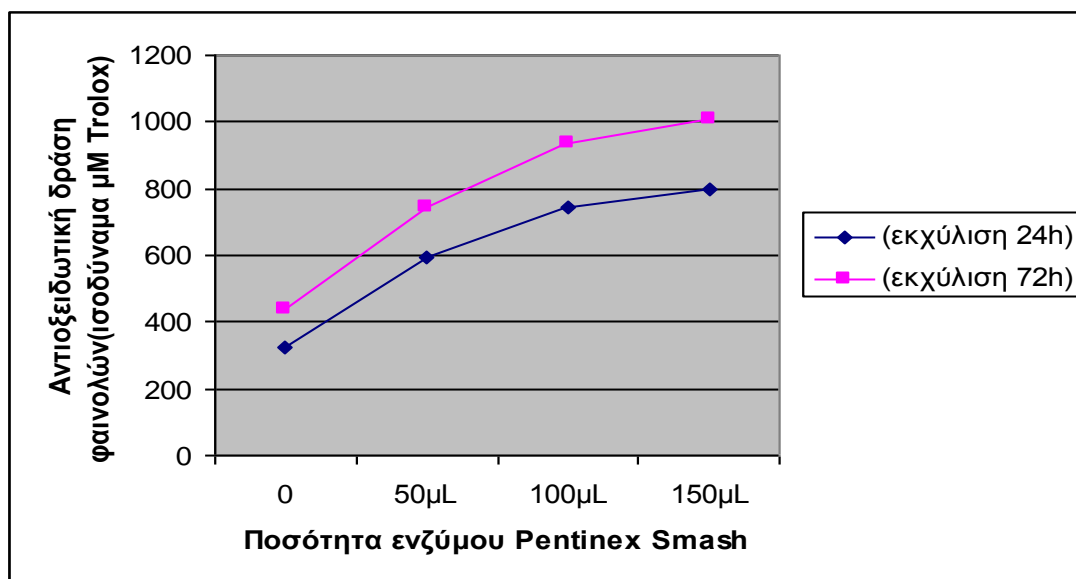


Διάγραμμα 11: Ολικές φαινόλες της εκχύλισης στέμφυλων (π.Ξινόμαυρο) με ένζυμο Pectinex Smash XXL για 24 h & 72 h.

Στο διάγραμμα αυτό φαίνεται η επίδραση της ποσότητας του ενζύμου Pectinex και του χρόνου εκχύλισης στις ολικές φαινόλες της ποικιλίας ξινόμαυρο. Παρατηρείται ότι αύξηση της ποσότητας του ενζύμου προκαλεί αύξηση μέχρι την προσθήκη 100 μL ενώ με την παράταση της εκχύλισης από 24 ώρες σε 72 εμφανίζεται μόνο μικρή στατιστικώς σημαντική αύξηση.

5.4.2. Αντιοξειδωτική δράση φαινολών

Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των φαινολικών ουσιών έγινε με τη μέθοδο DPP H (4.2.2.). Μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στα 517 nm και με βάση τις απορροφήσεις, από την πρότυπη καμπύλη Trolox και μέσω της εξίσωσης $y = -2,2796x + 0,6462$ προσδιορίστηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των φαινολών, λαμβάνοντας υπόψη ότι έγινε αραιώση των προς μέτρηση δειγμάτων 1:4 για όσα εκχυλίστηκαν 24 h και αραιώση 1:5 για όσα εκχυλίστηκαν 72 h, και εκφράστηκε σε μM Trolox (διάγραμμα 12).



Διάγραμμα 12: Αντιοξειδωτική δράση φαινολών της εκχύλισης στέμφυλων (π.Ξινόμαυρο) με ένζυμο Pectinex Smash XXL για 24 h & 72 h.

Στο διάγραμμα αυτό φαίνεται η αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών ουσιών που προκύπτει από το ένζυμο Pectinex της ποικιλίας ξινόμαυρο. Παρατηρείται ότι αύξηση της ποσότητας του ενζύμου προκαλεί αύξηση ενώ με την παράταση της εκχύλισης από 24 ώρες σε 72 εμφανίζεται μόνο μικρή στατιστικώς σημαντική αύξηση.

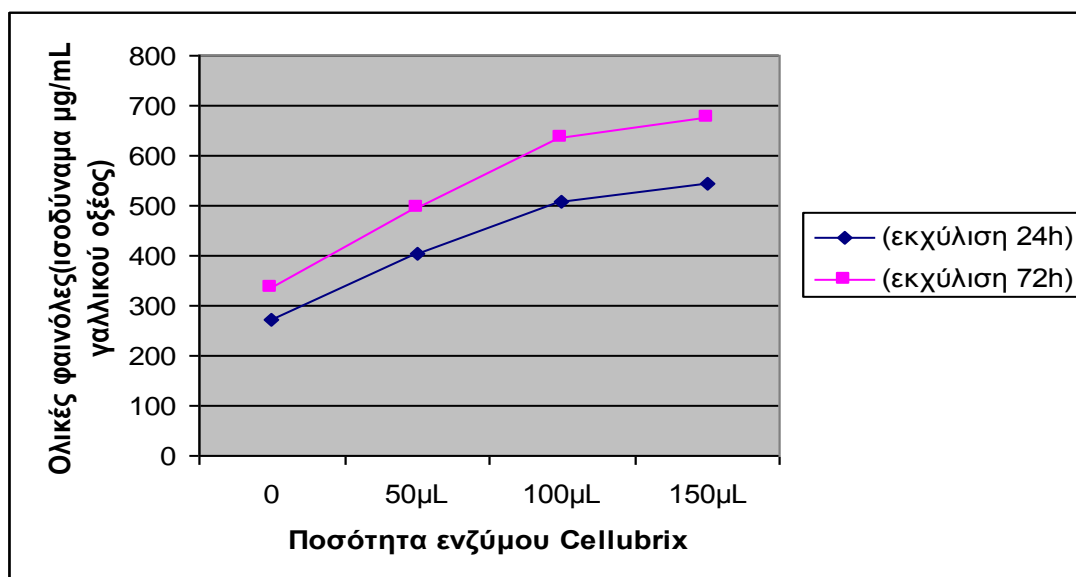
5.5.Εκχύλιση στέμφυλων (π.Ξινόμαυρο) με ένζυμο Cellubrix L

Η εκχύλιση έγινε με την μέθοδο που περιγράφηκε (4.1.6.) στους 35°C για 24 h και 72 h με την προσθήκη 50 μL, 100 μL, 150 μL ενζύμου Cellubrix L και νερό ως διαλύτη. Ακολούθησαν οι μετρήσεις για τον προσδιορισμό των ολικών φαινόλων και της αντιοξειδωτικής τους δράσης.

