



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου & Φυτικής παραγωγής  
Εργαστήριο Οινολογίας

ΔΠΜΣ "Αμπελουργία-Οινολογία"

# ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ ΣΤΑ ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΛΕΥΚΟΥ ΟΙΝΟΥ

ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ: ΚΑΛΛΙΘΡΑΚΑ ΣΤΑΜΑΤΙΝΑ



ΠΑΤΡΙΝΟΣ Α. ΣΩΤΗΡΙΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2016

# ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ ΣΤΑ  
ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΛΕΥΚΟΥ ΟΙΝΟΥ»

ΠΑΤΡΙΝΟΣ Α. ΣΩΤΗΡΙΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΚΑΛΛΙΘΡΑΚΑ ΣΤΑΜΑΤΙΝΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

ΚΑΛΛΙΘΡΑΚΑ ΣΤΑΜΑΤΙΝΑ

ΜΠΙΝΙΑΡΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ

ΜΑΛΛΟΥΧΟΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή πραγματεύεται την επίδραση της προσθήκης γλουταθειόνης μεταζυμωτικά, ως προς την προστασία των φαινολικών και αρωματικών συστατικών λευκού οίνου. Για το σκοπό αυτό, οινοποιήθηκε η λευκή ποικιλία Ροδίτης και ο οίνος που προέκυψε επεξεργάστηκε με διάφορες συγκεντρώσεις γλουταθειόνης (GSH) και θειώδη ανυδρίτη (SO<sub>2</sub>) προς διαφοροποίηση των 10 τελικών δειγμάτων ως προς την αντιοξειδωτική τους ικανότητα. Οι μετρήσεις που ακολούθησαν πραγματοποιήθηκαν σε βάθος χρόνου τριών μηνών και σε μηνιαία βάση. Ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε στα αρωματικά και φαινολικά συστατικά του προϊόντος, καθώς και στην αντιοξειδωτική του ικανότητα. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων αναλύθηκαν και στατιστικώς με τη μέθοδο ANOVA σε σύγκριση ζευγών ώστε να εκτιμηθούν οι αποκλίσεις μεταξύ των δειγμάτων.

Οι προστιθέμενες ποσότητες αντιοξειδωτικών καθορίστηκαν σύμφωνα με τα επίσημα από τον ΟΙΒ όρια προσθήκης, ενώ η συντήρηση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας.

Η έκθεση των αποτελεσμάτων έγινε σε σύγκριση με αποτελέσματα πρόσφατων ερευνών που πραγματοποιήθηκαν με αντικείμενο μελέτης τη δράση της γλουταθειόνης.

Λέξεις κλειδιά: γλουταθειόνη, αντιοξειδωτικά, λευκός οίνος, συντήρηση

## ABSTRACT

The subject of the present master thesis is the influence of glutathione addition in white wine after fermentation, regarding the preservation of the phenolic and aromatic compounds. For this purpose, the Greek white variety Roditis was vinified and the resulted wine was processed with various concentrations of glutathione (GSH) and sulphur dioxide (SO<sub>2</sub>) in order for the 10 experiment samples to be differentiated regarding their antioxidant capacity. The measurements that followed took place in three months time and in monthly base. Special attention was given to the aromatic and phenolic compounds of the product, as to their antioxidant ability as well. The measurement results were analyzed statistically with ANOVA method of pair comparison in order for the deviations to be estimated.

The added quantities of antioxidants were estimated via the OIV official addition limits, while the maintenance of the samples was under controlled temperature and humidity conditions.

The report of results was presented in comparison with other recent studies results with glutathione's effect as subject of research.

Key words: glutathione, antioxidants, white wine, maintenance

## Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	1
ABSTRACT .....	2
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ .....	5
ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	6
ΠΟΙΚΙΛΙΑ ΡΟΔΙΤΗΣ .....	6
ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΣΤΟΥΣ ΟΙΝΟΥΣ.....	7
ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΣΤΟΥΣ ΛΕΥΚΟΥΣ ΟΙΝΟΥΣ .....	9
ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΟΞΕΙΔΩΣΕΩΝ .....	10
ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ.....	12
ΜΗ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ .....	12
ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ.....	13
ΕΝΖΥΜΑΤΙΚΗ ΟΞΕΙΔΩΣΗ.....	15
ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ ΤΟΥ ΓΛΕΥΚΟΥΣ ΑΠΟ ΤΙΣ ΟΞΕΙΔΩΣΕΙΣ .....	18
ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ.....	20
ΘΕΙΩΔΗΣ ΑΝΥΔΡΙΤΗΣ (SO <sub>2</sub> ).....	20
Ασκορβικό οξύ.....	24
Γλουταθειόνη .....	25
Αντιοξειδωτικές δράσεις GSH .....	28
Επίδραση της γλουταθειόνης στις αρωματικές ενώσεις του γλεύκου και του οίνου ..	31
Η GSH ως πρόδρομη ένωση θειολών.....	32
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 .....	34
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	34
ΣΚΟΠΟΣ – ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ.....	34
ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗ .....	35
ΧΗΜΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ.....	36
ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΟΙΝΟΥ .....	36
ΟΛΙΚΑ ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ (Μέθοδος FOLIN-CIOCALTEAU).....	36
ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ (Μέθοδος DPPH).....	38
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΚΕΤΑΛΔΕΪΔΗΣ .....	40
ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΜΕ GC-FID SPME .....	41
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΤΗΤΙΚΩΝ (GC) .....	42
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΜΕ HPLC ΜΕΣΩ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΑΥΤΩΝ ΜΕ ΟΞΙΚΟ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑ.....	43

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	44
ΠΟΡΕΙΑ ΖΥΜΩΣΗΣ ΚΑΙ ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ .....	44
ΟΛΙΚΟ ΔΙΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΘΕΙΟΥ (SO <sub>2</sub> total).....	45
ΕΛΕΥΘΕΡΟ ΔΙΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΘΕΙΟΥ (SO <sub>2</sub> free).....	47
ΟΛΙΚΑ ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ (Μέθοδος FOLIN-CIOCALTEAU) .....	49
ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ (Μέθοδος DPPH) .....	51
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΚΕΤΑΛΔΕΪΔΗΣ .....	54
ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΜΕ GC-FID SPME .....	55
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΤΗΤΙΚΩΝ (GC) .....	63
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΜΕ HPLC ΜΕΣΩ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΑΥΤΩΝ ΜΕ ΟΞΙΚΟ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑ.....	69
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	76
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	79

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή διεκπεραιώθηκε στο Γεωπονικό πανεπιστήμιο Αθηνών και συγκεκριμένα στο εργαστήριο οιολογίας. Η ομάδα του εργαστηρίου συνετέλεσε στη ομαλή, επιτυχή και πάνω απ' όλα ευχάριστη ολοκλήρωση της παρούσας πειραματικής έρευνας. Οφείλω να ευχαριστήσω την ομάδα του εν λόγω εργαστηρίου, τους συμφοιτητές μου για την ομαλή και άψογη συνεργασία και ιδιαιτέρως την υπεύθυνη αυτού, κ. Προξενιά Νίκη, για την πολύτιμη καθοδήγησή της και τις διαφωτιστικές συμβουλές της.

Η μεταπτυχιακή φοιτήτρια του τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων κ. Καρανίκα Ελένη καθώς και ο διδακτορικός φοιτητής του εργαστηρίου Οιολογίας κ. Βουκίδης Ιωάννης αποτέλεσαν ιδιαίτερα σημαντική βοήθεια αφού με μύησαν σε πολύπλοκες τεχνικές αναλύσεων μέσω της εμπειρίας τους σε αυτές, Οφείλω να τους ευχαριστήσω ξεχωριστά για την υπομονή τους και την όμορφη συνεργασία.

Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην υπεύθυνη καθηγήτριά μου κα. Καλλίθρακα Σταματίνα, η οποία σε συνεργασία με τον καθηγητή οιολογίας κο. Κοτσερίδη Γεώργιο, μου έδωσαν την ευκαιρία να ασχοληθώ με ένα συναρπαστικό και απαιτητικό θέμα έρευνας. Ο λέκτορας του τμήματος Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου κος Μαλλούχος Αθανάσιος αξίζει ένα θερμό ευχαριστώ για την καθοδήγησή του στις πολύπλοκες τεχνικές της αέριας και υγρής χρωματογραφίας καθώς και για την διάθεση του πολύτιμου του χρόνου.

Οφείλω ένα τεράστιο ευχαριστώ στην οικογένειά μου και τη σύντροφό μου, για την υποστήριξή τους και την αγάπη τους, συναισθήματα τα οποία με βοήθησαν να φέρω εις πέρας την παρούσα έρευνα παρά τις δυσκολίες που προκύπταν.

Τέλος, νιώθω την ανάγκη να δώσω τα εύσημα για την όλη εργασία μου στον μέντορά μου και τον άνθρωπο που με μύησε στο μαγικό κόσμο της οιολογίας, τον οιολόγο, φίλο και πατέρα Διονυσόπουλο Δημήτριο.

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### ΠΟΙΚΙΛΙΑ ΡΟΔΙΤΗΣ

Ο Ροδίτης όντας πολύ διαδεδομένη ποικιλία του ελληνικού αμπελώνα καλλιεργείται σε όλες σχεδόν τις αμπελουργικές περιοχές της Ελλάδας. Εξαιτίας της μεγάλης παραλλακτικότητας που παρουσιάζει η ποικιλία, συναντάται με διάφορες ονομασίες ανά την Ελλάδα επικρατέστερες των οποίων είναι οι ονομασίες Βιολεντό, Αλεπού, Τουρκοπούλα και Κοκκινοστάφυλο, οι οποίες δηλώνουν συγγενείς ποικιλίες ή κλώνους του Ροδίτη κατά πάσα πιθανότητα. Στη παρούσα έρευνα χρησιμοποιήθηκε σταφύλι της ποικιλίας Ροδίτης από την ορεινή Ηλεία.

Η ποικιλία Ροδίτης θεωρείται ζωηρή έως πολύ ζωηρή και πολύ παραγωγική. Στην Ελλάδα το σύστημα μόρφωσης που επικρατεί, σε νέους κυρίως αμπελώνες, είναι αμφίπλευρο γραμμικό Rogat δεχόμενο βραχύ κλάδεμα καρποφορίας. Σε παλαιότερους αμπελώνες συναντάμε πρέμνα μορφωμένα σε σχήμα κυπέλλου. Σε κάθε περίπτωση ο αριθμός των οφθαλμών που αφήνεται στις παραγωγικές μονάδες είναι 2-3. Η ποικιλία ευδοκιμεί σε διάφορους τύπους εδαφών. Ιδανικός τύπος εδάφους όμως είναι το γόνιμο, αρδευόμενο, δροσερό, αργιλοασβεστώδες έδαφος. Ο εδαφικός αυτός τύπος συναντάται σε πολλές περιοχές της Ελλάδας με μέτριο υψόμετρο (0-400m). Η ποικιλία συμβιώνει αρμονικά με όλα τα υποκείμενα που χρησιμοποιούνται στην ελληνική αμπελουργία, παρουσιάζοντας πολύ καλή συμπεριφορά και σε κάθε είδους εμβολιασμό.

Στη βιβλιογραφία αναφέρεται πως στην πλήρη ωρίμανση το γλεύκος της ποικιλίας Ροδίτης παρουσιάζει συγκέντρωση σακχάρων 190-210 g/L, οξύτητα 5,8-7,2 g/L σε τρυγικό οξύ και pH 3,2-3,6. Οι τιμές αυτές δεν διαφέρουν σημαντικά από τις τιμές που καταγράφηκαν στην οινοποίηση της ποικιλίας για τις ανάγκες της παρούσας έρευνας, αν αναλογιστούμε πως επηρεάζονται από τις διάφορες καλλιεργητικές τεχνικές, τις εδαφοκλιματικές συνθήκες και το ύψος της παραγωγής.

Το γλεύκος της ποικιλίας συμμετέχει στην παραγωγή πολλών επιτραπέζιων οίνων καθώς και Οίνων Ονομασίας κατά Παράδοση (Ρετσίνα) και στο κοκκινέλι.



Εικόνα 1 Σταφύλια ποικιλίας Ροδίτη

## ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΣΤΟΥΣ ΟΙΝΟΥΣ

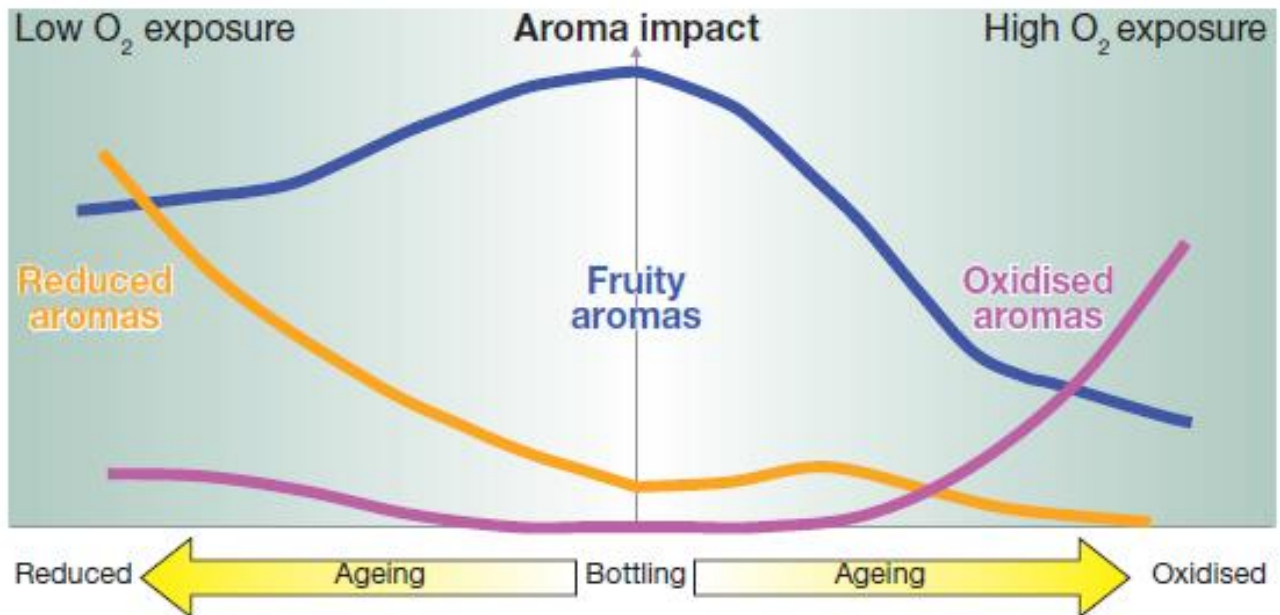
Το οξυγόνο θεωρείται από την πλειονότητα των οινοποιών και οινολόγων ως κύριος εχθρός του οίνου και ιδιαίτερα του λευκού από το στάδιο του σπασίματος της ράγας έως το τελικό προϊόν, τον οίνο. Είναι λοιπόν γεγονός πως, πλην ορισμένων εξαιρέσεων, οι λευκοί οίνοι προστατεύονται από το οξυγόνο, ή καλύτερα από τα οξειδωτικά φαινόμενα κατά τη διάρκεια της οινοποίησης, της ζύμωσης και της συντήρησης. Αυτή η επιβολή αναγωγικών συνθηκών συντελεί στη διατήρηση των αρωμάτων φρούτων, της φρεσκάδας και της ευχάριστης οξύτητας που χαρακτηρίζουν τους φρέσκους λευκούς οίνους, καθώς επίσης και την αποφυγή του «καφετιάσματος», φαινόμενο που παρουσιάζεται ως απόρροια οξειδωτικών φαινομένων. Η διατήρηση αυτών των συνθηκών ευνοεί επίσης την εξέλιξη ευχάριστων αναγωγικών αρωμάτων που δημιουργούνται στους πολυπλοκότερους λευκούς οίνους κατά την παλαίωση στη φιάλη. Βέβαια, η ανάγκη προστασίας από το οξυγόνο κατά τη διάρκεια της ζύμωσης δεν είναι κοινώς αποδεκτή, σε αντίθεση με το στάδιο της διατήρησης του λευκού οίνου μεταζυμωτικά.

Πιο συγκεκριμένα, οι οξειδωτικές αντιδράσεις επηρεάζουν κυρίως το άρωμα, το οποίο αποτελεί ίσως το σημαντικότερο παράγοντα που καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την ποιότητα ενός οίνου, ιδίως λευκού. Ένας μεγάλος αριθμός χημικών ενώσεων με διάφορες μεταβλητότητες και πολικότητες είναι υπεύθυνες για το άρωμα στους οίνους (Arrhenius *et al.*, 1996), καθώς κατά τη διάρκεια της οινοποίησης, αλλά και της παλαίωσης, λαμβάνουν χώρα διάφορες αντιδράσεις και αλληλεπιδράσεις που μπορούν να επηρεάσουν την αντίληψη του αρωματικού δυναμικού.

Ένα από τα μεγαλύτερα οινολογικά προβλήματα στη διάρκεια των λευκών οινοποιήσεων είναι η οξειδωτική αλλοίωση του οίνου εξαιτίας πρόωρων οξειδώσεων. Σε αυτή τη περίπτωση, με εξαίρεση τους οίνους sherry ή τύπου sherry, η ποιότητα του λευκού οίνου θα μειωθεί σημαντικά (Singleton *et al.*, 1979). Η μείωση της ποιότητας οφείλεται στην απομάκρυνση των αρωμάτων φρούτων που προσδίδουν φρεσκάδα καθώς και στην αλλαγή του χρώματος εξαιτίας του «καφετιάσματος». Επιπροσθέτως, εμφανίζονται οξειδωτικά αρώματα τα οποία επιδρούν αρνητικά στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Τέτοια αρώματα περιγράφονται συχνά ως καραμέλας, οξειδωμένου μήλου, ψημένων λαχανικών, ακεταλδεΐδης, αλδεΐδης, σταχίου κ.ά. (Toukis, 1974; Noble *et al.*, 1987, Renouil, 1988, Halliday & Johnson, 1992, Chrisholm *et al.*, 1995, Escudero *et al.*, 2002, Silva Ferreira *et al.*, 2002b). Αυτά τα γνωρίσματα είναι ανεπιθύμητα στο τελικό προϊόν και οι οινολόγοι προσπαθούν κατά τη διάρκεια των οινοποιήσεων να αποφύγουν το σχηματισμό των χημικών ενώσεων που είναι υπεύθυνες γι' αυτά (Coetzee, 2014).

Παρά τις διάφορες μελέτες που έχουν γίνει σχετικά με την ιδανική έκθεση του οίνου στο οξυγόνο ως τελικό προϊόν, δεν υπάρχει ασφαλές συμπέρασμα ώστε να εκθεθεί, αφού υπεισέρχονται διάφοροι παράγοντες που επηράζουν την δημιουργία αρωμάτων (αναγωγικών ή οξειδωτικών) ανάλογα με την ποσοτική έκθεση στο οξυγόνο. Κύριοι μεταξύ αυτών, η ποικιλία του σταφυλιού και ο χαρακτήρας του οίνου. Κοινά αποδεκτή πάντως, είναι η άποψη πως η ελεγχόμενη έκθεση στο οξυγόνο κατά τη παλαίωση ή συντήρηση προστατεύει τα φρουτώδη αρώματα αποτρέποντας τη δημιουργία ενοχλητικών οσμών. Αυτό φαίνεται και στην εικόνα 2, όπου παρατηρείται η μείωση των αρωμάτων φρούτων με την υψηλή έκθεση στο οξυγόνο με ταυτόχρονη εμφάνιση οξειδωτικών αρωμάτων, ενώ σε χαμηλή έκθεση στο οξυγόνο ευνοούνται τα αναγωγικά αρώματα.