5.5.1.Προσδιορισμός ολικών φαινόλων

Ο προσδιορισμός των ολικών φαινόλων έγινε με την μέθοδο Folin-Ciocalteu (4.2.1.).Μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στα 760 nm και αφαιρέθηκε η απορρόφηση που αφορούσε τις πρωτεΐνες έτσι ώστε η διαφορά απορρόφησης να αφορά τις ολικές φαινόλες.

Με βάση τις απορροφήσεις που αφορούν τις ολικές φαινόλες από την πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος και με βάση την εξίσωση $y=0,0101x+0,0004$, και λαμβάνοντας υπόψη ότι έγινε αραιώση των προς μέτρηση δειγμάτων 1:4 για όσα εκχυλίστηκαν 24 h και αραιώση 1:5 για όσα εκχυλίστηκαν 72h, προσδιορίστηκε η ποσότητα των ολικών φαινόλων εκφρασμένη σε μg/ mL γαλλικού οξέος και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο διάγραμμα 13.

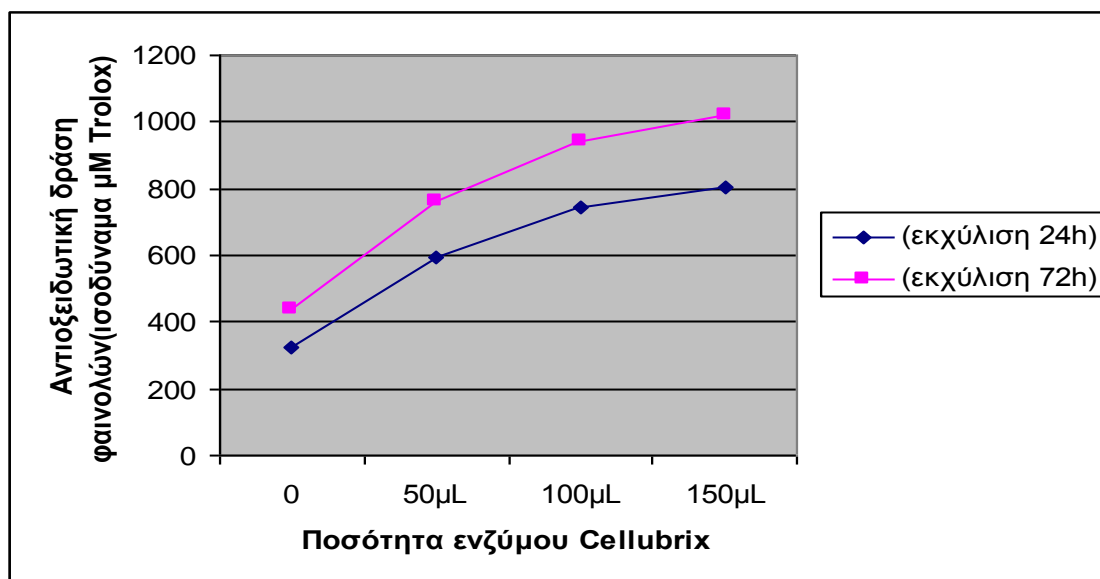


Διάγραμμα 13: Ολικές φαινόλες της εκχύλισης στέμφυλων (π.Ξινόμαυρο) με ένζυμο Cellubrix L για 24 h & 72 h.

Στο διάγραμμα αυτό φαίνεται η επίδραση της ποσότητας του ενζύμου Cellubrix και του χρόνου εκχύλισης στις ολικές φαινόλες της ποικιλίας ξινόμαυρο. Παρατηρείται ότι αύξηση της ποσότητας του ενζύμου και του χρόνου εκχύλισης προκαλεί αύξηση.

5.5.2. Αντιοξειδωτική δράση φαινολών

Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των φαινολικών ουσιών έγινε με τη μέθοδο DPP H (4.2.2.). Μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στα 517 nm και με βάση τις απορροφήσεις, από την πρότυπη καμπύλη Trolox και μέσω της εξίσωσης $y = -2,2796x + 0,6462$ προσδιορίστηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των φαινολών, λαμβάνοντας υπόψη ότι έγινε αραίωση των προς μέτρηση δειγμάτων 1:4 για όσα εκχυλίστηκαν 24 h και αραίωση 1:5 για όσα εκχυλίστηκαν 72 h, και εκφράστηκε σε μM Trolox (διάγραμμα 14).



Διάγραμμα 14: Αντιοξειδωτική δράση φαινολών της εκχύλισης στέμφυλων (π.Ξινόμαυρο) με ένζυμο Cellubrix για 24 h & 72 h.

Στο διάγραμμα αυτό φαίνεται η αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών ουσιών που προκύπτει από το ένζυμο Cellubrix της ποικιλίας μοσχάτο. Παρατηρείται ότι η αύξηση της ποσότητας του ενζύμου και του χρόνου εκχύλισης προκαλούν αύξηση της αντιοξειδωτικής δράσης.

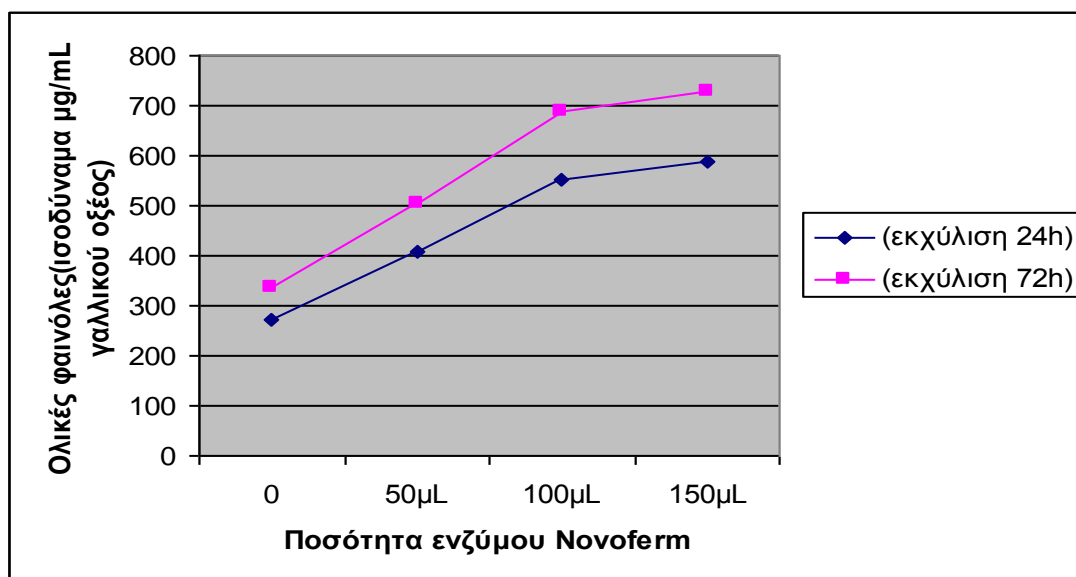
5.6.Εκχύλιση στέμφυλων (π.Ξινόμαυρο) με ένζυμο Novoferm 61

Η εκχύλιση έγινε με την μέθοδο που περιγράφηκε (4.1.6.) στους 35°C για 24 h και 72 h με την προσθήκη 50 μL , 100 μL , 150 μL ενζύμου Novoferm 61 και νερό ως διαλύτη. Ακολούθησαν οι μετρήσεις για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολών και της αντιοξειδωτικής τους δράσης.

5.6.1.Προσδιορισμός ολικών φαινολών

Ο προσδιορισμός των ολικών φαινολών έγινε με την μέθοδο Folin-Ciocalteu (4.2.1.).Μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στα 760 nm και αφαιρέθηκε η απορρόφηση που αφορούσε τις πρωτεΐνες έτσι ώστε η διαφορά απορρόφησης να αφορά τις ολικές φαινόλες.

Με βάση τις απορροφήσεις που αφορούν τις ολικές φαινόλες από την πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος και με βάση την εξίσωση $y=0,0101x+0,0004$, και λαμβάνοντας υπόψιν ότι έγινε αραιώση των προς μέτρηση δειγμάτων 1:4 για όσα εκχυλίστηκαν 24 h και αραιώση 1:5 για όσα εκχυλίστηκαν 72 h, προσδιορίστηκε η ποσότητα των ολικών φαινολών εκφρασμένη σε $\mu\text{g}/\text{mL}$ γαλλικού οξέος και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο διάγραμμα 15.

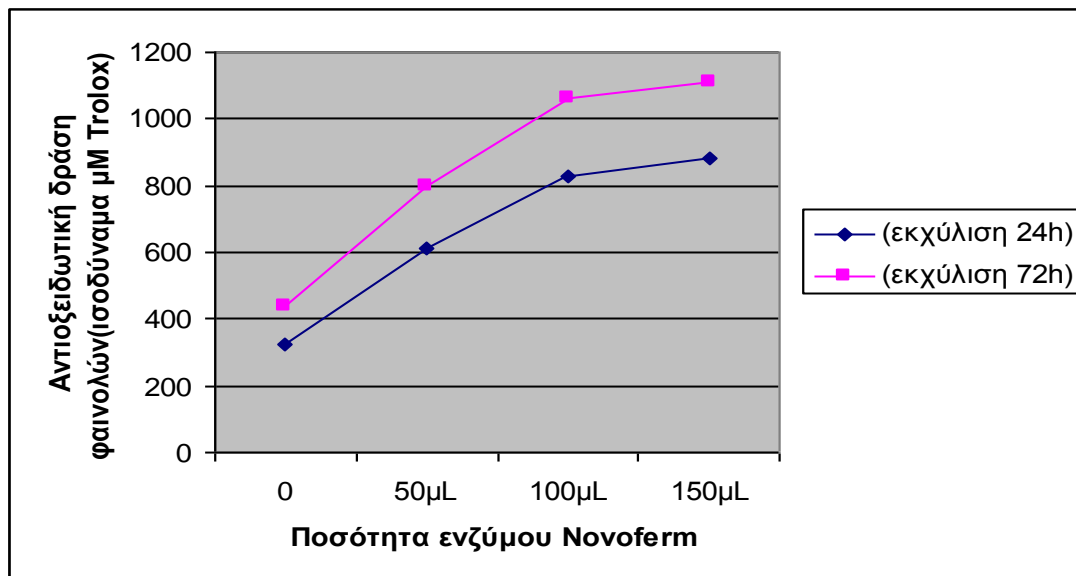


Διάγραμμα 15: Ολικές φαινόλες της εκχύλισης στέμφυλων (π.Ξινόμαυρο) με ένζυμο Novoferm 61 για 24 h & 72 h.

Στο διάγραμμα αυτό φαίνεται η επίδραση της ποσότητας του ενζύμου Novoferm και του χρόνου εκχύλισης στις ολικές φαινόλες της ποικιλίας ξινόμαυρο. Παρατηρούμε ότι αύξηση της ποσότητας του ενζύμου προκαλεί αύξηση των ολικών φαινολών. Επίσης η αύξηση του χρόνου εκχύλισης έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των ολικών φαινολών.

5.6.2. Αντιοξειδωτική δράση φαινολών

Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των φαινολικών ουσιών έγινε με τη μέθοδο DPP H (4.2.2.). Μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στα 517 nm και με βάση τις απορροφήσεις, από την πρότυπη καμπύλη Trolox και μέσω της εξίσωσης $y = -2,2796x + 0,6462$ προσδιορίστηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των φαινολών, λαμβάνοντας υπόψη ότι έγινε αραίωση των προς μέτρηση δειγμάτων 1:4 για όσα εκχυλίστηκαν 24 h και αραίωση 1:5 για όσα εκχυλίστηκαν 72 h, και εκφράστηκε σε μM Trolox (διάγραμμα 16).