Εικόνα 2 Επίδραση του οξυγόνου στο άρωμα εμφιαλωμένων οίνων (Ugliano et al., 2011)

Αν και οι χρωματικές αλλαγές, που συμβαίνουν κατά τη παλαίωση των οίνων, έχουν μελετηθεί και καταγραφεί εκτενώς και σε αρκετά ικανοποιητικό βαθμό, γνωρίζουμε ελάχιστα για τον αντίκτυπο που έχει η οξείδωση στο άρωματικό δυναμικό των λευκών οίνων. Απ' ό,τι φαίνεται, οι σχετικές χημικές αντιδράσεις συμβαίνουν πριν από τον αποχρωματισμό (Li et al., 2008). Εκτός αυτού, οι μελέτες που ερεύνησαν την οξειδωτική αλλοίωση στους οίνους, πραγματοποιήθηκαν κάτω από συνθήκες ταχείας οξείδωσης των οίνων, όπως πολύ υψηλή και απότομη έκθεση αυτών στο οξυγόνο ή χρησιμοποιήθηκαν υψηλές θερμοκρασίες (Ferreira et al., 1997; Z. Lebensm et al., 2011).

Αντιθέτως, τα οξειδωτικά φαινόμενα που συμβαίνουν κατά τη συντήρηση και παλαίωση των λευκών οίνων, λαμβάνουν χώρα σε πιο ήπιες συνθήκες οξείδωσης κι έτσι η σημασία διαφόρων ποσοτήτων οξυγόνου στο ευρύ φάσμα των χημικών ενώσεων και οργανοληπτικών χαρακτήρων που επηρεάζει, χρήζει περαιτέρω έρευνας. Οι αντιδράσεις που συμβαίνουν μεταξύ των αρωματικών ενώσεων και του οξυγόνου κατά τη διάρκεια της παλαίωσης στη φιάλη, πρέπει επίσης να ερευνηθούν περαιτέρω.

Η παρούσα μελέτη, θα επικεντρωθεί στα διάφορα συστατικά ενός τυπικού Ροδίτη και στις αντιδράσεις τους κατά την οξείδωση του οίνου σε διάφορες συνθήκες προστασίας από το οξυγόνο. Επίσης, θα συζητηθούν οι αρωματικές πτυχές ενώ θα εκτεθούν και αποτελέσματα διαφόρων αναλύσεων.

## ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΣΤΟΥΣ ΛΕΥΚΟΥΣ ΟΙΝΟΥΣ

Κατά τη διάρκεια των οινοποιήσεων, το γλεύκος και ο οίνος εκτίθενται σε διάφορα επίπεδα οξυγόνου. Έτσι, η μακροοξυγόνωση αναφέρεται σε υψηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου που διαλύεται κατά τις διάφορες οινοποιητικές τεχνικές, όπως η ανακύκλωση του γλεύκους με τη χρήση αντλίας, ενώ η μικροοξυγόνωση αναφέρεται σε πολύ μικρές ποσότητες οξυγόνου, που υπεισέρχεται, για παράδειγμα κατά τη παλαίωση σε βαρέλια μέσω των πόρων του ξύλου. Υπάρχει και η αναφορά της νανοοξυγόνωσης (ακόμη μικρότερες ποσότητες διαλυόμενου οξυγόνου), που χαρακτηρίζει κυρίως τις οξειδωτικές αντιδράσεις εντός της φιάλης από ενδεχομένως παγιδευμένο αέρα στο λαιμό αυτής.

Σε κάθε οινολογική πρακτική λοιπόν, κατά την οποία υπάρχει επαφή με αέρα θα υπάρξει και διάλυση του οξυγόνου με αποτέλεσμα οι κορεσμένοι σε αυτό οίνοι να εμπεριέχουν περίπου 8 mg/L οξυγόνο σε θερμοκρασίες κελαριού και συνθήκη ατμοσφαιρική πίεση (Singleton *et al.*, 1985). Οι οίνοι είναι ικανοί να καταναλώνουν σημαντικές ποσότητες οξυγόνου, γεγονός που αποδίδεται στο ολικό περιεχόμενο φαινολικών συστατικών, γι' αυτό άλλωστε οι ερυθροί οίνοι είναι περισσότερο επηρεαζόμενοι στη κατανάλωση οξυγόνου από ότι οι λευκοί.

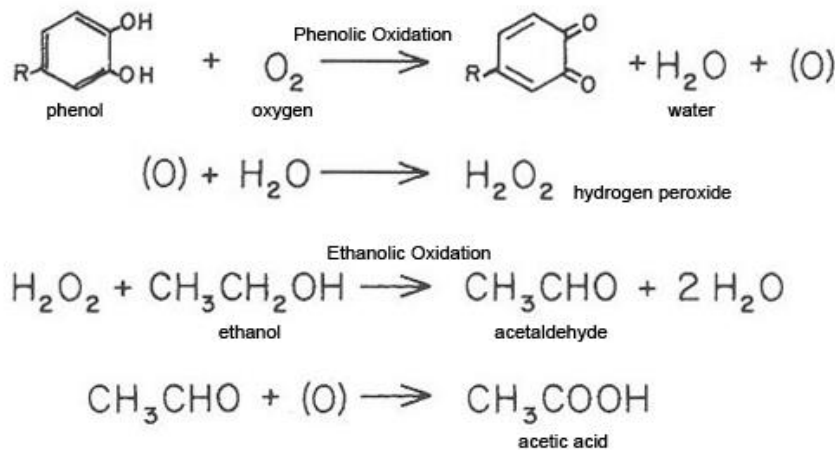
Ο αντίκτυπος των διαφόρων οινολογικών πρακτικών στα επίπεδα του διαλυόμενου οξυγόνου στους οίνους μπορεί να ταξινομηθεί ως “υψηλού εμπλουτισμού” ή “χαμηλού εμπλουτισμού” κατεργασίες (Castellari *et al.*, 2004). Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε πάνω από 500 ερυθρούς και λευκούς οίνους διαπιστώθηκε πως κατεργασίες που εμπλουτίζουν σε οξυγόνο το προϊόν είναι η μετάγγιση, η φυγοκέντρηση, η ψύξη, η συνεχής τρυγική σταθεροποίηση και η εμφιάλωση, με την ψύξη και τη σταθεροποίηση σε χαμηλές θερμοκρασίες να έχουν το μεγαλύτερο αντίκτυπο. Κατά τις παραπάνω κατεργασίες η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου κυμάνθηκε μεταξύ 1-8,5 mg/L. Οι πιο ήπιες, αναφορικά με τον εμπλουτισμό σε οξυγόνο, οινολογικές πρακτικές όπως η χρήση αντλιών, το φιλτράρισμα, η εναλλαγή θερμότητας και η ηλεκτροδιάλυση που προκαλούν κατανάλωση οξυγόνου ως 0,6 mg/L, με το φιλτράρισμα να επιδρά περισσότερο (Castellari *et al.*, 2004).

Η διαλυτότητα του οξυγόνου στον οίνο, εξαρτάται από τη σύνθεσή του, όπως η περιεκτικότητα σε αιθανόλη, αλλά κυρίως από τη θερμοκρασία και τη μερική πίεση του αερίου που πληρεί το χώρο. Σε συνθήκες χαμηλών θερμοκρασιών και όταν χρησιμοποιείται καθαρό οξυγόνο αντί για ατμοσφαιρικό αέρα παρατηρείται η μεγαλύτερη διαλυτότητα οξυγόνου (Waterhouse *et al.*, 2006). Το εύρος όμως των οξειδωτικών αντιδράσεων αυξάνεται με τη θερμοκρασία αναλογικά (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Η επαφή του οίνου με το οξυγόνο μπορεί να ελατωθεί σημαντικά με τη χρήση αδρανών αερίων όπως το άζωτο, το διοξείδιο του άνθρακα και ακόμη και το αργό, προς αντικατάσταση του αέρα στη δεξαμενή ή το βαρέλι.

## ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΟΞΕΙΔΩΣΕΩΝ

Τα οξειδωτικά φαινόμενα στους οίνους μπορεί να είναι είτε χημικής φύσεως είτε ενζυματικής, να καταλύονται δηλαδή από οξειδάσες. Τα φαινόμενα αυτά εκδηλώνονται με αλλαγή του χρώματος των οίνων, κιτρίνισμα έως καφέτιασμα στους λευκούς και εμφάνιση κεραμιδί αποχρώσεων στους ερυθρούς οίνους, ενώ συνοδεύονται και από μεταβολή της οσμής κυρίως λόγω του σχηματισμού ακεταλδεΐδης και της συσσώρευσης εστέρων και αλδεϋδών.

Η καθαρώς χημικής φύσεως οξειδώσεις, στην αποφυγή των οποίων αποσκοπεί και η προστασία των οίνων από το οξυγόνο είναι δύο και αναφέρονται στην οξείδωση της αιθυλικής αλκοόλης προς ακεταλδεΐδη και στην οξείδωση των φαινολικών παραγώγων (εικ. 3). Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται ο τρόπος δημιουργίας  $H_2O_2$  μέσω της οξείδωσης φαινολικής ουσίας κι εν συνεχεία η αντίδραση του προϊόντος με την αιθανόλη προς δημιουργία ακεταλδεΐδης. Περαιτέρω οξείδωση αυτής οδηγεί στο σχηματισμό του ανεπιθύμητου οξικού οξέος.



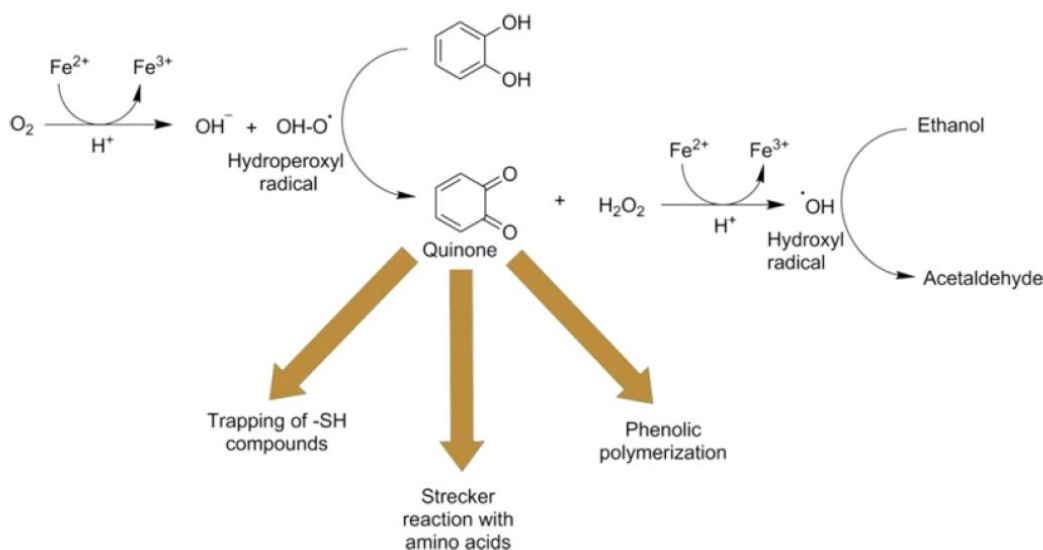
Εικόνα 3 Οξείδωση φαινολικών παραγώγων και αιθυλικής αλκοόλης

Ο σχηματισμός της ακεταλδεΐδης έχει ως συνέπεια οι λευκοί οίνοι να χάνουν την δροσερότητά τους και τη φρεσκάδα τους και να ομοιάζουν με οίνους οξειδωμένους. Απόρροια της δημιουργίας της ακεταλδεΐδης αποτελεί και ο σχηματισμός άλλων αλδεϋδών οι οποίες δεσμεύουν σε σταθερές ενώσεις τον θειώδη ανυδρίτη, που έχει ενδεχομένως προστεθεί στον οίνο για προστασία από οξειδωτικά φαινόμενα, προκαλώντας έτσι τη μείωσή του σε ελεύθερη μορφή.

Ο οξείδωση των φαινολικών παραγώγων είναι ιδιαίτερως σημαντική. Η οξείδωση της αλκοόλης από το οξυγόνο του αέρα δεν διαπιστώνεται σε καθαρά υδατικά διαλύματα, η αλκοόλη όμως, αν και δεν οξειδώνεται άμεσα από το οξυγόνο με το οποίο έρχεται σε επαφή, οξειδώνεται έμμεσα μέσω οξειδωτικών αντιδράσεων, κατά τις οποίες σχηματίζονται υπεροξείδια ή ελευθερώνονται ρίζες οξυγόνου, που είναι πιο δραστικές από το ίδιο το οξυγόνο. Τα φαινολικά παράγωγα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό αυτών των ριζών. Αυτό συμβαίνει διότι ο βενζολικός πυρήνας τους οξειδώνεται με σχηματισμό

κινονών, όπως συμβαίνει και στην περίπτωση του γαλλικού και καφεϊκού οξέως με υδροξυλομάδες σε όρθο θέση. Η παρουσία μετάλλων (Danilewicz *et al.*, 2008) ακόμη και σε ίχνη (ειδικότερα χαλκού και σιδήρου), καταλύουν αυτές τις αντιδράσεις διευκολύνοντας τη μεταφορά ηλεκτρονίων στο οξυγόνο με αποτέλεσμα τη δημιουργία υπεροξειδίων που υπάρχουν πλέον στο pH του οίνου. Αυτά με τη σειρά τους, εξαιτίας της περιορισμένης δραστηριότητας στο περιβάλλον του οίνου, θα αντιδράσουν με φαινολικές ουσίες προς δημιουργία H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και ο-κινόνες που αντέχουν στο pH του οίνου.

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου μπορεί στη συνέχεια να αντιδράσει με ιόντα σιδήρου (εικ. 4) ώστε να παραχθεί ελεύθερη ρίζα υδροξυλίου, η οποία είναι εξαιρετικά δραστική και μπορεί να αντιδράσει με πληθώρα ενώσεων του οίνου, όπως οι αλκοόλες, τα οργανικά οξέα και τα σάκχαρα, ανάλογα τη συγκέντρωσή τους, προκαλώντας το σχηματισμό αλδευδών και κετονών. Σε αυτή την περίπτωση η αιθανόλη θα οξειδωθεί αρχικά προς ακεταλδεΐδη, όπως έχει ήδη αναφερθεί. Η ο-κινόνη είναι ασταθής και πολύ δραστική ένωση. Έτσι, θα αντιδράσει περαιτέρω με χαμηλότερου δυναμικού οξειδοαναγωγής ουσίες, όπως άλλα φαινολικά μόρια, SO<sub>2</sub> και ενώσεις με ομάδα θείου, συμπεριλαμβανομένων της γλουταθειόνης και των αμινοξέων όπως φαίνεται στην εικόνα 4. Αυτή η σειρά των αντιδράσεων μπορεί να προκαλέσει σημαντικές αλλαγές στη σύνθεση του οίνου.



Εικόνα 4 Σχηματισμός ο-κινόνης και περαιτέρω οξειδωτικές αντιδράσεις

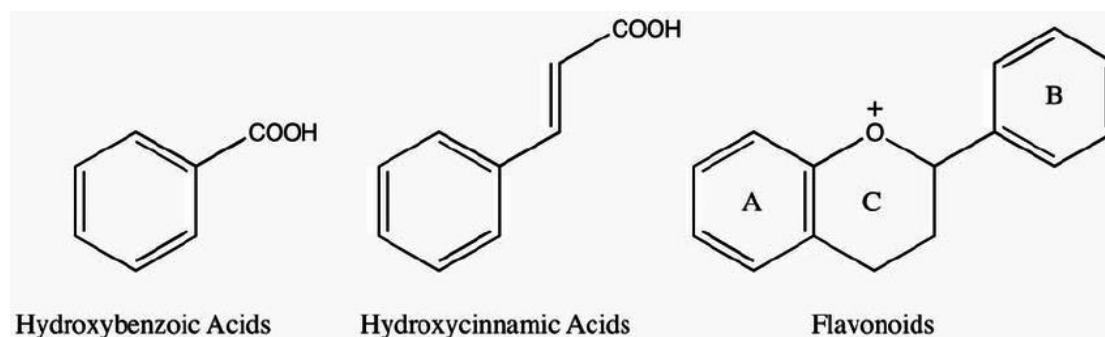
Εκτός από τα φαινολικά, υπάρχουν κι άλλες ουσίες που επεμβαίνουν σε αυτές τις αντιδράσεις, μεταξύ των οποίων το ασκορβικό οξύ το οποίο χρησιμοποιείται από τους οινολόγους ως αντιοξειδωτικό. Το ασκορβικό οξύ εμπεριέχεται φυσικώς στα γλεύκη μέχρι 50 mg/L, αλλά οξειδώνεται κατά τη διάρκεια των πρώτων αερισμών, αρχικά προς δεϋδρο-ασκορβικό οξύ και στη συνέχεια προς υπεροξείδια, τα οποία είναι πιο οξειδωτικά από το οξυγόνο.

## ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

Η συγκέντρωση των φαινολικών ουσιών στο λευκό οίνο εξαρτάται από την ποικιλία του σταφυλιού, τις καλλιεργητικές συνθήκες, το βαθμό ωριμότητας της πρώτης ύλης, τις οινοποιητικές τεχνικές καθώς και από το τις συνθήκες παλαίωσης. Η περιεκτικότητα σε φαινολικές ουσίες στους λευκούς οίνους είναι σαφώς μικρότερη απ' ότι στους ερυθρούς εξαιτίας της διαφορετικής παραγωγικής διαδικασίας που ακολουθείται στους τελευταίους και ευνοεί την εκχύλιση των ουσιών αυτών στο χυμό. Οι φαινολικές ουσίες είναι ισχυροί δότες υδρογόνου κι έτσι καθίστανται ιδανικές ως οξειδωτικό υπόστρωμα (Wilderandt, H.L. & Singleton, V.L., 1974).

### ΜΗ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ

Τα φαινολικά μόρια στο γλεύκος έχουν την προέλευσή τους στο σταφύλι. Χωρίζονται χημικώς σε φλαβονοειδή και μη φλαβονοειδή. Στην κατηγορία των "μη φλαβονοειδών φαινολών" υπάγονται μονομοριακά φαινολικά παράγωγα, τα οποία απαντώνται ευρύτατα στους φυτικούς ιστούς στα διάφορα φυτικά μέρη, από μετρήσιμες ποσότητες ως ίχνη ή παντελή έλλειψη. Η παρουσία τους έχει διαπιστωθεί εκτός από το φλοιό των ραγών και στη σάρκα τους. Η κατηγορία αυτή των φαινολικών ουσιών εκπροσωπείται κυρίως από τα φαινολοξέα, και κυρίως τα παράγωγα του βενζοϊκού και κινναμωνικού οξέος, των οποίων ένα ή περισσότερα υδρογόνα των ατόμων άνθρακα του δακτυλίου έχουν αντικατασταθεί από υδροξυλομάδες (-OH) και μεθόξυ (-OCH<sub>3</sub>) ομάδες, η μοριακή δομή των οποίων φαίνεται στη εικόνα 5.



Εικόνα 5 Μοριακή δομή κύριων φαινολικών ουσιών

Μαζί με τα στυλβένια λοιπόν, τα υδροξυβενζοϊκά και τα υδροξυκινναμωνικά οξέα αποτελούν τα κύρια φαινολικά μόρια στους λευκούς οίνους. Ενώσεις όπως το καφεϊκό οξύ, το πικουμαρικό οξύ, το φερουλικό οξύ και οι εστέρες τους με το τρυγικό οξύ αποτελούν επίσης συνήθη φαινολικές ενώσεις στους λευκούς οίνους. Από τις υπόλοιπες, επικρατέστερη στο γλεύκος και τον οίνο είναι ο υδροξυκινναμωνικός εστέρας του trans-καφταρικού οξέος μαζί με μικρότερες ποσότητες υδροξυβενζοϊκών εστέρων γαλλικού οξέος, βανιλλικού, σαλυκυλικού, συριγγικού και χλωρογενικού. Οι φυσικώς υπάρχοντες, στο γλεύκος και τον οίνο, εστέρες του τρυγικού οξέος είναι ευαίσθητοι στην υδρόλυση απελευθερώνοντας τα αντίστοιχα ελεύθερα υδροξυκινναμωνικά οξέα.