Διάγραμμα 16: Αντιοξειδωτική δράση φαινολών της εκχύλισης στέμφυλων (π.Ξινόμαυρο) με ένζυμο Novoferm 61 για 24 h & 72 h.

Στο διάγραμμα αυτό φαίνεται η αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών ουσιών που προκύπτει από το ένζυμο Novoferm της ποικιλίας ξινόμαυρο. Παρατηρείται ότι η αύξηση της ποσότητας του ενζύμου και του χρόνου εκχύλισης προκαλούν αύξηση της αντιοξειδωτικής δράσης.

6. Συμπεράσματα

- Όλες οι εξεταζόμενες παράμετροι έχουν στατιστικώς σημαντική επίδραση στην αποτελεσματικότητα της εκχύλισης.
- Τα εκχυλίσματα ξινόμαυρου με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση φαινολικών συστατικών ήταν αυτά όπου χρησιμοποιήθηκε 150 μL του ενζύμου Novoferm σε 24 και 72 ώρες εκχύλισης με $146,77 \pm 0,898$ και $145,74 \pm 0,594$ $\mu\text{g/L}$ ισοδύναμα γαλλικού οξέος, αντίστοιχα χωρίς στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ τους.
- Τα εκχυλίσματα ξινόμαυρου με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση αντιοξειδωτικής δράσης ήταν αυτά όπου χρησιμοποιήθηκε 150 μL του ενζύμου Novoferm σε 24 και 72 ώρες εκχύλισης $220,45 \pm 1,83$ και $222,20 \pm 2,64$ μM Trolox, αντίστοιχα, και με 100 μL του ίδιου ενζύμου σε 72 ώρες $212,26 \pm 1,83$ μM Trolox, χωρίς στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ τους.
- Τα εκχυλίσματα μοσχάτου με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση φαινολικών συστατικών ήταν αυτά όπου χρησιμοποιήθηκε 150 μL των ενζύμων Cellubrix και Novoferm σε 72 ώρες εκχύλισης με $71,122 \pm 0,560$ και $71,023 \pm 1,307$ $\mu\text{g/L}$ ισοδύναμα γαλλικού οξέος, αντίστοιχα, και 150 μL Cellubrix σε 24 ώρες με $68,94 \pm 4,06$ $\mu\text{g/L}$ ισοδύναμα γαλλικού χωρίς στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ τους.
- Τα εκχυλίσματα μοσχάτου με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση αντιοξειδωτική δράση ήταν πάλι αυτά όπου χρησιμοποιήθηκε 150 μL των ενζύμων Cellubrix και Novoferm σε 72 ώρες εκχύλισης με $189,30 \pm 3,08$ και με $189,30 \pm 3,78$ μM Trolox, αντίστοιχα. Στην ποικιλία μοσχάτο και για χρόνο εκχύλισης 24 h από τα τρία ένζυμα το Novoferm δίνει τη μικρότερη συγκέντρωση φαινολικών ουσιών σε κάθε ποσότητα ενζύμου.
- Σύμφωνα με τα ως τώρα αποτελέσματα, για την εκχύλιση του μοσχάτου καταλληλότερο ένζυμο είναι το Cellubrix και για την εκχύλιση του ξινόμαυρου το Novoferm.

Με βάση τα συμπεράσματα στο μέλλον να γίνουν οι εξής μελέτες προκειμένου να απαντηθούν αναπάντητα ερωτήματα από την παρούσα μελέτη:

- Να εξεταστεί η επίδραση και άλλων ενζύμων στην εκχύλιση των στέμφυλων.
- Να εξεταστεί η επίδραση των ενζύμων και σε στέμφυλα άλλων ποικιλιών σταφυλιών.
- Να εξεταστεί η επίδραση της θερμοκρασίας σε συνδυασμό με την προσθήκη ενζύμων στην εκχύλιση των στέμφυλων.
- Να γίνει ο προσδιορισμός των φαινολών που εκχυλίστηκαν και με άλλες μεθόδους μέτρησης.
- Να γίνει ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης των φαινολών και με άλλες μεθόδους μέτρησης.

7. Βιβλιογραφία

Amendola D., Faveri D.M., Spigno G. (2010). Grape marc phenolics: Extraction kinetic, quality and stability of extracts. *Journal of Food Engineering*, 97, 384-392

Arnous A., Meyer A. (2009). Discriminated release of phenolic substances from red wine grape skins (*Vitis vinifera* L) by multicomponent enzymes treatment. *Biochemical Engineering Journal*. Article in press

Boussetta N., Lanoiselle J.L., Bedel-Cloutour C., Vorobiev E. (2009). Extraction of soluble matter from grape pomace by high voltage electrical discharges for polyphenol recovery: Effect of sulphur dioxide and thermal treatments. *Journal of Food Engineering*, 95, 192-198

Bucic-Kojic A., Planinic M., Tomas S., Bilic M., Velic D. (2007). Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of Food Engineering*, 81, 236-242

Cioffi G., Pesca M.S., Caprariis P., Braca A., Severino L., Tommasi N. (2010). Phenolic compounds in olive oil and olive pomace from Cilento (Campania, Italy) and their antioxidant activity. *Food chemistry*, 121, 105-111

Corrales M., Toepfl S., Butz P., Knorr D., Tauscher B. (2008). Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: A comparison. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9, 85-91

Diaz-Reinoso B., Gonzalez-Lopez N., Moure A., Dominguez H., Parajo J.C. (2009). Recovery of antioxidants from industrial waste liquors using membranes and polymeric resins. *Journal of Food Engineering*, 96, 127-133

Diaz-Reinoso B., Moure A., Dominguez H., Parajo J.C. (2008). Ultra and nanofiltration of aqueous extracts from distilled fermented grape pomace. *Journal of Food Engineering*, 91, 587-593

Dopico-Garcia M.S., Valentao P., Guerra L., Andrade P.B., Seabra R.M. (2007). Experimental design for extraction and quantification of phenolic compounds and organic acids in white "Vinho Verde" grapes. *Analytica Chimica Acta*, 583, 15-22

Gaulejac N.V., Vivas N., Nonier M.F., Absalon C., Bourgeois G. (2001). Study and quantification of monomeric flavan-3-ol and dimeric procyanidin quinonic forms by HPLC/ESI-MS. Application to red wine oxidation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 1171-1179

Gomez-Plaza E., Minano A., Lopez-Roca J.M. (2006). Comparison of chromatic properties, stability and antioxidant capacity of anthocyanin-based aqueous extracts from grape pomace obtained from different vinification methods. *Food Chemistry*, 97, 87-94

Gonzalez-Barrio R., Vidal-Guevara M.L., Tomas-Barberan F.A., Espin J.C. (2009). Preparation of a resveratrol-enriched grape juice based on ultraviolet C-treated berries. *Innovative Food and Emerging Technologies*, 10 , 374-382

Guerrero M.S., Torres S.J., Nunez M.J. (2008). Extraction of polyphenols from white distilled grape pomace: Optimization and modelling. *Bioresource and modelling*, 99 , 1311-1318

Jerez M., Pinelo M., Sineiro J., Nunez M. (2006). Influence of extraction conditions on phenolic yields from pine bark: assessment of procyanidins polymerization degree by thiolysis. *Food Chemistry*, 94 , 406-414

Karvela E., Makris D., Kalogeropoulos N., Karathanos V. (2009). Deployment of response surface methodology to optimize recovery of grape (*Vitis vinifera*) stem polyphenols. *Talanta*, 79 , 1311-1321

Kerry N.L., Abbey M. (1997). Red wine and fractionated phenolic compounds prepared from red wine inhibit low density lipoprotein oxidation in vitro. *Atherosclerosis*, 135 , 93-102

Lu Y., Foo L.Y. (1997). Identification and quantification of major polyphenols in apple pomace. *Food Chemistry*, 59 (2) ,187-194

Makris D., Boskou A., Andrikopoulos N. (2007). Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20 , 125-132

Makris D., Psarra E., Kallithraka S., Kefalas P. (2003). The effect of polyphenolic composition as related to antioxidant capacity in white wines. *Food Research International*, 36 , 805-814

Meyer A., Heinonen M., Frankel E.N. (1998). Antioxidant interactions of catechin, cyaniding, caffeic acid, quercetin and ellagic acid on human LDL oxidation. *Food Chemistry*, 61 (1/2) , 71-75

Minussi R.C., Rossi M., Bologna L., Cordi L., Rotilio D., Pastire G.M., Duran N. (2003). Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines. *Food Chemistry*, 82 , 409-416

Munoz O., Sepulveda M., Schwartz M. (2004). Effects of enzymatic treatment on anthocyanic pigments from grapes skin from Chilean wine. *Food Chemistry*, 87 , 487-490

Pena-Neira A., Caceres A., Pastenes C. (2007). Low molecular weight phenolic and anthocyanin composition of grape skins from cv. Syrah (*Vitis vinifera* L.) in the Maipo valley (Chile):Effect of clusters thinning and vineyard yield. *Food and Technology International*, 13 (2) , 153-158

Pinelo M., Rubilar M., Sineiro J., Nunez M.J. (2006). Effect of bubbling nitrogen and pulsed flow on the antiradical activity of grape residues. *Journal of Food Engineering*, 73 , 269-275

Pinelo M., Arnous A., Meyer A. (2006). Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends in Food Science and Technology*, 17 , 579-590

Pinelo M., Sineiro J., Nunez M.J. (2006). Mass transfer during continuous solid-liquid extraction of antioxidants from grape byproducts. *Journal of Food Engineering*, 77 , 57-63

Proestos C., Bakogiannis A., Psarianos C., Koutinas A., Kanllaki M., Komaitis M. (2005) High performance liquid chromatography analysis of phenolic substances in Greek wines. *Food Control*, 16 , 319-323

Rice-Evans C., Miller N., Paganga G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2 (4) , 152-159

Soto M.L., Moure A., Dominguez H., Parajio J.C. (2008). Charcoal adsorption of phenolic compounds present in distilled grape pomace. *Journal of Food Engineering*, 84 , 156-163

Spigro G., Tramelli L., Favari D.M. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81 , 200-208

Tedesco I., Russo M., Russo P., Iacomino G., Russo G.L., Carraturo A., Faruolo C., Moio L., Palumbo R. (2000). Antioxidant effect of red wine polyphenols on red blood cells. *Journal Nutrition Biochemical*, 11 , 114-119

Teissedre P., Frankel E., Waterhouse A., Peleg H., German J.B. (1996). Inhibition of in vitro human LDL oxidation by phenolic antioxidants from grapes and wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 70 , 55-61

Vatai T., Skerget M., Knez Z. (2009). Extraction of phenolic compounds from elderberry and different grape marc varieties using organic solvents and/or supercritical carbon dioxide. *Journal of Food Engineering*, 90 , 246-254

Wijngaard H.H., Brunton N. (2010). The optimization of solid-liquid extraction of antioxidants from apple pomace by response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 96 , 134-140

Xu C., Zhang Y., Cao L., Lu J. (2010). Phenolic compounds and antioxidant properties of different grape cultivars grown in China. *Food Chemistry*, 119 , 1557-1565

Yi C., Shi J., Kramer J., Xue S., Jiang Y., Zhang M., Ma Y., Pohorly J. (2009) Fatty acid composition and phenolic antioxidants of winemaking pomace powder. *Food Chemistry*, 114 , 570-576

Μπόσκου Δ., (1986). Χημεία τροφίμων με στοιχεία τεχνολογίας τροφίμων. Εκδόσεις Γαρταγάνη, Θεσσαλονίκη, 203-205

Σουφλερός Ε. (1995) Οίνος και αποστάγματα: Μέθοδοι ανάλυσης. Αθήνα, 115-120

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 1: Εκχύλιση στέμφυλων (Μοσχάτο) για 24 h. Ένζυμο Pectinex Smash. Μετρήσεις απορρόφησης στα 760 nm.