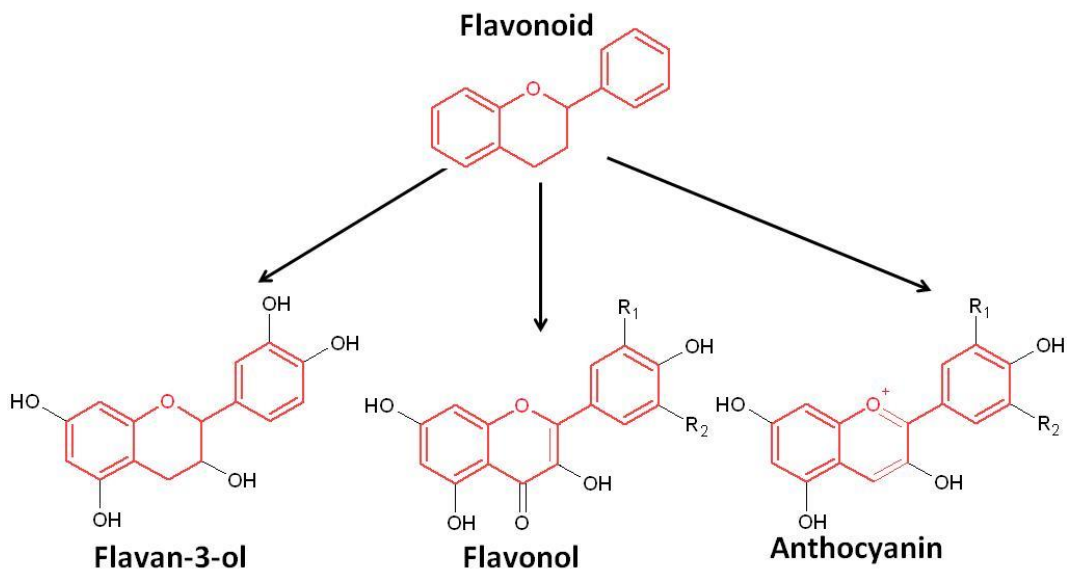
Τα φαινολοξέα λοιπόν απαντούν στα σταφύλια ως ετεροζίτες ή εστέρες. Φαίνεται πως κατά την οινοποίηση και συντήρηση των οίνων, πραγματοποιείται μια βραδεία υδρόλυση. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας των μορφών των φαινολοξέων στους οίνους αφού ανευρίσκονται με τις μορφές που ήδη αναφέρθηκαν, απαντούν όμως κι ελεύθερα. Εμπλουτισμός των οίνων σε φαινολικά οξέα μπορεί να γίνει και μέσω του ξύλου των βαρελιών παλαίωσης.

Πολλά από τα φαινολικά οξέα έχουν αντισηπτικές και συντηρητικές ιδιότητες, ενώ έχουν και αντιβακτηριακή δράση. Στις ποσότητες βέβαια που απαντούν στις σταφυλές δε μπορεί να θεωρηθεί πως επεμβαίνουν στην οινοποιητική τεχνική. Πάρα ταύτα συγκαταλέγονται στους παρεμποδιστές ανάπτυξης των βακτηρίων.

Μία άλλη ιδιότητα των φαινολοξέων και των παραγώγων τους είναι οι ευχάριστες οσμές από τις οποίες χαρακτηρίζονται και μεταφέρουν στον οίνο, μετά από αντιδράσεις οξειδωσης, αναγωγής, υδρόλυσης ή μεθυλίωσής τους. Τέτοιες είναι η γουαϊακόλη, η ευγενόλη, η βανιλίνη, η κωνιφερυλαλδεΰδη κ.ά. Τα βαλσαμικά αρώματα στους οίνους αποδίδονται σε μεγάλο βαθμό στη παρουσία του καφεϊκού και του φερουλικού οξέος, ενώ το χλωρογενικό οξύ, που έχει βρεθεί στον καφέ, μετέχει μάλλον στις εμπυρευματικές οσμές (καμμένο) που παρουσιάζουν ορισμένοι παλαιωμένοι οίνοι. Η οσμή της κουμαρίνης, που θυμίζει φρεσκοκομμένα στάχυα, χαρακτηρίζει το άρωμα οίνων από ώριμα σταφύλια ξηροθερμικών βιοκλιμάτων, όπως πολλά ελληνικά. Επίσης, η χαρακτηριστική οσμή του μελιού, η οποία συναντάται σε αρκετούς ελληνικούς οίνους από καλά ωριμασμένα σταφύλια, οφείλεται στο φαινολο-αιθυλικό οξύ.

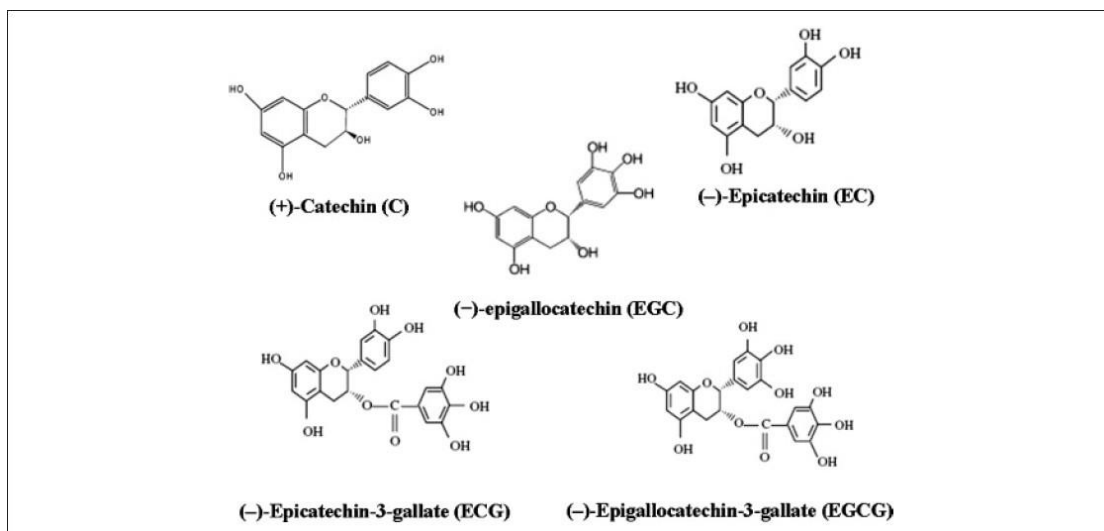
#### ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ

Οι κύριες κατηγορίες φλαβονοειδών που ανευρίσκονται στα σταφύλια και στους οίνους είναι οι φλαβανόλες-3, φλαβονόλες και ανθοκυάνες (εικ.6). Οι ανθοκυάνες είναι σημαντικές χρωστικές ουσίες στα σταφύλια κόκκινων ποικιλιών και είναι γενικά απύσες στους λευκούς οίνους. Άλλη ομάδα φλαβονοειδών που μπορεί να συναντηθεί σε παλαιωμένους σε βαρέλι οίνους είναι οι φλαβανόνες. Ανήκουν στα φαινολικά συστατικά του ξύλου της δρυός και, ως εκ τούτου, η παρουσία τους έχει διαπιστωθεί μόνο σε οίνους που παλαίωσαν σε βαρέλια. Αντίθετα, οι φλαβονόλες είναι πιο διαδεδομένες στη φύση, με τη κερκετίνη να είναι αναμφίβολα το κυρίαρχο φαινολικό συστατικό των φυτών. Οι φλαβονόλες αποτελούνται κυρίως από την κερκετίνη, την καμφερόλη και τη μυρικιτρίνη και βρίσκονται υπό τη μορφή γλυκοζιτών στα σταφύλια και άγλυκων στους οίνους (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Ως ετεροζίτες, υδρολύονται εύκολα κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης.



*Εικόνα 6 Μοριακή δομή κύριων φλαβονοειδών ουσιών*

Άλλη κύρια ομάδα φλαβονοειδών ουσιών που βρίσκονται στα σταφύλια είναι οι κατεχίνες. Οι κατεχίνες είναι υδροξυλιωμένα παράγωγα της φλαβαν-3-όλης, η οποία με τη σειρά της είναι παράγωγο της φλαβονόλης έχοντας τον κεντρικό ετεροκυκλικό δακτύλιο υδρογονομένο. Τα κύρια ισομερή της κατεχίνης που απαντούν στις σταφυλές είναι η (+)-κατεχίνη, η (-)-επικατεχίνη και δύο ρακεμικά τους μείγματα, όπως φαίνεται στην εικόνα 7.



*Εικόνα 7 Μοριακή δομή κύριων κατεχινών*

Η κατεχίνη είναι μία ουσία αρκετά ευοξειδωτη, κύριως λόγω των δύο -OH σε ο-θέση στον πλευρικό βενζολικό δακτύλιο. Όταν θερμανθεί λοιπόν, σε όξινο περιβάλλον, πολυμερίζεται προς ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους ευρύτατα διαδεδομένων στη φύση, τα

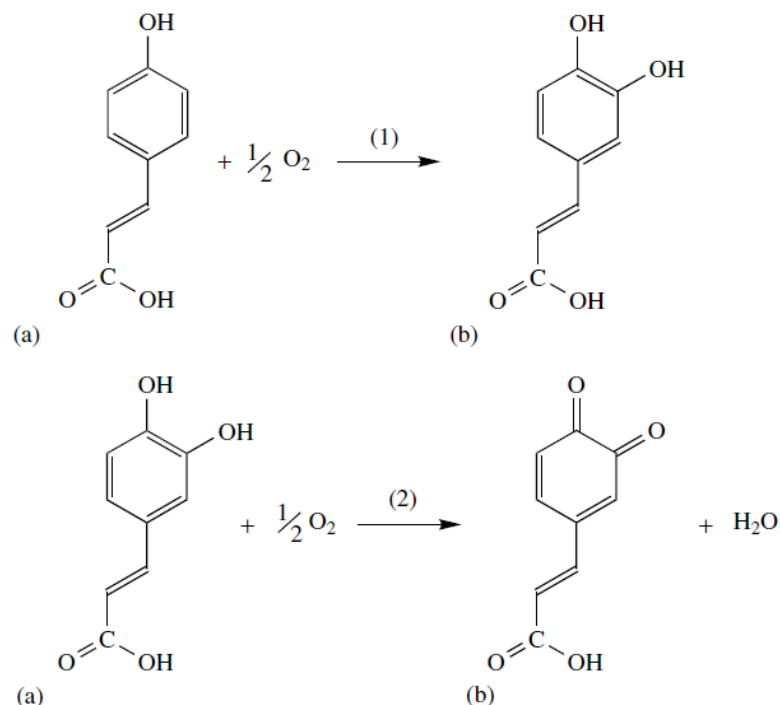
φλοιοβαφένια. Τα διαλύματα αυτά χαρακτηρίζονται αρχικώς από κίτρινο χρώμα. Αυτό αλλάζει αναλόγως το βαθμό πολυμερισμού και σκουραίνει φθάνοντας μέχρι καστανόμαυρους χρωματισμούς. Σε τέτοιας φύσεως οξειδώσεις και συνενώσεις οφείλεται το «καφέτισμα» των οίνων, γι' αυτό η παρουσία κατεχινών στους λευκούς οίνων είναι ανεπιθύμητη.

## ΕΝΖΥΜΑΤΙΚΗ ΟΞΕΙΔΩΣΗ

Η ενζυματική οξείδωση των φαινολικών ουσιών είναι η κύρια αιτία της κατανάλωσης του οξυγόνου στο γλεύκος. Υπεύθυνες είναι δύο χημικές ενώσεις που ανήκουν στην ομάδα των οξειδασών, η τυροσινάση και η λακκάση. Η παρουσία των οξειδασών επιταχύνει σημαντικά την οξείδωση του γλεύκους και του οίνου από το οξυγόνο του αέρα. Η οξειδωτική αυτή δράση είναι πιο έκδηλη στα γλεύκη και τη σταφυλομάζα παρά στους οίνους όπως θα εκτεθεί στη συνέχεια.

Η τυροσινάση και η λακκάση ανήκουν στη χημική ομάδα των πολυφαινολοξειδασών. Η ομάδα χαρακτηρίζεται από τη παρουσία μορίου χαλκού ενωμένου στο πρωτεϊνικό μόριο, το αποένζυμο. Οι οξειδάσες προκαλούν αύξηση της ταχύτητας κατανάλωσης του οξυγόνου από τα γλεύκη. Σε αυτό το στάδιο, η καθαρή χημική οξείδωση είναι ουσιαστικά αμελητέα.

Στα γλεύκη από λευκές ποικιλίες σταφυλιών, η ενζυματική δραστηριότητα επικεντρώνεται στην οξείδωση τρυγικών παραγώγων των υδροξυκιναμωνικών οξέων (1), την πλειοψηφία των φαινολικών ενώσεων στο σταφυλοχυμό. Οι κινόνες που παράγονται (2) είναι ασταθής και ακολουθούν συνήθως δύο μεταβολικές οδούς.



Εικόνα 8 Απεικόνιση της δράσης της τυροσινάσης στα υδροξυκιναμωνικά οξέα (Mayer and Harel, 1979). (1) Δράση κρεσολάσης (a: κουμαρικό οξύ, b: καφεϊκό οξύ) (2) Δράση κετεχολάσης (a: καφεϊκό οξύ, b: κινόνη)

Στην εικόνα 8 απεικονίζονται οι αντιδράσεις οξείδωσης που καταλήγουν στη δημιουργία των δραστικών κινόνων μέσω της δράσης δύο ενζύμων, της κρεσολάσης και της κατεχολάσης.

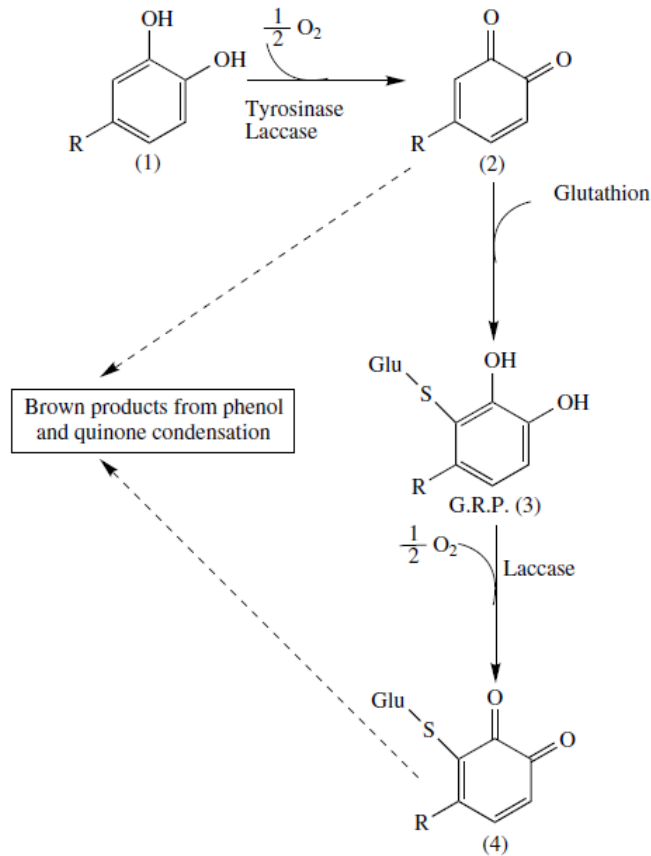


Πρώτον, οι πολύ δραστικές κινόνες που σχηματίζονται μπορούν να προσκολληθούν σε άλλες φαινολικές ενώσεις (φλαβονοειδή), σχηματίζοντας πολυμερισμένα προϊόντα. Το χρώμα αυτών των προϊόντων εξελίσσεται από κίτρινο έως καστανό ανάλογα με το βαθμό συμπύκνωσης (Singleton, V.L., 1987). Δεύτερον, οι σχηματιζόμενες κινόνες είναι ικανές να αντιδράσουν με ισχυρά αναγωγικά μόρια, όπως η γλουταθειόνη. Η αντίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός άχρωμου παράγωγου, της *S*-glutathionyl-2-*trans*-cafeoyltartaric acid γνωστό και ως GRP (Grape Reaction Product). Αυτό το παράγωγο δεν οξειδώνεται περαιτέρω από τη τυροσινάση κι έτσι δεν επηρεάζεται το χρώμα του γλεύκους.

Το “καφέτιασμα” του γλεύκους εξαρτάται βεβαίως από τη συγκέντρωση των φλαβονοειδών ουσιών σε αυτό και κατά συνέπεια από τις μηχανικές κατεργασίες κατά τη διάρκεια της οινοποίησης. Αυτές οι κατεργασίες έχουν επίσης άμεση σχέση με τη διαλυτοποίηση των δεσμών της τυροσινάσης με τους χλωροπλάστες των ραγών των σταφυλιών. Επίσης, η απενεργοποίηση των κινονών από τη γλουταθειόνη αναστέλλει το “καφέτιασμα” του γλεύκους, οπότε, η περιεκτικότητα του γλεύκους σε γλουταθειόνη παίζει εξίσου σημαντικό ρόλο.

Η τυροσινάση, ευρισκόμενη στις ράγες στων σταφυλιών ενωμένη με τους χλωροπλάστες, διαλύεται εν μέρει στο γλεύκος κατά την έκθλιψη των ραγών, ενώ η υπόλοιπη παραμένει ενωμένη στους χλωροπλάστες. Ως εκ τούτου, κατά τη λευκή οινοποίηση, το μέρος εκείνο που βρίσκεται ενωμένο με τους χλωροπλάστες απομακρύνεται κατά την απολάσπωση του γλεύκους. Όταν δε έχει γίνει προσθήκη μπετονίτη προσροφάται σχεδόν όλη η τυροσινάση. Η τυροσινάση των σταφυλιών είναι ενεργό αλλά ασταθές ένζυμο στο pH του γλεύκους (άριστες συνθήκες δραστηριότητας σε pH 4.75). Θερμοκρασίες άνω των 55 °C και προσθήκη διοξειδίου του θείου σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 50 mg/L αναστέλλουν την ενζυματική της δραστηριότητα. Χαμηλότερες συγκεντρώσεις θειώδη ανυδρίτη απλά επηρεάζουν μερικώς το εύρος των οξειδώσεων. Άλλωστε, οι οξειδώσεις που καταλύει η τυροσινάση αφορούν μόνο πολύ ευοξειδωτα συστατικά του γλεύκους κι εκτός αυτού καταστρέφεται κατά μεγάλο μέρος στη διάρκεια αυτών των οξειδώσεων. Γι' αυτόν ακριβώς τον λόγο σε γλεύκη που δεν έχουν θειωθεί η επαφή τους με τον αέρα αυξάνει σε πρώτη φάση τη δράση της τυροσινάσης, αλλά στη συνέχεια η δράση της μειώνεται. Σύντομη δράση του ενζύμου ασκεί θετική επίδραση στους λευκούς και ροζέ οίνους (Stavroura Kourakou – Dragona, 1998, Θέματα Οινολογίας), αφού οι κινόνες που σχηματίζονται ανάγονται στη συνέχεια κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης. Όσο για τις ενώσεις που είναι υπεύθυνες για το “καφέτιασμα” του γλεύκους, προσροφώνται από τις κυτταρικές μεμβράνες των ζυμών και απομακρύνονται με την οινολάσπη κατά την πρώτη μετάγγιση του οίνου. Εξάλλου, αυτή η μερική οξείδωση των γλευκών περιορίζει την τάση για “καφέτιασμα” των οίνων που παράγονται.

Στην εικόνα 9 απεικονίζεται η οξείδωση του καφταρικού οξέος προς την αντίστοιχη κινόνη η οποία με τη σειρά της αντιδρά με GSH σχηματίζοντας το GRP (Grape Reaction Product). Η κινόνη καφταρικού οξέος είναι προϊόν που προκαλεί αμαύρωση φαινομενικά. Σε περίπτωση μολυσμένων σταφυλιών με βοτρυτή το GRP οξειδώνεται περαιτέρω με τη δράση της λακκάσης σχηματίζοντας γλουταθειομένες φαινόλες επίσης σκούρου χρώματος.



Εικόνα 9 Μηχανισμός οξειδωσης σε υγιή σταφύλια από τη τυροσινάση και σε μολυσμένα με βοτρυτή από τη λακκάση (Salgues, 1986)

Τα παραπάνω ισχύουν για υγιή σταφύλια μη προσβεβλημένα από το μύκητα *Botrytis cinerea*. Σε αντίθετη περίπτωση απαντά η λακκάση που εκκρίνεται από το μύκητα. Το ένζυμο αυτό δε συμπεριφέρεται όπως η τυροσινάση. Είναι ανθεκτικό στο όξινο περιβάλλον του γλεύκους και ανθεκτικό στο θειώδη ανυδρίτη. Επί της λακκάσης δεν επιδρούν ούτε ο μπετονίτης, ούτε οι ταννίνες. Όσο για το θειώδη ανυδρίτη, ακόμη και όταν προστεθεί σε μεγάλες συγκεντρώσεις (> 200 mg/L), επιφέρει περιορισμένη αναστολή της δράσης της.

Η λακκάση είναι ικανή να οξειδώσει μεγαλύτερο αριθμό φαινολικών υποστρωμάτων και μορίων που ανήκουν σε άλλες χημικές οικογένειες. Έτσι, είναι ικανή να οξειδώσει το παράγωγο φαινόλης-γλουταθειόνης σε κινόνη. Έτσι, η γλουταθειόνη δεν μπορεί πλέον να αναστείλει τη κινόνη (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Εάν η συγκέντρωση της γλουταθειόνης είναι αυξημένη, η κινόνη μπορεί να αναχθεί εν μέρει σε φαινόλη με τη συνέργεια ενός δεύτερου μορίου γλουταθειόνης. Αυτό το νέο παράγωγο δεν είναι πλέον οξειδώσιμο από τη λακκάση, με αποτέλεσμα τα φαινόμενα οξειδωσης και το αντίστοιχο “καφέτισμα” να περιορίζονται. Η δεύτερη αυτή αντίδραση όμως δεν πραγματοποιείται υπό τη παρουσία του *Botrytis cinerea* (Ribéreau-Gayon, 2006). Τα μολυσμένα σταφύλια περιέχουν κι άλλες οξειδάσες που επίσης καταναλώνουν οξυγόνο (οξειδάση της γλυκόζης, αμινοξειδάσες κ.ά.). Έκθεση του γλεύκους σε θερμοκρασίες άνω των 50 °C καταστρέφει τη λακκάση πολύ πιο γρήγορα από τη τυροσινάση. Σύντομη θέρμανση του γλεύκους ή της σταφυλομάζας για 5 μόνο λεπτά στους 80 °C, έχει ως συνέπεια να χάσει η λακκάση την δραστηριότητά της (Stavroula Kourakou – Dragona, 1998, Θέματα Οινολογίας).

## ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ ΤΟΥ ΓΛΕΥΚΟΥΣ ΑΠΟ ΤΙΣ ΟΞΕΙΔΩΣΕΙΣ

Υπάρχουν διάφορες τεχνικές στα χέρια των οινοποιών ώστε να προστατέψουν το γλεύκος από τα προαναφερθέντα οξειδωτικά φαινόμενα. Οι κυριότερες τεχνικές με αποδεδειγμένα αποτελέσματα που ακολουθούνται είναι οι εξής:

- θείωση του γλεύκους προσφέροντας αντιοξειδωτική και αντιοξειδασική δράση
- προσθήκη ασκορβικού οξέος προσφέροντας αντιοξειδωτική προστασία (10-20 g/hl)
- προσθήκη καθαρής μορφής γλουταθειόνης ή προϊόντα απενεργοποιημένων ζυμομυκήτων με 2-3% καθαρής γλουταθειόνης
- προσθήκη γαλλο-ταννινών για αντιοξειδωτική προστασία (8-10 g/hl)
- ψύξη των σταφυλιών και του γλεύκους προς ελαχιστοποίηση των οξειδωτικών αντιδράσεων
- θέρμανση του γλεύκους στους 60 °C για λίγα λεπτά προς καταστροφή των οξειδασών από προσβεβλημένα με βοτρυτή σταφύλια
- επεξεργασία των σταφυλιών σε τελείως αναγωγικές συνθήκες ώστε να εξαλειφθεί η διαλυτοποίηση του οξυγόνου
- απολάσπωση του γλεύκους πριν την αλκοολική ζύμωση ώστε να απομακρυνθούν στερεά σωματίδια, που σχετίζονται με τη παρουσία τυροσινάσης και να ελαχιστοποιηθεί η οξειδωτική δραστηριότητα στο χυμό
- οινοποίηση σε αδρανή ατμόσφαιρα με χρήση αδρανών αερίων (N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>)
- εφαρμογή προληπτικού κολλαρίσματος με χρήση καζεΐνης (50-100 g/hl), προς αποχρωματισμό και απομάκρυνση των οξειδωμένων πολυφαινολών, ή PVPP (30-50 g/hl) με παρόμοια αποτελεσματικότητα
- κρυοεκχύλιση σε θερμοκρασίες < 0 °C
- υπεροξυγόνωση του γλεύκους

Η θείωση αποτελεί την πλέον εφαρμοζόμενη τεχνική προστασία από ανεπιθύμητες οξειδώσεις του γλεύκους και του οίνου. Είναι η πιο απλή, αποτελεσματική κι εύκολη τεχνική προστασίας. Προσθήκη θειώδους ανυδρίτη σε συγκέντρωση 50 mg/L αρκεί ώστε να καταστραφεί η τυροσινάση. Αν τα σταφύλια είναι υγιή η προσθήκη αυτή αναμφίβολα εμποδίζει την όποια δραστηριότητα ενζυματικής οξείδωσης. Σε χυμούς με έντονο χρώμα, άρα και μεγαλύτερη συγκέντρωση κινονών, η προσθήκη θειώδους συνίσταται να γίνεται σε μεγαλύτερες δόσεις (Stavroula Kourakou – Dragona, 1998, Θέματα Οινολογίας).

Αν και στη συνέχεια θα αναλυθεί η χρήση του θειώδους ανυδρίτη εκτενώς, αξίζει να αναφερθεί στο παρών κεφάλαιο των τεχνικών προστασίας, πως η χρησιμοποιούμενη ποσότητα θειώδους στο γλεύκος πρέπει να προστίθεται ενιαία την ίδια στιγμή, διότι πρέπει να ομογενοποιείται πλήρως στο χυμό. Η θείωση σε μικρότερες των 50 mg/L ποσοτήτων πρέπει να αποφεύγεται, αφού απλά επιφέρει καθυστέρηση των φαινομένων οξείδωσης και του “καφετιάσματος” στο γλεύκος. Η χειρότερη πρακτική, είναι η προσθήκη επαναλαμβανόμενων μικρών δόσεων θειώδη. Σε αυτές τις συνθήκες, η συνολική ποσότητα του οξυγόνου που καταναλώνεται από το χυμό σε επαφή με τον αέρα είναι μεγαλύτερη από ότι σε ένα αθιώτο γλεύκος. Το τελικό χρώμα των δύο χυμών, σε σχέση με την οξείδωση που υπέστησαν, είναι πρακτικά το ίδιο (Stavroula Kourakou – Dragona, 1998, Θέματα Οινολογίας).

Η θείωση των σταφυλιών ευνοεί την εκχύλιση φαινολικών συστατικών από τους φλοιούς. Η προστασία από τις οξειδώσεις με την προσθήκη ασκορβικού οξέος ή γλουταθειόνης δεν παρουσιάζει αυτό το φαινόμενο, αλλά αυτά τα ισχυρά αναγωγικά μέσα δεν είναι

αντιοξειδωτικά. Το ασκορβικό οξύ, όπως συμβαίνει και με τις χαμηλές σε συγκέντρωση δόσεις θειώδη ανυδρίτη, απλά περιορίζει την οξειδωση του χρώματος μέσω της μείωσης των κινονών χωρίς να μειώνει ουσιαστικά την κατανάλωση οξυγόνου. Όταν χρησιμοποιείται ασκορβικό οξύ, η έκθεση των σταφυλιών στον αέρα πρέπει να είναι περιορισμένη. Συνηθίζεται ακόμη και το γέμισμα των δεξαμενών με γλεύκος ή των πνευματικών πιεστηρίων να γίνεται υπό τη προσθήκη ξηρού πάγου στο γλεύκος. Ακόμη και στους κάδους συλλογής χυμού των πιεστηρίων, τα αθείωτα γλεύκη πρέπει να μεταφέρονται άμεσα στις δεξαμενές προς αποφυγή παρατεταμένης έκθεσης στον αέρα. Πάντως, η χρήση ασκορβικού οξέος, έχει δώσει ικανοποιητικά αποτελέσματα και καλύτερη διατήρηση των αρωμάτων στους λευκούς οίνους. Ακόμη βέβαια, ο συνδυασμός του με το θειώδη ανυδρίτη παρέχει καλύτερη προστασία κατά των οξειδωτικών φαινομένων (Stavroula Kourakou – Dragona, 1998, Θέματα Οινολογίας).

Η ψύξη των σταφυλιών και του γλεύκους, είναι μια εξαιρετικά αποτελεσματική τεχνική ώστε να μειωθούν τα οξειδωτικά φαινόμενα και πρέπει να χρησιμοποιείται συστηματικά. Αρκεί να αναλογιστεί κανείς πως η κατανάλωση του οξυγόνου στους 30 °C είναι 3 φορές ταχύτερη απ' ό τι στους 12 °C (Ribéreau-Gayon, 2006).

Η κρυοεκχύλιση (πίεση ολόκληρων ραγών σε θερμοκρασίες < 0 °C) μειώνει σχετικά τα οξειδωτικά φαινόμενα. Αυτή η τεχνική, προάγει το φρουτώδη χαρακτήρα των ξηρών λευκών οίνων σε σύγκριση με την πίεση σταφυλιών σε θερμοκρασίες ατμόσφαιρας. Κατά την κρυοεκχύλιση, σε σύγκριση με κλασσικές μεθόδους, παρατηρείται εντονότερη απελευθέρωση αρωμάτων και πρόδρομων αυτών ουσιών από την απόψυξη των φλοιών, αλλά και μείωση των οξειδωτικών φαινομένων κατά τη λειτουργία του πιεστηρίου.

Η θέρμανση του γλεύκους θεωρητικά καταστρέφει τις οξειδάσες, ειδικά τη λακκάση, αλλά πρέπει να εφαρμοσθεί αμέσως μετά την παραλαβή του χυμού. Με τη καταστροφή των οξειδασών αποφεύγονται οι κίνδυνοι των οξειδωτικών θολωμάτων.

Η θέρμανση συνίσταται να εφαρμόζεται μετά τη θείωση και την απολάσπωση του γλεύκους, γιατί σε αντίθετη περίπτωση παρεμποδίζεται η καθίζηση των στερεών σωματιδίων (Soufleros Euaggelos, 1997). Είναι γεγονός πάντως, πως μαζί με τις οξειδάσες καταστρέφονται και τα πηκτινολυτικά ένζυμα που διευκολύνουν τη φυσική διαύγαση των γλευκών και των οίνων. Η θερμική επεξεργασία πρέπει να γίνεται στους 70-75 °C και να περνάει γρήγορα τους 40-45 °C, θερμοκρασία η οποία ευνοεί τη δράση των οξειδασών (Soufleros Euaggelos, 1997) . Μετά τη θέρμανση, το γλεύκος επαναφέρεται στη θερμοκρασία του περιβάλλοντος και αφήνεται να ζυμωθεί.

Η μέθοδος αυτή πάντως, παρ' ό τι προσφέρει πολύ καλή σταθερότητα στα γλεύκη όσο αφορά την ενζυματική οξείδωση, καθιστά προβληματική τη φυσική διαύγαση του οίνου λόγω καταστροφής των πηκτινολυτικών ενζύμων. Ακόμα και όταν η τεχνική της θερμοοινοποίησης συνοδεύεται από τη ταυτόχρονη προσθήκη πηκτινολυτικών ενζύμων και καλλιέργειας ζυμομυκήτων, δεν επιφέρει πάντα επιθυμητά αποτελέσματα. Έχει διαπιστωθεί σε αρκετές περιπτώσεις αλλοίωση του αρώματος και γεύση αιθέρα στους οίνους που έχουν υποστεί αυτή την επεξεργασία.

Με την οινοποίηση σε αδρανή ατμόσφαιρα έχει διαπιστωθεί βελτίωση της έντασης και της λεπτότητας των αρωμάτων στους λευκούς οίνους. Υπάρχει όμως ένα μεγάλο ρίσκο εφαρμόζοντας τη συγκεκριμένη πρακτική οινοποίησης, αφού τα γλεύκη που προκύπτουν είναι εξαιρετικά ευαίσθητα στο οξυγόνο. Με την πρώτη τους επαφή με αυτό επέρχεται

αλλαγή χρώματος λόγω οξειδώσεως ακυρώνοντας την όποια προηγούμενη προστασία από τα οξειδωτικά φαινόμενα.

Όλες οι μέθοδοι που ήδη αναφέρθηκαν αποσκοπούν στην αποτροπή της επαφής του οξυγόνου με το προϊόν. Η υπεροξυγόνωση είναι μια τεχνική που διέπεται από τελείως αντίθετη λογική. Κατά τη μέθοδο αυτή εφαρμόζεται πρόωρη υπεροξείδωση των ευοξειδωτων συστατικών του γλεύκους με έγχυση 50 mg O<sub>2</sub>/L. Έτσι, η οξείδωση του προκύπτοντος οίνου θα είναι περιορισμένη (Ribereau-Gayon P., 1994. Le vin. Que sais-je? 2eme edition. Presses Universitaires de France). Κατά την υπεροξυγόνωση του γλεύκους, οι φαινολικές ενώσεις δίνουν στο γλεύκος σκούρο χρώμα κι έπειτα ακολουθεί ο πολυμερισμός τους. Τα πολυμερή αυτά καθιζάνουν και απομακρύνονται αργότερα με την απολάσπωση ή/και τη φυγοκέντρηση (Soufleros Euaggelos, 1997). Η μείωση των φαινολικών συστατικών οδηγεί σε μείωση της οξειδωτικής εξέλιξης του προϊόντος με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση του χρώματος των λευκών οίνων. Βέβαια, υπάρχει έντονη διακύμανση στα αρωματικά συστατικά, η οποία εξαρτάται και από την ποικιλία των σταφυλιών. Επίσης οι αλδεϋδικές ενώσεις περιέχονται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με οίνους που δεν προέρχονται από υπεροξυγόνωση.

Αποτέλεσμα της περιορισμένης οξειδωτικής δραστηριότητας είναι η κατάργηση της προσθήκης θειώδους ανυδρίτη πριν τη ζύμωση και η μείωση των απαραίτητων δόσεων του στους οίνους (Bailly Beatrice, 1990).

Τα υπεροξυγονωμένα γλεύκη παρουσιάζουν μεγαλύτερη χρωματική ένταση, η οποία μειώνεται σημαντικά κατά την αλκοολική ζύμωση. Η οξύτητα είναι πιο μικρή στα γλεύκη αυτά, καθώς και οι συγκεντρώσεις τρυγικού και μηλικού οξέος λόγω αύξησης του pH.

Η τεχνική δεν βρίσκει ευρεία εφαρμογή καθώς επηρεάζονται έντονα οι αρωματικοί χαρακτήρες των προκύπτοντων οίνων.

## ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ

Τα πιο κοινά αντιοξειδωτικά που υπάρχουν στους οίνους (εκτός από τις φαινολικές ουσίες) είναι το διοξείδιο του θείου (SO<sub>2</sub>), το ασκορβικό οξύ και η γλουταθειόνη. Αυτές οι ουσίες επεμβαίνουν στην πορεία οξείδωσης των φαινολικών συστατικών, είτε αφαιρώντας το οξυγόνο από τον οίνο είτε αντιστρέφοντας ή μεταβάλλοντας την οξειδωτική διαδικασία.

### ΘΕΙΩΔΗΣ ΑΝΥΔΡΙΤΗΣ (SO<sub>2</sub>)

Η χρήση του θειώδη ανυδρίτη ως συντηρητικού τροφίμων ξεκίνησε εκατοντάδες χρόνια πριν, πιθανότατα από τους Ρωμαίους και τους Αιγυπτίους. Ως τον Μεσαίωνα, τα πλεονεκτήματα της προσθήκης θειώδους στον οίνο ήταν γνωστά, αλλά η χρήση του ήταν παράνομη και επικρίνονταν από πολλούς. Άρχισε να χρησιμοποιείται κανονικά τον 18ο αιώνα, όπως τεκμηριώνεται από ένα χειρόγραφο του 1765, που αποτελεί την πρώτη γνωστή αναφορά για τη συντήρηση των οίνων με θειώδη ανυδρίτη. Συγκεκριμένα αναφέρεται ότι το αέριο που εκλύεται από την καύση "θειάφοκλωστών" χρησιμοποιείται για το θειάφισμα των βαρελιών, κυρίως όμως γιατί διατηρεί τη φρεσκάδα των οίνων επί μακρόν.

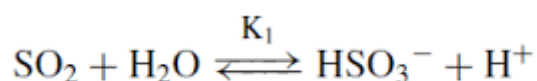
Εξάλλου, η συστηματική πια θείωση των γλευκών - τόσο στις λευκές όσο και στις ερυθρές οινοποιήσεις - επέτρεψε να διαπιστωθούν και άλλες δράσεις του θειώδη ανυδρίτη, καθώς και ορισμένες αρνητικές επιπτώσεις που παρατηρούνται σε περιπτώσεις μη ορθολογικής χρήσης του.

Το θείο, όταν καίγεται στον αέρα, δίνει αέριο διοξείδιο του θείου (SO<sub>2</sub>) ή σωστότερα θειώδη ανυδρίτη.