Ποσότητα ενζύμου	Απορρόφηση (φαινόλες & πρωτεΐνες)	Απορρόφηση (Πρωτεΐνες)	Διαφορά απορρόφησης (φαινόλες)
0	0,221 (0,001)	-	0,221
50 µL	0,354 (0,018)	0,030 (0,004)	0,324
150 µL	0,506 (0,072)	0,041 (0,004)	0,465
500 µL	0,634 (0,009)	0,070 (0,003)	0,564

Οι τιμές του πίνακα είναι ο μέσος όρος τριών μετρήσεων. Σε παρένθεση η τυπική απόκλιση.

Πίνακας 2: Εκχύλιση στέμφυλων (Μοσχάτο) για 72 h. Ένζυμο Pectinex Smash. Μετρήσεις απορρόφησης στα 760 nm.

Ποσότητα ενζύμου	Απορρόφηση (φαινόλες & πρωτεΐνες)	Απορρόφηση (Πρωτεΐνες)	Διαφορά απορρόφησης (φαινόλες)
0	0,252 (0,009)	-	0,252
50 µL	0,405 (0,017)	0,032 (0,002)	0,373
150 µL	0,499 (0,002)	0,039 (0,002)	0,460
500 µL	0,736 (0,007)	0,069 (0,002)	0,667

Οι τιμές του πίνακα είναι ο μέσος όρος τριών μετρήσεων. Σε παρένθεση η τυπική απόκλιση.

Πίνακας 3: Εκχύλιση στέμφυλων (Μοσχάτο) για 24 και 72 ώρες. Ένζυμο Pectinex smash. Μετρήσεις απορρόφησης στα 517 nm.

Ποσότητα ενζύμου	Απορρόφηση (εκχύλιση 24 h)	Απορρόφηση (εκχύλιση 72 h)
0	0,535 (0,014)	0,522 (0,006)
50 µL	0,400 (0,013)	0,382 (0,004)
150 µL	0,332 (0,022)	0,302 (0,005)
500 µL	0,278 (0,012)	0,252 (0,005)

Οι τιμές του πίνακα είναι ο μέσος όρος τριών μετρήσεων. Σε παρένθεση η τυπική απόκλιση.

Πίνακας 4: Εκχύλιση στέμφυλων (Μοσχάτο) για 24 h. Ένζυμο Celubrix L. Μετρήσεις απορρόφησης στα 760 nm.

Ποσότητα ενζύμου	Απορρόφηση (φαινόλες & πρωτεΐνες)	Απορρόφηση (Πρωτεΐνες)	Διαφορά απορρόφησης (φαινόλες)
0	0,221 (0,001)	-	0,221
50 μ L	0,373 (0,012)	0,060 (0,005)	0,313
150 μ L	0,660 (0,005)	0,097 (0,003)	0,564
500 μ L	0,829 (0,039)	0,148 (0,004)	0,681

Οι τιμές του πίνακα είναι ο μέσος όρος τριών μετρήσεων. Σε παρένθεση η τυπική απόκλιση.

Πίνακας 5: Εκχύλιση στέμφυλων (Μοσχάτο) για 72 h. Ένζυμο Celubrix L. Μετρήσεις απορρόφησης στα 760 nm.

Ποσότητα ενζύμου	Απορρόφηση (φαινόλες & πρωτεΐνες)	Απορρόφηση (Πρωτεΐνες)	Διαφορά απορρόφησης (φαινόλες)
0	0,252 (0,009)	-	0,252
50 μ L	0,476 (0,009)	0,063 (0,004)	0,413
150 μ L	0,659 (0,007)	0,098 (0,006)	0,562
500 μ L	0,877 (0,033)	0,139 (0,003)	0,738

Οι τιμές του πίνακα είναι ο μέσος όρος τριών μετρήσεων. Σε παρένθεση η τυπική απόκλιση.

Πίνακας 6: Εκχύλιση στέμφυλων (Μοσχάτο) για 24 και 72 ώρες. Ένζυμο Celubrix L. Μετρήσεις απορρόφησης στα 517 nm.

Ποσότητα ενζύμου	Απορρόφηση (517 nm) (εκχύλιση 24 h)	Απορρόφηση (517 nm) (εκχύλιση 72 h)
0	0,535 (0,014)	0,522 (0,006)
50 μ L	0,418 (0,011)	0,396 (0,007)
150 μ L	0,265 (0,044)	0,221 (0,016)
500 μ L	0,245 (0,009)	0,215 (0,007)

Οι τιμές του πίνακα είναι ο μέσος όρος τριών μετρήσεων. Σε παρένθεση η τυπική απόκλιση.

Πίνακας 7: Εκχύλιση στέμφυλων (Μοσχάτο) για 24 h. Ένζυμο Novoferm. Μετρήσεις απορρόφησης στα 760 nm.

Ποσότητα ενζύμου	Απορρόφηση (φαινόλες & πρωτεΐνες)	Απορρόφηση (Πρωτεΐνες)	Διαφορά απορρόφησης (φαινόλες)
0	0,221 (0,001)	-	0,221
50 μL	0,369 (0,006)	0,069 (0,004)	0,300
150 μL	0,537 (0,005)	0,084 (0,003)	0,453
500 μL	0,738 (0,019)	0,136 (0,003)	0,602

Οι τιμές του πίνακα είναι ο μέσος όρος τριών μετρήσεων. Σε παρένθεση η τυπική απόκλιση.

Πίνακας 8: Εκχύλιση στέμφυλων (Μοσχάτο) για 72 h. Ένζυμο Novoferm. Μετρήσεις απορρόφησης στα 760 nm.

Ποσότητα ενζύμου	Απορρόφηση (φαινόλες & πρωτεΐνες)	Απορρόφηση (Πρωτεΐνες)	Διαφορά απορρόφησης (φαινόλες)
0	0,252 (0,009)	-	0,252
50 μL	0,484 (0,013)	0,072 (0,007)	0,412
150 μL	0,637 (0,004)	0,090 (0,005)	0,548
500 μL	0,835 (0,014)	0,136 (0,005)	0,700

Οι τιμές του πίνακα είναι ο μέσος όρος τριών μετρήσεων. Σε παρένθεση η τυπική απόκλιση.

Πίνακας 9: Εκχύλιση στέμφυλων (Μοσχάτο) για 24 και 72 ώρες. Ένζυμο Novoferm 61. Μετρήσεις απορρόφησης στα 517 nm.