#### ΜΟΡΦΕΣ ΤΟΥ ΘΕΙΩΔΟΥΣ

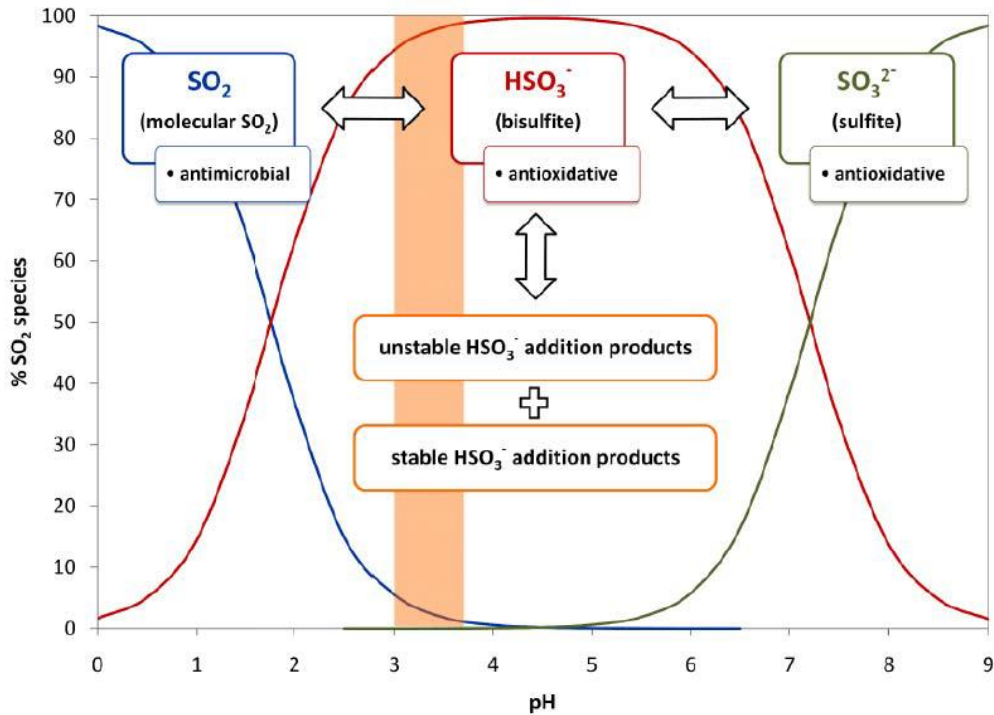
Ο θειώδης ανυδρίτης σε υδατικά διαλύματα με pH 2.8 – 4.2 βρίσκεται στις βασικές δύο μορφές του: τη μοριακή (SO<sub>2</sub>) και τις ιονισμένες: HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, S<sub>2</sub>O<sub>5</sub><sup>2-</sup>. Στον οίνο ο θειώδης ανυδρίτης αντιδρά ή όχι με διάφορες ουσίες που συνυπάρχουν και έτσι προκύπτουν: α) το τμήμα που παραμένει στη μοριακή μορφή (SO<sub>2</sub>), β) το τμήμα όπου δεν υπάρχει πουθενά μοριακός θειώδης γιατί έχει εξουδετερωθεί, γ) το τμήμα που είναι ενωμένος ασταθώς, π.χ. με σάκχαρα, ανθοκυάνες και δ) το τμήμα όπου βρίσκεται ενωμένος μη αντιστρεπτά, π.χ. με την ακεταλδεΐδη.

Όταν προστεθεί θειώδης ανυδρίτης στο γλεύκος ή το κρασί, με την πάροδο του χρόνου αποκαθίσταται μια ισορροπία μεταξύ του μοριακού και του εξουδετερωμένου SO<sub>2</sub>, των οποίων οι συγκεντρώσεις καθώς και η δραστηριότητα εξαρτώνται κυρίως από το pH και τη θερμοκρασία. Η σχέση είναι αντιστρεπτά ίση (εικ. 10).



Εικόνα 10 Αμφίδρομη αντίδραση του θειώδη ανυδρίτη

Όταν η θερμοκρασία αυξάνεται η συγκέντρωση του ανυδρίτη μειώνεται. Όλες οι μορφές του σε ισορροπία είναι γνωστές σαν "ελεύθερος" θειώδης ανυδρίτης. Σε τιμές pH 3,0 - 4,0 (pH κρασιών) η δραστική μορφή που είναι η μοριακή αντιπροσωπεύει πολύ μικρό ποσοστό. Οι μορφές του θειώδη ανυδρίτη σε διαφορετικές τιμές pH παρουσιάζονται στην εικόνα 11.



Εικόνα 11 Κατανομή των μορφών του SO<sub>2</sub> σε διάφορες τιμές pH (Herbst, 2010)

Εξάλλου οι ελεύθερες μορφές του είναι δυνατόν να αντιδράσουν με πολλές ουσίες που βρίσκονται στο γλεύκος και στον οίνο, αντιστρεπτά ή όχι, όπως αλδεΐδες, κετόνες, πηκτικές ουσίες, πρωτεΐνες, σάκχαρα κ.λπ, δίνοντας αντιδράσεις προσθήκης. Έτσι έχουμε τον "ενωμένο" θειώδη ανυδρίτη. Τα σάκχαρα παίζουν μικρό ρόλο στη διαδικασία δέσμευσης του θειώδη, όπως και κάποια οξέα. Με την ακεταλδεΐδη όμως ενώνεται μη αντιστρεπτά.

Το σύνολο του "ελεύθερου" και του "ενωμένου" θειώδους μάς δίνει το "ολικό" θειώδες που έχει προστεθεί σε γλεύκος και οίνο.

Οι περισσότερες ιδιότητες που αποδίδονται στο θειώδη ανυδρίτη (αντιοξειδωτικές, διαλυτικές, διαυγαστικές, κ.λπ) οφείλονται αποκλειστικά στον ελεύθερο θειώδη. Όσο για τις αντιμικροβιακές του ιδιότητες, το πιο δραστικό τμήμα του ελεύθερου θειώδη έναντι των βακτηρίων είναι ο μοριακός SO<sub>2</sub>, ο μόνος εξάλλου που επιδρά επί των ζυμών, αφού μόνο αυτός έχει την ικανότητα να διέρχεται από την ημιπερατή μεμβράνη των κυττάρων τους (Stavroula Kourakou – Dragona, 1998, Θέματα Οινολογίας).

Ο ενωμένος SO<sub>2</sub> είναι ανενεργός, δεν έχει καμία από τις πολύτιμες ιδιότητες του ελεύθερου SO<sub>2</sub> γι' αυτό θεωρείται "παθητικός". Αυξάνει τον ολικό θειώδη ανυδρίτη χωρίς να προσφέρει ουσιαστικές υπηρεσίες. Παρά ταύτα, οι ασταθείς ενώσεις του θειώδη ανυδρίτη δεν είναι άχρηστες, γιατί αποθηκεύουν τον θειώδη που τον αποδίδουν υδρολυόμενες όταν επέρχεται μείωση του ελεύθερου SO<sub>2</sub> στους οίνους, κυρίως λόγω οξειδωσης. Τέτοιες ενώσεις είναι η ένωση γλυκόζης-SO<sub>2</sub> και οι ενώσεις του θειώδη ανυδρίτη με τις ανθοκυάνες. Γι' αυτό η μεν πρώτη προστατεύει αποτελεσματικά κατά των οξειδώσεων τόσο τους ξηρούς οίνους που έχουν υποστεί γλύκανση, όσο τους γλυκούς οίνους όταν έχουν θειωθεί σωστά, οι δε δεύτερες τους ερυθρούς ξηρούς οίνους.

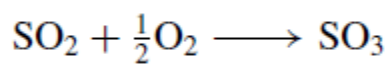
## ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

### Αντιμικροβιακή δράση

Ο θειώδης ανυδρίτης επιδρά επί της ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Έχει μεγαλύτερη δράση επί των βακτηρίων απ' ό τι στις ζύμες. Σε περιορισμένες ποσότητες η δράση αυτή είναι παροδική. Σε υψηλές συγκεντρώσεις καταστρέφει ένα ποσοστό του μικροβιακού πληθυσμού. Η δραστηριότητα μιας συγκεκριμένης συγκέντρωσης θειώδη αυξάνει με τη μείωση του αρχικού μικροβιακού πληθυσμού μέσω της απολάσπωσης ή του φιλτραρίσματος του γλεύκους. Κατά τη συντήρηση των οίνων ο θειώδης παρεμποδίζει την ανάπτυξη όλων των μικροβιακών τύπων (ζύμες, γαλακτικά βακτήρια και σε λιγότερη έκταση τα οξικά), προλαμβάνοντας το σχηματισμό θολωμάτων από τις ζύμες, μια ενδεχόμενη δεύτερη ζύμωση στη φιάλη στους γλυκούς οίνους, μόλυνση από Βρεττανομύκητα και τον επακόλουθο σχηματισμό αιθυλ-φαινόλης, την ανάπτυξη υμενίου (άνθηση) καθώς και τις περισσότερες βακτηριακές προσβολές.

### Αντιοξειδωτική/αντιοξειδασική δράση

Ο θειώδης ανυδρίτης ασκεί άμεση κι έμμεση αντιοξειδωτική προστασία. Άμεση, διότι ο ίδιος ο ελεύθερος SO<sub>2</sub> οξειδώνεται εύκολα και λειτουργεί έτσι ως οξειδωτικό υπόστρωμα προφυλάσσοντας τα υπόλοιπα ευοξειδωτα συστατικά (εικ. 12). Η αντίδραση οξείδωσής του είναι αργή και προστατεύει το γλεύκος από τις χημικές οξειδώσεις των φαινολικών και αρωματικών του συστατικών. Επίσης, καθιερώνει ένα χαμηλό σχετικά οξειδοαναγωγικό δυναμικό στον οίνο, προστατεύοντας την ομαλή εξέλιξη των αρωμάτων και της γεύσης κατά τη συντήρηση και παλαίωση του οίνου.



Εικόνα 12 Αντίδραση οξείδωσης του θειώδη ανυδρίτη

Η έμμεση δράση του συνίσταται στην οξειδασική του ικανότητα. Απενεργοποιεί τις οξειδάσες, κυρίως τη τυροσινάση, που καταλύουν τις ενζυματικής φύσεως οξειδώσεις.

### Δημιουργία σταθερών δεσμών με αλδεΐδες

Η αντιαλδεΐδική δράση του θειώδη συνίσταται στην ικανότητά του να αντιδρά με την ακεταλδεΐδη και λοιπές αλδεΐδες προς σταθερές ενώσεις, αποκαθιστώντας έτσι τους οργανοληπτικούς χαρακτήρες των οίνων. Οι αλδεΐδες, σχηματίζονται από την οξείδωση των αλκοολών του οίνου και επιδρούν αρνητικά στο αρωματικό δυναμικό των οίνων και την πολυπλοκότητά τους, ενώ δίνουν και το χαρακτήρα “αερισμένων” οίνων.

Οι υπόλοιπες κύριες δράσεις του θειώδη ανυδρίτη μπορούν να συνοψισθούν στην όξινη δράση του, επηρεάζοντας θετικά την ολική οξύτητα των οίνων, τη διαυγαστική του δράση, άμεση κι έμμεση. Άμεση διότι ορισμένα κολλοειδή με μεγάλο μοριακό βάρος καθιζάνουν υπό την παρουσία του, κι έμμεση διότι προκαλεί καθυστέρηση έναρξης αλκοολικής ζύμωσης δίνοντας τον απαραίτητο χρόνο για απολάσπωση. Επίσης, οι ενώσεις του με σάκχαρα, κυρίως της γλυκόζης, δημιουργούν “αποθήκες” θειώδη ανυδρίτη όπως και οι ενώσεις του με τις ανθοκυάνες σε ερυθρούς οίνους. Το ίδιο συμβαίνει και σε μικρές συγκεντρώσεις της ένωσής του με πυροσταφυλικό οξύ (Stavroula Kourakou – Dragona, 1998, Θέματα Οινολογίας).

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω η χρήση του θειώδους ανυδρίτη σε όλα τα στάδια της οινοποίησης είναι απολύτως δικαιολογημένη.

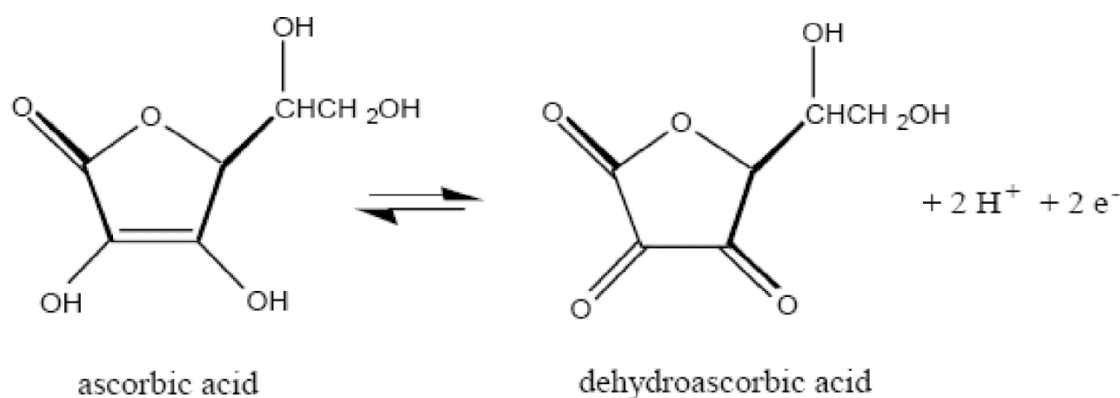


## Ασκορβικό οξύ

Το ασκορβικό οξύ ή βιταμίνη C, βρίσκεται στη φύση στα φρούτα. Στο σταφύλι βρίσκεται σε μικρές ποσότητες της τάξεως των 50 mg/l στο χυμό. Κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης και των πρώτων αερισμών του γλεύκους αυτή η ποσότητα καταναλώνεται, οπότε γενικά δεν συναντάται σαν ουσία στους οίνους.

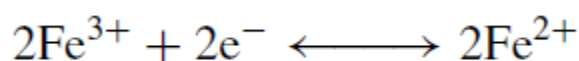
Το ασκορβικό οξύ χρησιμοποιείται στις οινολογικές πρακτικές ως αναγωγικό μέσο. Κυρίως, προστίθεται στους λευκούς οίνους πριν την εμφιάλωση. Μπορεί να δράσει ταχύτατα με το μοριακό οξυγόνο που βρίσκεται στη φιάλη και ως εκ τούτου να αποτρέψει την οξειδωτική αλλοίωση του χρώματος ενώ θα αυξήσει και το χρόνο συντήρησης του λευκού οίνου (Kielhöfer, E. & Würdig, G., 1958).

Ο μηχανισμός οξείδωσης (εικ. 13) του ασκορβικού οξέος είναι σχετικά απλός. Λειτουργεί σαν ένα σύστημα οξειδοαναγωγής. Η οξειδωμένη του μορφή είναι το δευδροασκορβικό οξύ.



Εικόνα 13 Αντίδραση οξείδωσης του ασκορβικού οξέος

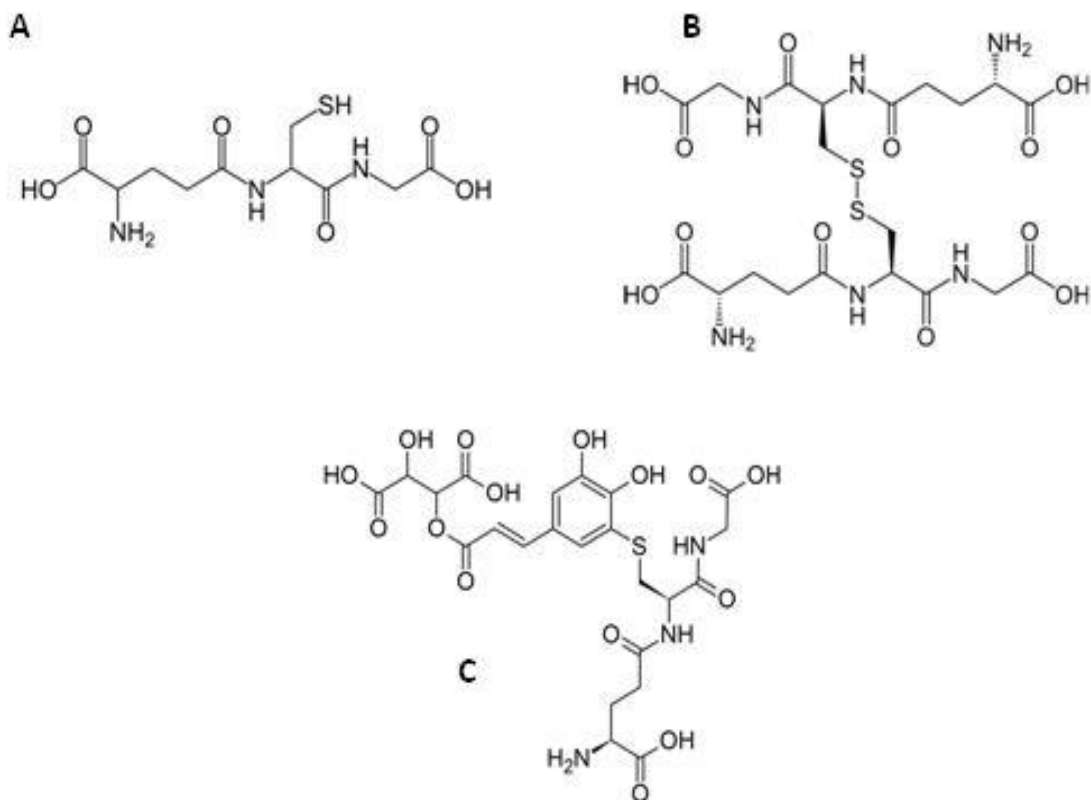
Θεωρητικά η αντίδραση είναι αμφίδρομη, αλλά λόγω της αστάθειάς του το δευδροασκορβικό οξύ εξαφανίζεται. Τα δύο ηλεκτρόνια που εμφανίζονται ανάγουν συστατικά του οίνου και συγκεκριμένα τα ιόντα σιδήρου σύμφωνα με τη παρακάτω αντίδραση.



Εικόνα 14 Αντίδραση αναγωγής ιόντων σιδήρου από ελεύθερα ηλεκτρόνια

Η αποτελεσματικότητα του ασκορβικού οξέος ενάντια στο σιδηρικό θόλωμα που προκαλείται αποκλειστικά από το τρισθενές σίδηρο (Fe<sup>3+</sup>) εξηγείται από την παραπάνω αντίδραση. Η δέσμευση των ελεύθερων ηλεκτρονίων από τον τρισθενές σίδηρο είναι άμεση, οδηγώντας σε δισθενή μορφή σιδήρου η οποία δεν προκαλεί θόλωμα στους οίνους.





Εικόνα 16 Μοριακές δομές της γλουταθειόνης (Α), δισουλφίου της γλουταθειόνης (Β) και GRP (C)

Η γλουταθειόνη είναι η πιο σύνηθες μη πρωτεϊνικής φύσεως ενδοκυτταρική θειόλη παρούσα στα περισσότερα θηλαστικά και αρκετούς προκαρυωτικούς οργανισμούς (Anderson *et al.* 1989). Μέσα στους οργανισμούς η γλουταθειόνη υπάρχει σε δύο καταστάσεις, την ανηγμένη (GSH) και την οξειδωμένη (GSSG). Στην πρώτη, η υδροθειομάδα (SH) της κυστεΐνης είναι ικανή να δώσει ένα αναγωγικό ισοδύναμο ( $H^+ + e^-$ ) σε άλλα ασταθή μόρια, όπως οι δραστικές ρίζες του οξυγόνου. Με την παροχή ενός ηλεκτρονίου η ίδια η γλουταθειόνη καθίσταται δραστική, αλλά γρήγορα αντιδρά με ένα άλλο μόριο δραστικής γλουταθειόνης και σχηματίζει διθειούχο γλουταθειόνη (GSSG). Έτσι, προσδίδονται στη γλουταθειόνη μοναδικές αντιοξειδωτικές και νουκλεοφιλικές ιδιότητες. Γενικά, περισσότερο από το 90% της γλουταθειόνης βρίσκεται στα κύτταρα υπό την ανηγμένη μορφή της (Li *et al.* 2004). Είναι δυνατόν ακόμη, με δαπάνη NADPH η GSSG να αναχθεί σε GSH από το ένζυμο ρεδοουκτάση της γλουταθειόνης (Carmel-Harel O. & Storz G., 2000).