Ποσότητα ενζύμου	Απορρόφηση (εκχύλιση 24 h)	Απορρόφηση (εκχύλιση 72 h)
0	0,535 (0,014)	0,522 (0,006)
50 μL	0,390 (0,047)	0,346 (0,029)
150 μL	0,365 (0,013)	0,323 (0,021)
500 μL	0,268 (0,013)	0,215 (0,009)

Οι τιμές του πίνακα είναι ο μέσος όρος τριών μετρήσεων. Σε παρένθεση η τυπική απόκλιση.

Πίνακας 10: Εκχύλιση στέμφυλων (Ξινόμαυρο) για 24 h. Ένζυμο Pectinex Smash. Μετρήσεις απορρόφησης στα 760 nm.

Ποσότητα ενζύμου	Απορρόφηση (φαινόλες & πρωτεΐνες)	Απορρόφηση (Πρωτεΐνες)	Διαφορά απορρόφησης (φαινόλες)
0	0,690 (0,011)	-	0,690
50 μ L	1,017 (0,007)	0,051 (0,004)	0,966
100 μ L	1,345 (0,012)	0,101 (0,006)	1,244
150 μ L	1,424 (0,007)	0,152 (0,005)	1,272

Οι τιμές του πίνακα είναι ο μέσος όρος τριών μετρήσεων. Σε παρένθεση η τυπική απόκλιση.

Πίνακας 11: Εκχύλιση στέμφυλων (Ξινόμαυρο) για 72 h. Ένζυμο Pectinex Smash. Μετρήσεις απορρόφησης στα 760 nm.

Ποσότητα ενζύμου	Απορρόφηση (φαινόλες & πρωτεΐνες)	Απορρόφηση (Πρωτεΐνες)	Διαφορά απορρόφησης (φαινόλες)
0	0,681 (0,009)	-	0,681
50 μ L	1,010 (0,005)	0,041 (0,005)	0,969
100 μ L	1,329 (0,002)	0,081 (0,006)	1,248
150 μ L	1,415 (0,007)	0,122 (0,005)	1,293

Οι τιμές του πίνακα είναι ο μέσος όρος τριών μετρήσεων. Σε παρένθεση η τυπική απόκλιση.

Πίνακας 12: Εκχύλιση στέμφυλων (Ξινόμαυρο) για 24 και 72 ώρες. Ένζυμο Pectinex smash. Μετρήσεις απορρόφησης στα 517 nm.

Ποσότητα ενζύμου	Απορρόφηση (εκχύλιση 24 h)	Απορρόφηση (εκχύλιση 72 h)
0	0,460 (0,010)	0,446 (0,001)
50 μ L	0,306 (0,017)	0,306 (0,003)
100 μ L	0,222 (0,010)	0,218 (0,005)
150 μ L	0,191 (0,007)	0,186 (0,004)

Οι τιμές του πίνακα είναι ο μέσος όρος τριών μετρήσεων. Σε παρένθεση η τυπική απόκλιση.

Πίνακας 13: Εκχύλιση στέμφυλων (Ξινόμαυρο) για 24 h. Ένζυμο Celubrix L. Μετρήσεις απορρόφησης στα 760 nm.

Ποσότητα ενζύμου	Απορρόφηση (φαινόλες & πρωτεΐνες)	Απορρόφηση (Πρωτεΐνες)	Διαφορά απορρόφησης (φαινόλες)
0	0,690 (0,011)	-	0,690
50 μL	1,025 (0,009)	0,008 (0,004)	1,017
100 μL	1,298 (0,003)	0,015 (0,004)	1,283
150 μL	1,398 (0,010)	0,023 (0,007)	1,375

Οι τιμές του πίνακα είναι ο μέσος όρος τριών μετρήσεων. Σε παρένθεση η τυπική απόκλιση.

Πίνακας 14: Εκχύλιση στέμφυλων (Ξινόμαυρο) για 72 h. Ένζυμο Celubrix L. Μετρήσεις απορρόφησης στα 760 nm.

Ποσότητα ενζύμου	Απορρόφηση (φαινόλες & πρωτεΐνες)	Απορρόφηση (Πρωτεΐνες)	Διαφορά απορρόφησης (φαινόλες)
0	0,681 (0,009)	-	0,681
50 μL	1,007 (0,005)	0,006 (0,003)	1,001
100 μL	1,297 (0,004)	0,012 (0,005)	1,285
150 μL	1,386 (0,008)	0,019 (0,004)	1,367

Οι τιμές του πίνακα είναι ο μέσος όρος τριών μετρήσεων. Σε παρένθεση η τυπική απόκλιση.

Πίνακας 15: Εκχύλιση στέμφυλων (Ξινόμαυρο) για 24 και 72 ώρες. Ένζυμο Celubrix L. Μετρήσεις απορρόφησης στα 517 nm.

Ποσότητα ενζύμου	Απορρόφηση (εκχύλιση 24 h)	Απορρόφηση (εκχύλιση 72 h)
0	0,460 (0,010)	0,446 (0,001)
50 μL	0,309 (0,005)	0,298 (0,002)
100 μL	0,223 (0,007)	0,216 (0,003)
150 μL	0,187 (0,006)	0,181 (0,002)

Οι τιμές του πίνακα είναι ο μέσος όρος τριών μετρήσεων. Σε παρένθεση η τυπική απόκλιση.

Πίνακας 16: Εκχύλιση στέμφυλων (Ξινόμαυρο) για 24 h. Ένζυμο Novoferm 61. Μετρήσεις απορρόφησης στα 760 nm.

Ποσότητα ενζύμου	Απορρόφηση (φαινόλες & πρωτεΐνες)	Απορρόφηση (Πρωτεΐνες)	Διαφορά απορρόφησης (φαινόλες)
0	0,690 (0,011)	-	0,690
50 μL	1,064 (0,005)	0,029 (0,006)	1,035
100 μL	1,457 (0,007)	0,058 (0,010)	1,399
150 μL	1,569 (0,009)	0,087 (0,00)	1,482

Οι τιμές του πίνακα είναι ο μέσος όρος τριών μετρήσεων. Σε παρένθεση η τυπική απόκλιση.

Πίνακας 17: Εκχύλιση στέμφυλων (Ξινόμαυρο) για 72 h. Ένζυμο Novoferm 61. Μετρήσεις απορρόφησης στα 760 nm.

Ποσότητα ενζύμου	Απορρόφηση (φαινόλες & πρωτεΐνες)	Απορρόφηση (Πρωτεΐνες)	Διαφορά απορρόφησης (φαινόλες)
0	0,681 (0,009)	-	0,681
50 μL	1,046 (0,008)	0,023 (0,009)	1,023
100 μL	1,439 (0,007)	0,047 (0,009)	1,392
150 μL	1,542 (0,006)	0,070 (0,011)	1,472

Οι τιμές του πίνακα είναι ο μέσος όρος τριών μετρήσεων. Σε παρένθεση η τυπική απόκλιση.

Πίνακας 18: Εκχύλιση στέμφυλων (Ξινόμαυρο) για 24 και 72 ώρες. Ένζυμο Novoferm 61. Μετρήσεις απορρόφησης στα 517 nm.

Ποσότητα ενζύμου	Απορρόφηση (εκχύλιση 24 h)	Απορρόφηση (εκχύλιση 72 h)
0	0.460 (0,010)	0,446 (0,001)
50 μL	0.296 (0,006)	0,281 (0,003)
100 μL	0,174 (0,005)	0,162 (0,004)
150 μL	0,143 (0,004)	0,159 (0,006)

Οι τιμές του πίνακα είναι ο μέσος όρος τριών μετρήσεων. Σε παρένθεση η τυπική απόκλιση.

Πίνακας 19: Πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης. Μετρήσεις απορρόφησης στα 760 nm.

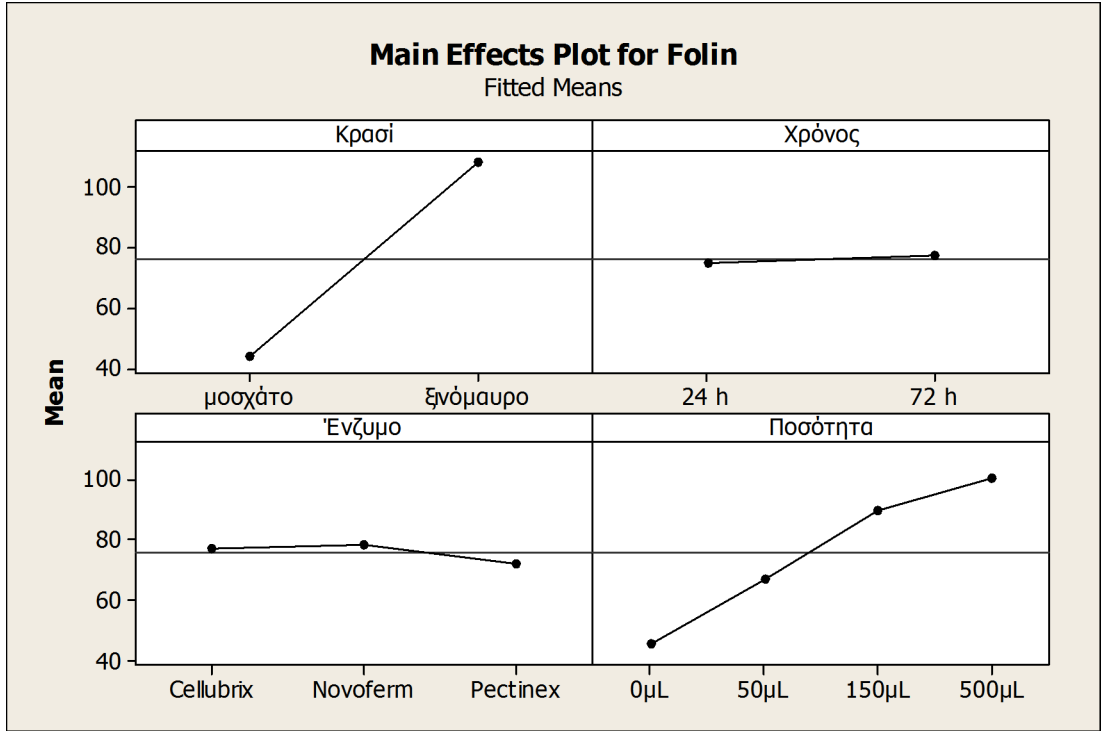
Συγκέντρωση αλβουμίνης (mg/mL)	Απορρόφηση (760 nm)	Συγκέντρωση αλβουμίνης (mg/mL)	Απορρόφηση (760 nm)
0	0	0,5	0,518
0,1	0,103		0,527
	0,113		0,530
	0,101	0,632	
0,2	0,213	0,6	0,626
	0,208		0,631
	0,210		0,739
0,3	0,315	0,7	0,730
	0,324		0,734
	0,306		0,852
0,4	0,410	0,8	0,841
	0,421		0,830
	0,432		

Πίνακας 20: Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος. Μετρήσεις απορρόφησης στα 760 nm.

Συγκέντρωση Γαλλικού οξέος (μg/mL)	Απορρόφηση (760 nm)	Συγκέντρωση Γαλλικού οξέος (μg/mL)	Απορρόφηση (760 nm)
0	0	120	1,225
20	0,202		1,217
	0,209		1,208
	0,198	1,427	
40	0,413	140	1,420
	0,405		1,421
	0,407		1,632
60	0,603	160	1,627
	0,614		1,619
	0,605		1,812
80	0,819	180	1,819
	0,805		1,826
	0,801		
100	1,018		
	1,002		
	1,011		

Πίνακας 21: Πρότυπη καμπύλη Trolox. Μετρήσεις απορρόφησης στα 517 nm.

Συγκέντρωση Trolox (mM)	Απορρόφηση (517 nm)	Συγκέντρωση Trolox (mM)	Απορρόφηση (517 nm)
0,00	0,641	0,15	0,283
	0,637		0,290
	0,645		0,284
0,03	0,576	0,18	0,227
	0,581		0,226
	0,58		0,22
0,06	0,515	0,21	0,168
	0,518		0,167
	0,514		0,170
0,09	0,446	0,24	0,111
	0,447		0,108
	0,446		0,108
0,12	0,383		
	0,384		
	0,386		



tt