#### Η γλουταθειόνη στα σταφύλια

Προσδιορίστηκε στα σταφύλια για πρώτη φορά το 1989 (Cheynier *et al.*, 1989). Αυτή η μελέτη πραγματοποιήθηκε με στόχο την διαπίστωση της παρουσίας της γλουταθειόνης στο σταφύλι και το γλεύκος 28 ποικιλιών *Vitis vinifera* και τη ποσοτική της ανάλυση. Η συγκέντρωσή της GSH κυμάνθηκε μεταξύ 17-114 mg/kg στα σταφύλια των διάφορων ποικιλιών. Αυτή η διαφοροποίηση εξηγείται, εκτός από τις διαφορές που παρουσιάζουν μεταξύ τους οι ποικιλίες, από τον τρόπο, από τη διαφορετική τοποθεσία των αμπελώνων και γενικά από τις

διαφορετικές τεχνολογικές πρακτικές που επηρεάζουν τη συγκέντρωση της GSH. Είναι γνωστό πως η γλουταθειόνη συντίθεται στο κυτοσόλιο και τους χλωροπλάστες των φυτικών κυττάρων (Leustek *et al.*, 2000). Ο μηχανισμός όμως της συσσώρευσης της γλουταθειόνης στους καρπούς δεν είναι ακόμη πλήρως γνωστός (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006), οπότε απαιτείται περισσότερη έρευνα σε αυτό το τομέα.

Έχει παρατηρηθεί πως η συγκέντρωση της γλουταθειόνης αρχίζει να αυξάνει παράλληλα με την έναρξη ωρίμανσης των σταφυλιών στις ποικιλίες οινοποίησης. Η αναλογική αυτή σχέση παύει όταν τα σταφύλια αγγίξουν τους 16 °Brix (Adams & Liyanage, 1993), οπότε και η συγκέντρωση της γλουταθειόνης παραμένει σταθερή. Τα επίπεδα της GSH στα σταφύλια σχετίζονται στενά με το επίπεδο του αζώτου στα πρέμνα το οποίο αξιολογείται από τη περιεκτικότητα του χυμού σε αφομοιώσιμο από τις ζύμες άζωτο. Καθυστερημένη εφαρμογή αζωτούχου λίπανσης κατέληξε σε απόδοση εξαπλάσιας συγκέντρωσης αφομοιώσιμου από τις ζύμες αζώτου σε σχέση με το μάρτυρα. Επίσης, το γλεύκος περιείχε αυξημένες συγκεντρώσεις GSH και πρόδρομων ουσιών κυστεΐνης (Choné *et al.*, 2006). Σε αυτή τη μελέτη, τα επίπεδα της GSH σε γλεύκος που προήλθε από πρέμνα με έλλειψη αζώτου ήταν σαφώς χαμηλότερα σε σχέση με αυτά του γλεύκους από πρέμνα που λιπάνθηκαν μετά την άνθηση. Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν και από άλλη μελέτη (Lacroux *et al.*, 2008), όπου εκτιμήθηκε η επίδραση των διαφυλλικών εφαρμογών του αζώτου (LEAFN) και του θειϊκού αζώτου (LEAFNS) στα επίπεδα της γλουταθειόνης και των πτητικών θειολών στους οίνους. Αμφότερες οι εφαρμογές, είχαν ως αποτέλεσμα γλεύκος με μεγαλύτερη συγκέντρωση αφομοιώσιμου από τις ζύμες αζώτου και GSH σε σχέση με το μάρτυρα.

#### *Η γλουταθειόνη στο γλεύκος και τον οίνο*

Η περιεκτικότητα της γλουταθειόνης στο γλεύκος είναι ευμετάβλητη. Έχουν αναφερθεί συγκεντρώσεις σε γλεύκος μεταξύ 0,001-100 mg/L (Cheynier *et al.*, 1989; Park *et al.*, 2000a). Υπάρχουν αρκετοί παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν τη συγκέντρωση της GSH στο γλεύκος. Τέτοιοι είναι τα επίπεδα έκθεσης στο οξυγόνο, η δράση της τυροσινάσης και γενικά οι προζυμωτικές διεργασίες στο σταφύλι μέχρι το πιεστήριο. Σε πρόσφατη μελέτη των Du Toit *et al.* (2007) μελετήθηκε η επίδραση των συνθηκών οινοποίησης (οξειδωτικές ή αναγωγικές) στα επίπεδα της συγκέντρωσης της γλουταθειόνης στο γλεύκος και τον αντίστοιχο οίνο λευκών ποικιλιών της Νοτίου Αφρικής. Η οινοποίηση υπό αναγωγικές συνθήκες είχε ως αποτέλεσμα μεγαλύτερες συγκεντρώσεις γλουταθειόνης στο γλεύκος και τον οίνο σε σχέση με το μάρτυρα και το προϊόν μετά από οινοποίηση υπό οξειδωτικές συνθήκες.

Η εξέλιξη της γλουταθειόνης κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης παρουσιάζει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον καθώς τα μέχρι στιγμής αποτελέσματα μελετών είναι αντικρουόμενα. Πάντως, σε γλεύκη από 8 λευκές ποικιλίες, οι Park *et al.* (2000a,b) αναφέρουν αύξηση της συγκέντρωσης της GSH κατά το τελικό στάδιο της αλκοολικής ζύμωσης. Οι Dubourdieu & Lavigne (2004) παρατήρησαν σχεδόν αφανισμό της γλουταθειόνης κατά την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης σε γλεύκος από Sauvignon Blanc που ακολουθήθηκε από σεβαστή αύξηση της κατά το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης. Το αποτέλεσμα αυτό συνάδει με τα ευρήματα των Park *et al.* (2000a,b). Στη συγκεκριμένη μελέτη, καταγράφηκε η σταθεροποίηση της αυξανόμενης ποσότητας γλουταθειόνης μετά το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης εντός 30 ημερών.

Στους οίνους, άλλοι μελετητές (Du Toit *et al.*, 2007; Coetzee, 2011), αναφέρουν πως τα επίπεδα της γλουταθειόνης ήταν μικρότερα σε σχέση με το γλεύκος από το οποίο προήλθαν. Ο Janes *et al.* (2010) αναφέρει πως σε 28 οίνους Sauvignon blanc ο μέσος όρος συγκέντρωσης της γλουταθειόνης ήταν 12,5 mg/L. Σημαντική επιρροή στη τελική συγκέντρωση της γλουταθειόνης στους οίνους φαίνεται να έχει και το στέλεχος του επιλεγμένου ζυμομύκητα (Lavigne *et al.*, 2007; Rauhut, 2009). Οι Dubourdieu & Lavigne (2004) συμπέραναν πως οι ζυμομύκητες μεταβολίζουν τη GSH κατά την εκθετική φάση ανάπτυξής τους και την απελευθερώνουν στο τέλος της αλκοολικής ζύμωσης μέσω της αυτόλυσής τους.

Κατά την παλαίωση των οίνων η συγκέντρωση της GSH φαίνεται να μειώνεται (Lavigne *et al.*, 2007; Ugliano *et al.*, 2011). Οι λεπτές οινολάσπες που περιέχουν κύτταρα ζυμομυκήτων φαίνεται να προστατεύουν τα επίπεδα της γλουταθειόνης (Lavigne *et al.*, 2007). Κατά τη διάρκεια της παλαίωσης σε ξύλινα βαρέλια, βρέθηκε πως οίνοι μη απολασπωμένοι περιείχαν μεγαλύτερη συγκέντρωση GSH από τους αντίστοιχους μεταγγισμένους οίνους. Οι λεπτές οινολάσπες φαίνεται να προστατεύουν μέσω των αναγωγικών τους ιδιοτήτων της οξειδωσης της GSH. Επιπρόσθετα, οι μεταγγισμένοι οίνοι που παλαίωσαν σε καινούρια βαρέλια παρουσίασαν μεγαλύτερη μείωση στα επίπεδα της γλουταθειόνης, εξαιτίας της έκθεσης στο οξυγόνο μέσω των πόρων του καινούριου ξύλου (Lavigne *et al.*, 2007).

Η συγκέντρωση της GSH στους οίνους επηρεάζεται και κατά τη συντήρηση στη φιάλη από τα διάφορα επίπεδα έκθεσης στο οξυγόνο (Ugliano *et al.*, 2011). Οίνοι Sauvignon blanc που εκτέθηκαν σε χαμηλότερα επίπεδα οξυγόνου κατά την παλαίωση στη φιάλη, είχαν περισσότερη συγκέντρωση γλουταθειόνης από οίνους με μεγαλύτερη έκθεση στο οξυγόνο.

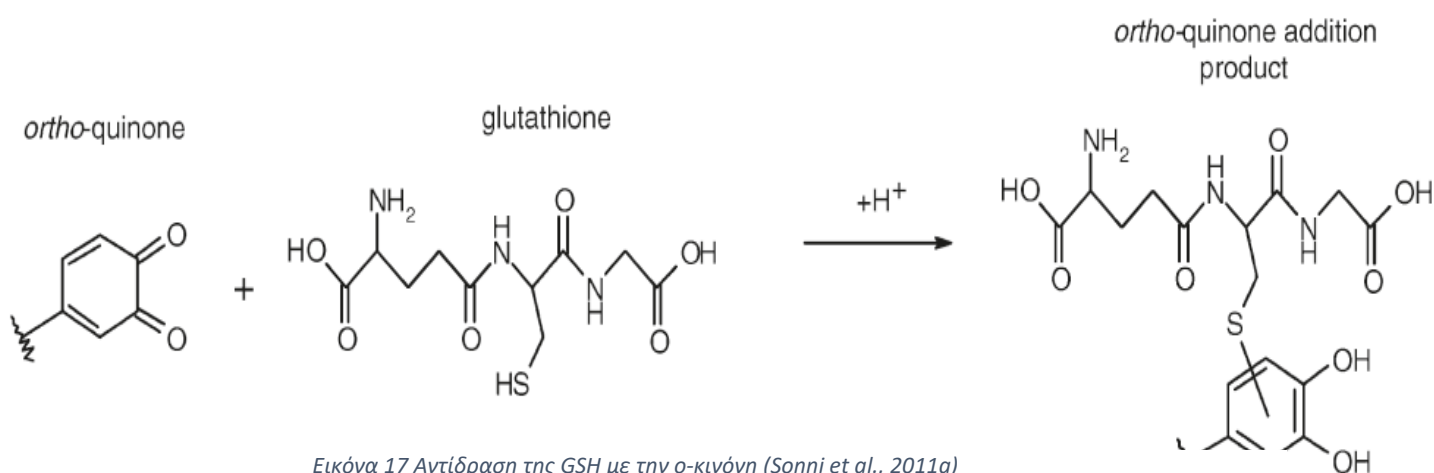
#### Αντιοξειδωτικές δράσεις GSH

##### *Αναστολή οξειδωτικής αμαύρωσης*

Το “καφέτιασμα”, είναι αποτέλεσμα οξειδωσης που συμβαίνει κατά την οινοποίηση του γλεύκους κι επηρεάζει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου όπως το χρώμα, το άρωμα και τη γεύση (Li *et al.*, 2008). Όπως έχει ήδη αναφερθεί, υπεύθυνες φαινολικές ουσίες για την οξειδωτική αμαύρωση στους οίνους είναι οι ορθοδιφαινόλες. Το οξειδωτικό αυτό φαινόμενο είναι αποτέλεσμα είτε ενζυμικής φύσεως οξειδωσης, που συμβαίνει αποκλειστικά στο γλεύκος, ή χημικής οξειδωσης, η οποία συμβαίνει κυρίως κατά την παλαίωση του οίνου (Oliveira *et al.*, 2011).

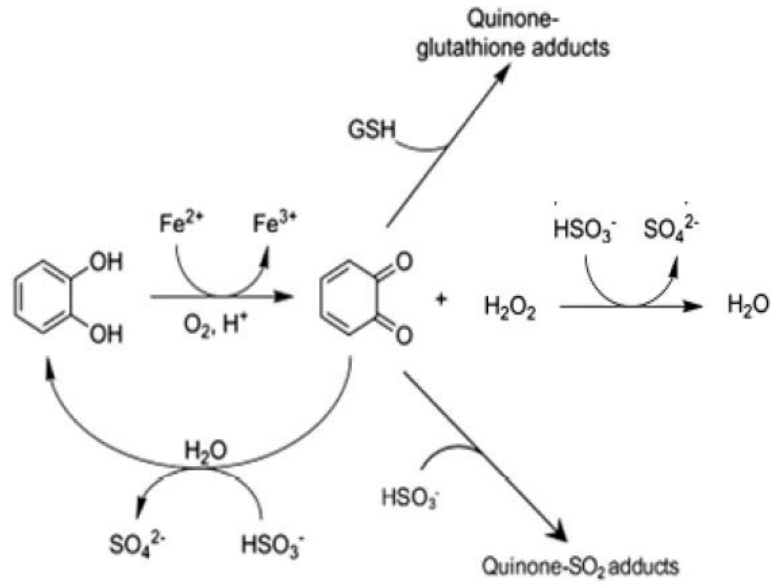
Η ενζυμική οξειδωση ξεκινά όταν η προστασία της φύσεως παύει να υφίσταται. Αυτό συμβαίνει κυρίως κατά την πίεση των σταφυλιών όταν σπάει ο φλοιός, οπότε τα υδροξυκιναμωνικά οξέα που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα των φυτικών κυττάρων, έρχονται σε επαφή με το καταλυτικό της ενζυμικής οξειδωσης ένζυμο των σταφυλιών, την πολυφαινολοξειδάση (PPO). Κατά την εξαγωγή του χυμού λοιπόν, υπό την παρουσία οξυγόνου, η PPO μετατρέπει τα υδροξυκιναμωνικά οξέα στις αντίστοιχες ηλεκτρονιόφιλες όρθο-κινόνες (Singleton *et al.*, 1985). Με τη δράση της κρεσολάσης της PPO το κουταρικό οξύ αρχικά μετατρέπεται σε καφεουλ-τρυγικό εστέρα, πριν οξειδωθεί περαιτέρω σε κινόνη (Singleton *et al.*, 1985). Σε αυτό το σημείο συναντάται η αντιοξειδωτική δράση της γλουταθειόνης, η οποία με την θειϊκή ομάδα που διαθέτει δρα ως νουκλεόφιλο μόριο, αντιδρώντας με τον ηλεκτρονιόφιλο δακτύλιο της κινόνης τρυγικού εστέρα (εικ. 17).

Μετά την αντίδραση της GSH μπορεί να δημιουργηθεί το GRP (Grape Reaction Product, εικ. 19), ένας θειοαιθέρας γνωστός και ως 2-S-glutathionyl caftaric acid. Το προϊόν αυτό δεν είναι οξειδωσιμο από την PPO. Έτσι, η γλουταθειόνη δεσμεύει τις ορθοκινόνες σε μια άχρωμη μορφή και η οξειδωτική αμαύρωση εμποδίζεται (Singleton *et al.*, 1985).

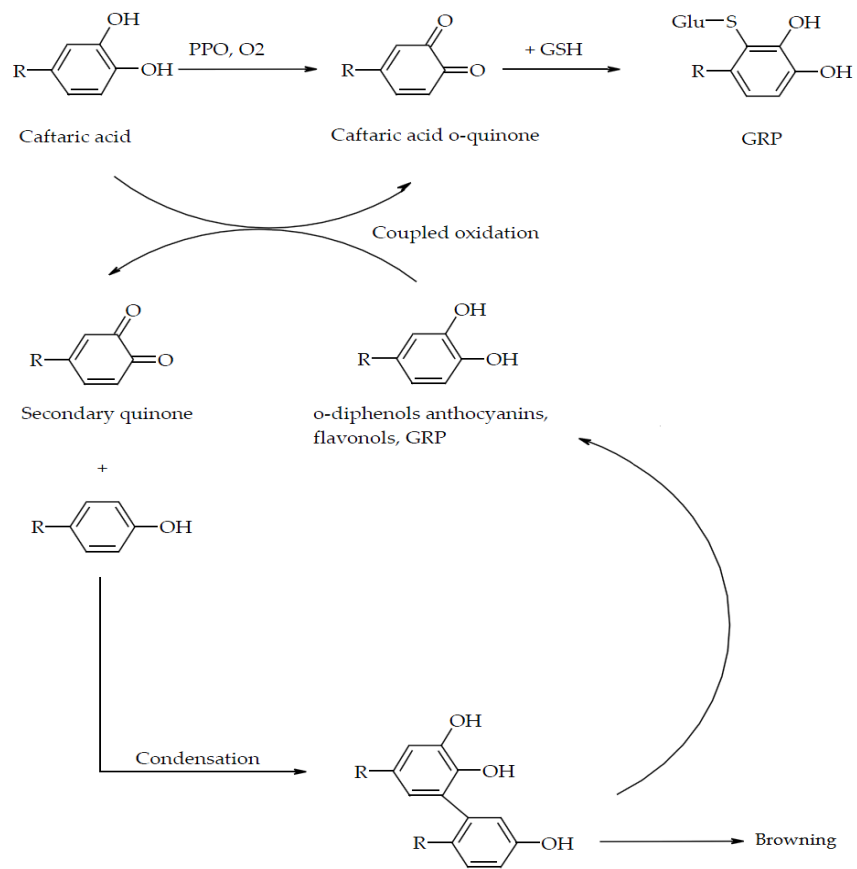


Εικόνα 17 Αντίδραση της GSH με την ο-κινόνη (Sonni *et al.*, 2011a)

Αν και το GRP είναι ανθεκτικό στη δράση της πολυφαινολοξειδάσης (PPO), αποτελεί οξειδωτικό υπόστρωμα για τη δράση της λακκάσης, στην περίπτωση μολυσμένων σταφυλιών με βοτρυτή. Η αντίδραση οξείδωσης είναι ευαίσθητη στην παρουσία του οξυγόνου όσο και στην παρουσία του θειώδη ανυδρίτη. Το SO<sub>2</sub> παρεμποδίζει την PPO (Dubernet & Ribereau – Gayon, 1973), οπότε εν συνεχεία παρεμποδίζεται και ο σχηματισμός του GRP. Στην περίπτωση λοιπόν της παρουσίας ικανής συγκέντρωσης ελεύθερου θειώδη ανυδρίτη τα ελεύθερα υδροξυκινναμωνικά οξέα, με υψηλό οξειδωτικό δυναμικό, παρακρατούνται στο γλεύκος (Oliveira *et al.*, 2011). Η διαφορετική πορεία αντιοξειδωτικής δράσης των δύο ουσιών (SO<sub>2</sub> και GSH) παρουσιάζεται στη εικόνα 18.



Εικόνα 18 Πιθανός μηχανισμός αντιοξειδωτικής δράσης του θειώδη ανυδρίτη και της γλουταθειόνης (Danilewicz, 2007)



Εικόνα 19 Σχήμα αντιδράσεων ενζυμικής οξείδωσης σε λευκό γλεύκος (Fracassetti, 2011)

## Επίδραση της γλουταθειόνης στις αρωματικές ενώσεις του γλεύκους και του οίνου

### Εστέρες και τερπένια

Οι εστέρες των ανώτερων αλκοολών και οι αιθυλεστέρες συνεισφέρουν θετικά στην ποιότητα των λευκών οίνων προσφέροντας φρουτώδη αρώματα (Etievant, 1991). Τα τερπένια συνιστούν μια σημαντική αρωματική ομάδα σε αρκετές ποικιλίες σταφυλιών οινοποίησης. Τερπένια όπως η λιναλόλη, α-τερπενόλη, νερόλη, γερανιόλη προσδίδουν αρώματα φρούτων, λουλουδιών, κόλιανδρου κ.ά. στους οίνους. Σε πρόσφατη σχετικά μελέτη (Paradourouli, D. & Roussis, I. G., 2008), αξιολογήθηκε η επίδραση της GSH και της N-ακετυλοκυστεΐνης στη μείωση των πτητικών εστέρων και των τερπενίων στον λευκό οίνο της ελληνικής ποικιλίας Ντεμπίνα, αλλά και σε πρότυπο διάλυμα οίνου, κατά τη διάρκεια της παλαίωσης. Στην αναφερόμενη μελέτη φάνηκε πως η GSH αναστέλλει τη μείωση της συγκέντρωσης πολλών πτητικών ουσιών, όπως η isomyl acetate, ethyl hexanoate, octanoate, decanoate και λιναλόλη σε οίνο της ποικιλίας Ντεμπίνα κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης. Σε μελέτη των ίδιων ερευνητών (Paradourouli, D. & Roussis, I. G., 2001), αναφέρεται πως η προσθήκη GSH σε συγκέντρωση 20 mg/L σε ξηρό οίνο από μοσχάτες ποικιλίες συνείσφερε στη διατήρηση της λιναλόλης και α-τερπενόλης κατά την ωρίμανση του οίνου. Στο πρότυπο διάλυμα οίνου παρατηρήθηκε παρεμπόδιση από τη GSH της μείωσης του isoamyl acetate, ethyl hexanoate και της λιναλόλης. Έχει επίσης παρατηρηθεί, πως προσθήκη GSH σε συγκέντρωση 20 mg/L σε οίνο με συγκέντρωση 35 mg/L ελεύθερου θειώδη ανυδρίτη ήταν πιο αποτελεσματική στη προστασία αρκετών εστέρων και της λιναλόλης σε σύγκριση με οίνο περιεκτικότητας 50 mg/L ελεύθερου SO<sub>2</sub> (Roussis *et al.*, 2007).

Η απώλεια των πτητικών ενώσεων, μπορεί να αποδοθεί κυρίως στην οξείδωση αλλά και σε άλλες χημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα κατά την ωρίμανση του οίνου. Επιπρόσθετα, η συγκέντρωση των εστέρων στους οίνους μπορεί να αλλάζει εξαιτίας των αντιδράσεων εστεροποίησης και υδρόλυσης που συμβαίνουν (Ramey & Ough, 1980). Οι περισσότερες τερπενόλες αντικαθίστανται από τα οξειδιά τους, ενώ η λιναλόλη μπορεί να μετατραπεί σε α-τερπενόλη, η οποία έχει υψηλότερο κατώφλι αντίληψης (Jackson, 1994). Η προστατευτική επίδραση της γλουταθειόνης σε ορισμένους εστέρες και τερπένια, κατά την ωρίμανση του οίνου, αποδίδεται στην ελεύθερη σουλφυδική της ομάδα (SH), (Roussis *et al.*, 2009), η οποία της προσδίδει μοναδικές οξειδοαναγωγικές και νουκλεόφιλες ιδιότητες (Penninckx, 2000).

### Πτητικές θειόλες

Οι πτητικές ενώσεις του θείου στον οίνο μπορούν να χωριστούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες. Από τη μία, συγκεκριμένες πτητικές θειικές ενώσεις μπορεί να προσδίδουν άσχημο άρωμα όπως σάπιο αυγό, το οποίο προέρχεται από το σχηματισμό H<sub>2</sub>S στη ζύμωση. Η παραγωγή δευτερογενών αναγωγικών οσμών μπορεί να συνεισφέρει στις αρνητικές οσμές που περιγράφονται ως οσμές ψημένων λαχανικών, κρεμμυδιού και λάχανου που προκαλούνται από θειικές ενώσεις που περιέχουν θειοοζικούς εστέρες και μερκαπτάνες που μπορεί να σχηματίζονται εξαιτίας του χαμηλού οξειδοαναγωγικού δυναμικού του οίνου (Brajkonich *et al.*, 2005).

Ωστόσο, άλλες ενώσεις που περιέχουν θείο, μπορούν να συμβάλλουν σε ευχάριστα αρώματα όπως τροπικών φρούτων, φρούτων του δάσους και αρώματα με αποχρώσεις γκουάβα. Αυτές οι ενώσεις, οι οποίες θα αναφέρονται ως πτητικές θειόλες, θεωρούνται ότι έχουν επίδραση στην οσμή του Sauvignon Blanc (Coetzee, C. 2011). Οι πτητικές θειόλες είναι ενώσεις θείου

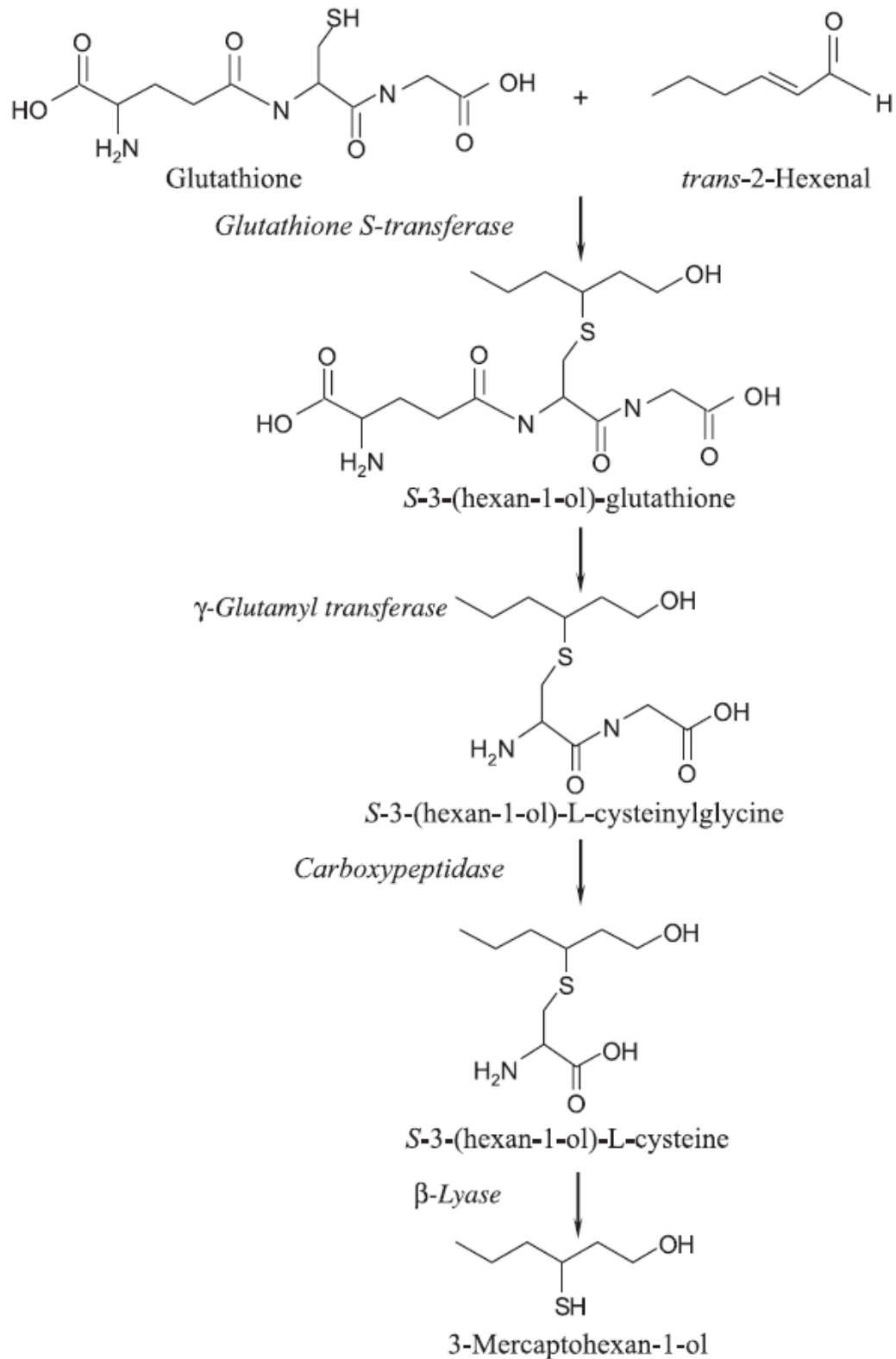


με επιπλέον λειτουργικές ομάδες όπως οι κετόνες, οι αλκοόλες και οι εστέρες. Μερικές τέτοιες ενώσεις που είναι υπεύθυνες για το φρουτώδη και τροπικό αρωματικό χαρακτήρα του Sauvignon Blanc είναι η 4-μερκαπτο-4-μεθυλπενταν-2-όνη (4MMP), η οποία θυμίζει δέντρο, φρούτα του δάσους και μαύρο μπουμπούκι, η 3-μερκαπτοεξαν-1-όλη (3MH) και η οξικο-3-μερκατοεξαν-1-όλη (3MHA), υπεύθυνη για το άρωμα εσπεριδοειδών, γκρεϊπφρουτ και φρούτων του δάσους. Η 4-μερκαπτο-4-μεθυλοπενταν-2-όλη (4MMPOH) μπορεί επίσης να συμβάλλει στον ίδιο αρωματικό χαρακτήρα, αν και ο οργανοληπτικός της ρόλος είναι περιορισμένος εξαιτίας της συγκέντρωσής της στους οίνους η οποία σπάνια υπερβαίνει το οσφρητικό όριο των 55 ng/L (Tomimaga, Furrer, *et al.*, 1998a). Οι εν λόγω θειόλες είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες στην οξείδωση κατά την ωρίμανση του οίνου (Blanchard *et al.*, 2004) κι έχει φανεί πως η GSH παίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία τους κατά την ωρίμανση ή και την παλαίωση του οίνου σε φιάλες (Dubourdieu, D. & Lavigne, V., 2004). Η προσθήκη GSH σε συγκέντρωση 10 mg/L σε οίνους Sauvignon Blanc πριν από την εμφιάλωση οδήγησε σε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα 3MH μετά από τρία χρόνια παλαίωσης σε μπουκάλια, σε σύγκριση με το δείγμα μάρτυρα (Dubourdieu, D. & Lavigne, V., 2004). Μεταγενέστερη μελέτη (Ugliano *et al.*, 2011), επιβεβαιώνει την προαναφερθείσα έρευνα, αναφέροντας πως η προσθήκη 20 mg/L γλουταθειόνης πριν την εμφιάλωση οδήγησε σε οίνους με υψηλότερα επίπεδα 3MH μετά από έξι μήνες ωρίμανσης σε φιάλη. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα υδροξυκιναμωνικά οξέα του οίνου μπορεί να οξειδωθούν σε ορθο-κινόνες υπό την παρουσία οξυγόνου. Αυτές οι ορθο-κινόνες μπορούν εύκολα να αντιδράσουν με τις θειόλες (Cheynier *et al.*, 1986). Ο μηχανισμός με τον οποίο η GSH ασκεί προστατευτική δράση σε αυτά τα είδη θειολών, στηρίζεται στην ανταγωνιστική φύση της (Fracassetti D., 2010). Πιο συγκεκριμένα, η GSH περιέχοντας ένα άτομο θειόλης ενδεχομένως να δρα ανταγωνιστικά με τις αρωματικές θειόλες και να δεσμεύεται από τις ορθο-κινόνες, οπότε σαν συνέπεια διατηρείται το ποικιλιακό άρωμα (Tirelli *et al.*, 2010).

#### Η GSH ως πρόδρομη ένωση θειολών

Οι ποικιλιακές πτητικές θειόλες 4MMP και 3MH δεν είναι παρούσες στα σταφύλια ως ελεύθερες θειόλες, αλλά απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης από πρόδρομες ουσίες προερχόμενες από τα σταφύλια ((Tomimaga, Furrer, *et al.*, 1998a). Οι δύο αυτές πρόδρομες ουσίες σχετίζονται με την κυστεΐνη και τη γλουταθειόνη κι έχουν ταυτοποιηθεί ως Cys-3MH και Glut-3MH αντίστοιχα.

Η GSH λοιπόν, παράλληλα με τις άλλες δράσεις της, συμμετέχει και στη βιογένεση ορισμένων θειολών (Roland *et al.*, 2010). Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζεται το πιθανό βιοχημικό μονοπάτι που ακολουθείται ώστε να σχηματιστούν οι πρόδρομες ενώσεις των κύριων πτητικών θειολών. Η βιοσύνθεση λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης και με τη δράση της β-λυάσης προς απελευθέρωση θειολών (Kobayashi *et al.*, 2010).



Εικόνα 20 Πιθανό βιοχημικό μονοπάτι βιοσύνθεσης Cys-3MH και Glut-3MH κατά την αλκοολική ζύμωση μετά τη δράση του ενζύμου θ-λυάση

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### ΣΚΟΠΟΣ – ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ

Είναι γεγονός πως η ποικιλία Ροδίτης αποτελεί την πιο πολυφυτεμένη οινοποιήσιμη ποικιλία του ελληνικού αμπελώνα. Καλλιεργούμενος σε 32 νομούς της χώρας, αποτελεί την πρώτη ύλη για τα λευκά κρασιά ΠΟΠ Πάτρα, συνδράμει στα λευκά κρασιά ΠΟΠ Αγχίαλος και ΠΟΠ Πλαγιές Μελίτωνα, ενώ συμμετέχει σε αμέτρητους οίνους ΠΓΕ. Πολλές φορές παρουσιάζεται υδαρής και πλαδαρός, αλλά η τιθάσευση της χωρίς όρια παραγωγικότητάς του, η επιλογή ορεινών αμπελώνων, η προσεκτική οινοποίηση και η παραμονή των κρασιών για μικρά διαστήματα με τις οινολάσπες τους, είναι μερικά από τα βασικά στοιχεία, που μετατρέπουν το Ροδίτη σε ενδιαφέρουσα ποικιλία οινοποίησης. Έτσι, οι σύγχρονοι, υψηλής ποιότητας ροδίτες διαθέτουν καθαρά, λεμονάτα –και ανάλογα με την περιοχή, ορυκτώδη– αρώματα, ελαφρύ προς μέτριο σώμα και δροσιστική οξύτητα. Το ενδιαφέρον λοιπόν του δυναμικού της ποικιλίας σε συνδυασμό με τη σύγχρονη ερευνητική γραμμή εύρεσης τρόπων μείωσης της χρήσης θειώδη ανυδρίτη, οδήγησαν στη παρούσα ερευνητική μελέτη.

Σκοπός λοιπόν της μελέτης, είναι η διερεύνηση της επίδρασης της προσθήκης θειώδη ανυδρίτη, σε συνδυασμό με γλουταθειόνη στις ποιοτικές παραμέτρους οίνου από ποικιλία Ροδίτη. Η γλουταθειόνη επιλέχθηκε ως αντικατάστατο του θειώδη ανυδρίτη εξαιτίας των πολλών αντιοξειδωτικών της ιδιοτήτων, όπως έχει ήδη εκτεθεί, καθώς και του ενδιαφέροντος που εκδηλώνεται τα τελευταία χρόνια για τη χρήση της από τον ερευνητικό οινολογικό κόσμο. Στην παρούσα μελέτη, δόθηκε έμφαση στην αντιοξειδωτική ικανότητα που παρουσιάζει η GSH σε σύγκριση με το SO<sub>2</sub> στο στάδιο της διατήρησης του οίνου μετά την αλκοολική ζύμωση και σε διάστημα 3 μηνών. Για το σκοπό αυτό, μετά το πέρας της οινοποίησης προστέθηκαν στον οίνο συγκεκριμένες δόσεις γλουταθειόνης και θειώδη ανυδρίτη σε διάφορους συνδυασμούς προκειμένου να φανούν τυχόν διαφοροποιήσεις στη δράση των δύο ουσιών ως προς την προστασία οξειδώσιμων ουσιών του οίνου που επηρεάζουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά.

Τα σταφύλια της ποικιλίας Ροδίτη που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από πρέμνα φυτεμένα στην περιοχή του νομού Ηλείας στην Πελοπόννησο. Συγκεκριμένα, καλλιεργούνται στην περιοχή γύρω από τον ποταμό Ενιπέα υπό την επίβλεψη του οινοποιείου «Κτήμα Μπριτζίκη». Το υψόμετρο της περιοχής είναι περί τα 250 μ. και ο αμπελώνας είναι μη αρδευόμενος. Τα φυτά είναι ενήλικα άνω των 15 ετών. Χρησιμοποιήθηκαν 100 κιλά σταφυλιών από τα οποία παράχθηκε γλεύκος 70 λίτρων. Ύστερα, ακολουθήθηκε πρωτόκολλο λευκής οινοποίησης όπως θα εκτεθεί σε επόμενη ενότητα.

Η οινοποίηση έλαβε χώρα στο οινοποιείο του Γεωπονικού πανεπιστημίου Αθηνών του εργαστηρίου οινολογίας.

Μετά την οινοποίηση και διεξαγωγή των βασικών αναλύσεων οίνου ώστε να προσδιοριστούν τα βασικά χαρακτηριστικά του, ακολούθησαν στοχευμένες στην οξειδωσιμότητα του οίνου αναλύσεις όπως θα αναλυθούν στη συνέχεια. Οι αναλύσεις πραγματοποιούνται ανά μήνα για τρεις μήνες από την οινοποίηση ώστε να αξιολογηθούν οι αντιοξειδωτικές δυνατότητες της γλουταθειόνης στο χρόνο. Έτσι, η πειραματική διαδικασία έλαβε χώρα σε 4 στάδια κατ' ουσία.

## ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗ

Το πρώτο δεκαήμερο του Οκτωβρίου τα σταφύλια έχοντας εισέλθει στη φυσιολογική τους ωρίμανση μεταφέρθηκαν από το νομό Ηλείας στο οινοποιείο του Γεωπονικού πανεπιστημίου Αθηνών. Αποθηκεύτηκαν σε ψυγείο σε χαμηλή θερμοκρασία για 3 ημέρες, προκειμένου να μειωθεί ο κίνδυνος των οξειδώσεων, ώσπου να ξεκινήσει η οινοποίησή τους. Παραλήφθηκαν 100 kg καθαρού βάρους σταφύλια της ποικιλίας Ροδίτης.

Η οινοποίηση ξεκίνησε με την έκθλιψη των σταφυλιών η οποία έγινε με σπαστήρα χειρός με ρυθμιζόμενη απόσταση ράουλων. Μετά την έκθλιψη ακολούθησε η πίεση των σταφυλιών με υδραυλικό πιεστήριο χειρός. Η πίεση ανέβηκε σε επίπεδα ως και 3 bar. Μετά την πίεση των σταφυλιών παραλήφθηκε γλεύκος όγκου 70 L. Το γλεύκος εισήχθη σε δεξαμενή inox απολάσπωσης. Παράλληλα προστέθηκαν ηηκτινολυτικά ένζυμα 4% (Safizym Clean, Fermentis, France) ώστε να υποβοηθήσουν την απολάσπωση του γλεύκους, ενώ έγινε και προσθήκη 5% θειώδη ανυδρίτη σε μορφή σκόνης (sodium metabisulfite). Ύστερα από 72 ώρες παραμονής, με σταθερή θερμοκρασία 18 °C, στη δεξαμενή παραλήφθηκε καθαρό γλεύκος όγκου 64 L.

Μετά τη μετάγγιση του καθαρού σταφυλοχυμού σε καινούρια δεξαμενή έγινε εμβολιασμός με ζύμες *Saccharomyces cerevisiae* 20 g/hl (UCLM S325, Fermentis, France) προκειμένου να ξεκινήσει η αλκοολική ζύμωση. Μετά από 24 ώρες προστέθηκαν θρεπτικά συστατικά περιεχόμενα ανόργανα και οργανικά αμμωνιακά άλατα, θειαμίνη και φωσφορικό αμμώνιο (Dolmar, Fermicomplex Natur) σε ποσότητα 20 g/hl. Εξαιτίας της παραγωγής υδρόθειου, μετά από 48 ώρες προστέθηκαν αμμωνιακά, αμινοξέα και διαμμωνιακό φώσφορο (Bioferm, Fermentis, France) σε ποσότητα 20 g/hl, ώστε να βοηθηθεί ο μεταβολισμός των ζυμομυκήτων. Σε διάστημα 8 ημερών από την παραλαβή του καθαρού γλεύκους ξεκίνησε η αποζύμωση του γλεύκους. Με το πέρας της αλκοολικής ζυμώσεως ο οίνος παραλαμβάνεται με μετάγγιση της δεξαμενής ζυμώσεως και χωρίζεται σε ασκούς των 5 λίτρων αφού περάσει από φίλτρο. Γίνεται παραλαβή 50 λίτρων διαυγούς οίνου και γεμίζουν 10 ασκοί οι οποίοι αποτελούν και τα 10 δείγματα του πειράματος .

Οι ασκοί διαφοροποιούνται σύμφωνα με τη περιεκτικότητά τους σε γλουταθειόνη και θειώδη ανυδρίτη. Η γλουταθειόνη που εισήχθη είναι σε καθαρή μορφή (Springarom, Fermentis, France, 99% καθαρότητα), ενώ ο θειώδης ανυδρίτης υπό τη μορφή σκόνης μεταδιθειώδους καλίου (sodium metabisulfite). Τα δείγματα περιγράφονται στους πίνακες 1 και 2.

Πίνακας 1 Συγκέντρωση αντιοξειδωτικών και κωδικοποίηση

ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ	ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΗΣΗ	ΕΠΙΠΕΔΑ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ (mg/l)		
		-1	0	1
CGSH (mg/l)	X <sub>1</sub>	0	10	20
CSO <sub>2</sub> (mg/l)	X <sub>2</sub>	0	50	100

Πίνακας 2 Κωδικοποίηση δειγμάτων

ΑΡΙΘΜΗΣΗ	ΑΝΕΞΑΡΤΗΤΕΣ ΜΕΤΑΒΛΗΤΕΣ	
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>
1	-1	-1
2	-1	1
3	1	-1
4	1	1
5	-1	0
6	1	0
7	0	-1
8	0	1
9	0	0
10	0	0

Κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, γίνονταν καθημερινά μετρήσεις πυκνότητας του γλεύκους, pH και θερμοκρασίας, προς παρακολούθηση της αλκοολικής ζύμωσης και τυχόν παρεμβολή όποτε κρίθηκε αναγκαίο.

## ΧΗΜΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

### ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΟΙΝΟΥ

Οι βασικές αναλύσεις έγιναν σύμφωνα με το πρωτόκολλο της ευρωπαϊκής νομοθεσίας (Compendium of international methods of analysis - OIV), ως ενδεικνυόμενες επίσημες μέθοδοι (International organization of vine and wine 2013).

### ΟΛΙΚΑ ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ (Μέθοδος FOLIN-CIOCALTEAU)

Οι φαινολικές ουσίες αποτελούν σημαντική παράμετρο των οίνων γιατί από αυτές εξαρτάται το χρώμα και οι αποχρώσεις, κυρίως, των ερυθρών και ροζέ οίνων αλλά και οι ιδιαίτεροι γευστικοί χαρακτήρες τους. Είναι υπεύθυνες για τις θετικές ή αρνητικές μεταβολές της ποιότητας των οίνων κατά τη συντήρηση και παλαίωση (π.χ. εξευγενισμός γευστικών χαρακτήρων των ερυθρών ή, αντίθετα, 'καφέτιασμα' των λευκών). Κοινό χαρακτηριστικό αυτών των ουσιών, απ' όπου πήραν και το όνομα τους, είναι η παρουσία ενός ή περισσότερων φαινολικών δακτυλίων στο μόριο τους. Χωρίζονται σε δυο μεγάλες κατηγορίες: τις φλαβανοειδείς φαινόλες με κύριους εκπροσώπους τις ταννίνες (προκυανιδίνες, συμπυκνωμένες και πολυμερισμένες ταννίνες) και τις ανθοκυάνες (ελεύθερες ή ενωμένες με ταννίνες) και τις μη φλαβανοειδείς φαινόλες (γαλλικό, καφεϊκό οξύ). Βρίσκονται συγκεντρωμένες στα στερεά μέρη της σταφυλής (φλοιοί, γίγαρτα και βόστρυχοι) και περνάνε στο γλεύκος και κατόπιν στον οίνο με εκχύλιση ή διάχυση κατά τις διάφορες τεχνικές οινοποίησης. Στην ερυθρή οινοποίηση η εκχύλιση γίνεται κατά το χρονικό

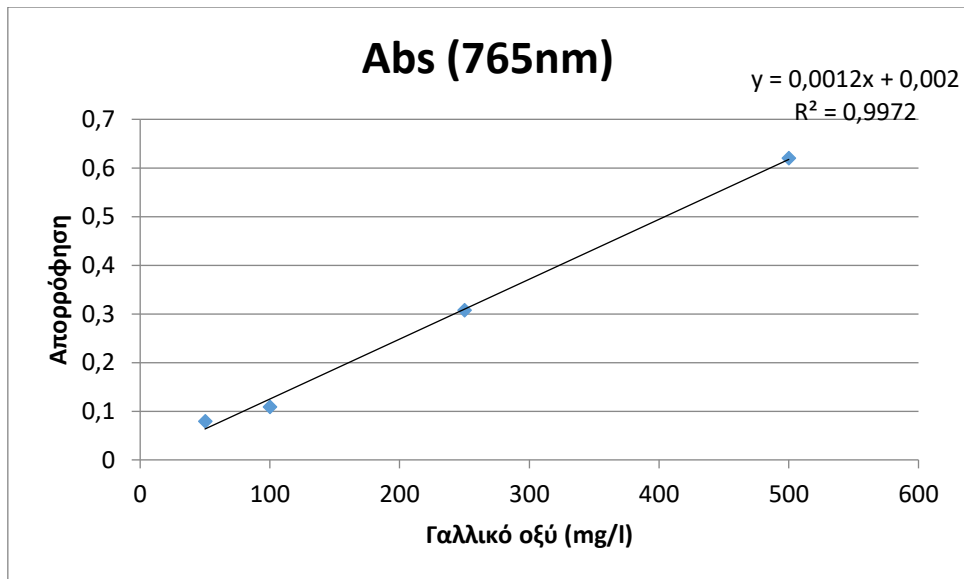
διάστημα που τα στέμφυλα παραμένουν σε επαφή με το γλεύκος ενώ στη λευκή οινοποίηση, όπου ο διαχωρισμός γίνεται αμέσως μετά την σύνθλιψη, μόνο ένα μικρό ποσοστό φαινολικών εκχυλίζεται στο γλεύκος. Είναι οι αποκλειστικοί υπεύθυνοι για όλες τις διαφορές που υπάρχουν ανάμεσα στους λευκούς και τους ερυθρούς οίνους.

Ο δείκτης Folin είναι η επίσημη μέθοδος του ΟΙΒ. Μετρά το σύνολο των φαινολικών ουσιών αλλά υστερεί σε ευκολία έναντι του ΔΦΟ. Πρόκειται για φωτομετρική μέθοδο που βασίζεται στην οξειδωση των φαινολικών ενώσεων του οίνου από το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu. Χρησιμοποιείται για την μέτρηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου χωρίς να γίνεται διάκριση μεταξύ μονομερών, διμερών ή μεγαλύτερων φαινολικών συστατικών. Το κύριο αντιδραστήριο της μεθόδου, το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu, είναι διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφο-μολυβδαινικά ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) και φωσφο-βολφραμικά ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) ετεροπολυμερή οξέα. Τα φαινολικά ιόντα οξειδώνονται με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων. Κατά την οξειδωση των φαινολών, το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu ανάγεται προς μείγμα κυανών οξειδίων του βολφραμίου ( $W_8O_{23}$ ) και του μολυβδαινίου ( $Mo_8O_{23}$ ). Το σχηματιζόμενο κυανό χρώμα παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση περίπου στα 750 nm και είναι ανάλογο με τη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων. Η αλκαλικότητα ρυθμίζεται με διάλυμα  $Na_2CO_3$ . Οι φαινολικές ουσίες που προσδιορίζονται με τον δείκτη Folin-Ciocalteu εκφράζονται πολύ συχνά σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος.

Τα αντιδραστήρια της μεθόδου αποτελούνται από το Folin – Ciocalteu, διάλυμα ανθρακικού νάτριο ( $Na_2CO_3$ ) 20% (w/v) και πρότυπο διάλυμα γαλλικού οξέος 1g/L (100 mg γαλλικού οξέος διαλύονται σε 10 mL αιθανόλης σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και συμπληρώνεται ο όγκος με  $H_2O$ ).

Κατά τη διαδικασία προσδιορισμού ολικών φαινολικών μέσω της μεθόδου, σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL με περίπου 5 mL  $H_2O$  τοποθετούνται 100  $\mu$ L δείγματος, 0,5 mL Folin και 1,5 mL  $Na_2CO_3$  20% (w/v). Συμπληρώνεται ο όγκος με  $H_2O$  μέχρι τα 10 mL. Στο μάρτυρα χρησιμοποιείται  $H_2O$ . Μετά από παραμονή 30 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, μετريέται η απορρόφηση των δειγμάτων στα 765 nm. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (GAE) γίνεται μέσω πρότυπης καμπύλης.

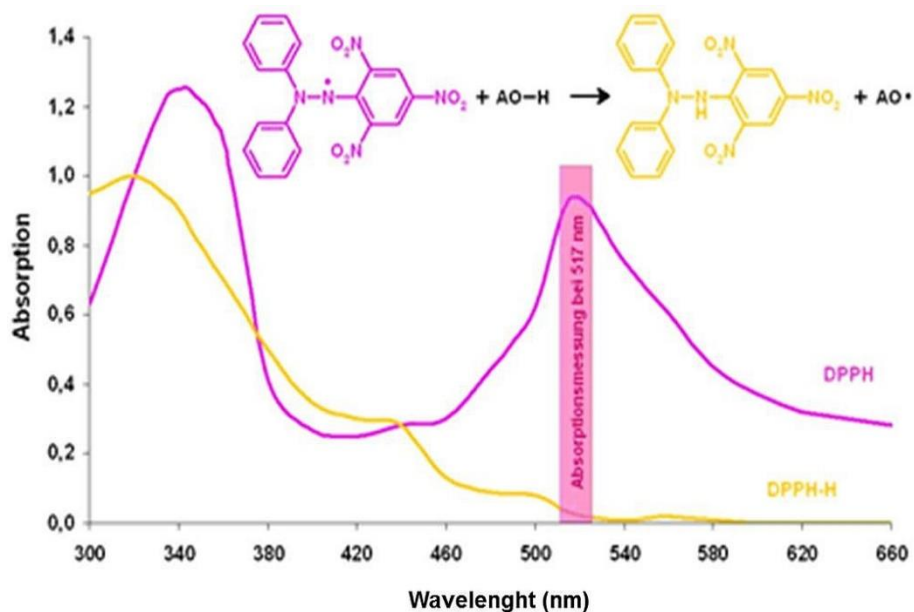
Για τη δημιουργία καμπύλης αναφοράς, παρασκευάζεται πρότυπο διάλυμα γαλλικού οξέος με συγκέντρωση 1g/L (γράφημα 1). Σε ογκομετρικές φιάλες των 10 mL προστίθενται 0,5, 1, 2,5 και 5 mL διαλύματος γαλλικού οξέος 1 g/L και συμπληρώνεται ο όγκος με  $H_2O$ . Έτσι δημιουργούνται συγκεντρώσεις 50, 100, 250, 500 mg/L γαλλικού οξέος. Ακολουθεί ο προσδιορισμός φαινολικών όπως παραπάνω.



Γράφημα 1 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος

#### ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ (Μέθοδος DPPH)

Το DPPH (1,1-διφαινυλο-2-πικρυλο-υδραζύλιο) αποτελεί μία από τις λίγες σταθερές κι εμπορικά διαθέσιμες οργανικές ρίζες αζώτου. Η κατανάλωσή του από τα αντιοξειδωτικά, έχει ως αποτέλεσμα την εξασθένηση του πορφυρού χρώματος (εικ. 21) του διαλύματός του, η οποία παρακολουθείται σε μήκος κύματος 515 nm, όπου παρατηρείται το μέγιστο φάσμα απορρόφησης του μορίου της ρίζας.



Εικόνα 21 Αντίδραση DPPH και απορρόφηση στα 515 nm

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για τη διεξαγωγή της μεθόδου είναι το διάλυμα DPPH, το οποίο παρασκευάζεται ζυγίζοντας 10 mg DPPH τα οποία στη συνέχεια διαλύονται σε 20 mL μεθανόλης. Αυτό είναι το stock διάλυμα. Με αραιώση 2:50 παρασκευάζεται το διάλυμα μέτρησης. Αυτά τα δύο διαλύματα διατηρούνται στους -20 °C. Επίσης, χρησιμοποιείται πρότυπο διάλυμα Trolox 2mM, όπου 12,5 mg Trolox διαλύονται σε 25 mL 96% EtOH. Το Trolox (6-υδροξυ-2,5,7,8-τετραμεθυλχρωμαν-2-καρβοξυλικό οξύ) είναι αντιοξειδωτικό όπως η βιταμίνη E. Έχει μία ομάδα -OH, μία -COOH και διπλό δεσμό O<sub>2</sub> (C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub>).

Κατά τη διαδικασία, τοποθετούνται σε μικρούς γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες 50 mL αραιωμένου με dH<sub>2</sub>O δείγματος (1/3, είναι ανάλογο της συγκέντρωσης των φαινολικών) και 1950 μL διαλύματος DPPH. Σε αυτό το σημείο γίνεται η αντίδραση της ελεύθερης ρίζας O<sub>2</sub> με ελεύθερο ηλεκτρόνιο του N<sub>2</sub>. Ακολουθεί ανάδευση σε vortex και μετريέται η απορρόφηση στα 515 nm με μάρτυρα dH<sub>2</sub>O (t=0). Το δείγμα επιστρέφεται στο σωλήνα και μετριέται η απορρόφηση ξανά μετά από 30 λεπτά (t=30). Από τις δύο απορροφήσεις υπολογίζεται η % διαφορά στην απορρόφηση ως εξής:

$$\% \Delta A_{515} = [(A_{515}(t=0) - A_{515}(t=30)) / A_{515}(t=0)] * 100$$

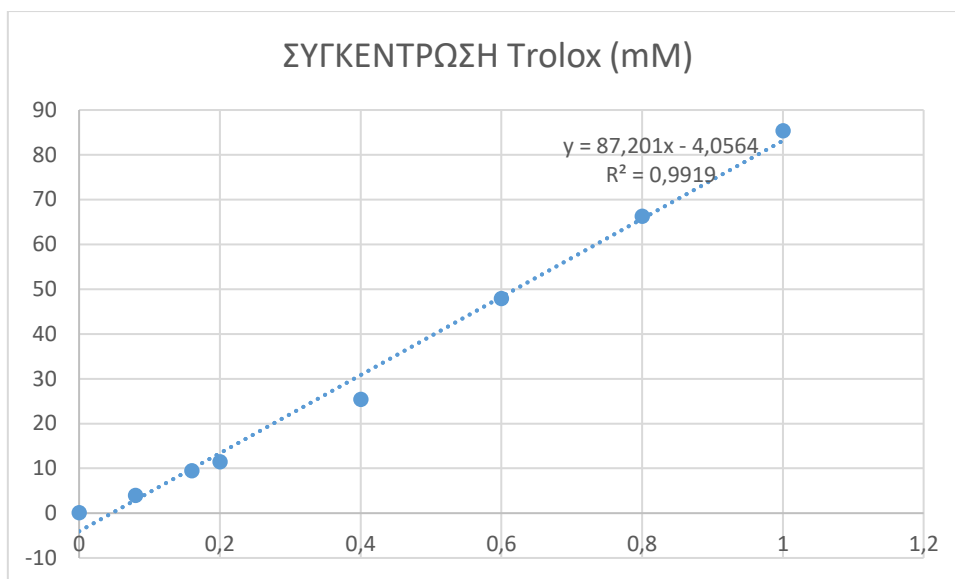
Για τη βαθμονόμηση, παρασκευάζεται πρότυπο διάλυμα trolox με συγκέντρωση 2 mM σε αιθανόλη. Σε φιαλίδια erpendorf δημιουργούνται οι παρακάτω πρότυπες συγκεντρώσεις σε τελικό όγκο 1 mL (πίνακας 3).

Πίνακας 3 Πρότυπες συγκεντρώσεις Trolox (mM)

Τελική συγκέντρωση trolox (mM)	Πρότυπο διάλυμα trolox (μL)	Αιθανόλη
0	0 (μάρτυρας)	1000
0,08	40	960
0,16	80	920
0,20	100	900
0,40	200	800
0,60	300	700
0,80	400	600
1,00	500	500

Ακολουθεί η ανάλυση των δειγμάτων σύμφωνα με τη μέθοδο όπως περιεγράφηκε. Αντιστοιχίζοντας τις πρότυπες συγκεντρώσεις με τις αντίστοιχες % ΔA<sub>515</sub> κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη (γράφημα 3). Από την ευθεία που τη περιγράφει υπολογίζεται η αντιοξειδωτική ικανότητα του δείγματος σε ισοδύναμα trolox ή TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). Η αραιώση του δείγματος συνυπολογίζεται στο τελικό αποτέλεσμα.





*Γράφημα 2 Πρότυπη καμπύλη μεθόδου DPPH*

## ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΚΕΤΑΛΔΕΪΔΗΣ

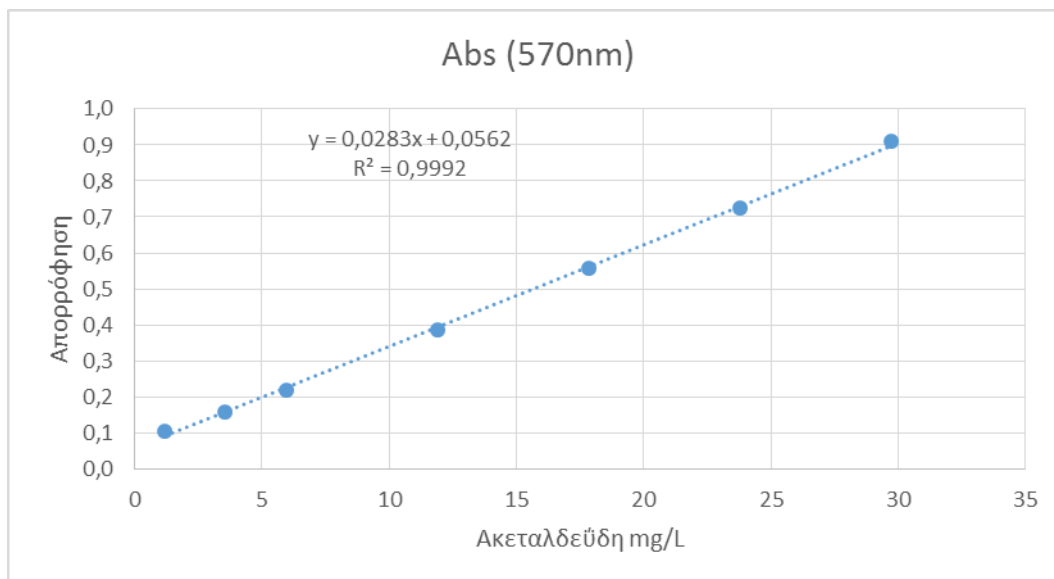
Η ακεταλδεΐδη παράγεται στους οίνους μετά την οξείδωση της αιθανόλης με το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Έτσι, η συγκέντρωσή της στον οίνο αποτελεί δείκτη της οξειδωτικής του κατάστασης.

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της ακεταλδεΐδης στον οίνο είναι η επίσημη ενδεδειγμένη μέθοδος του OIV (method OIV-MA-AS315-01). Η αρχή της μεθόδου βασίζεται σε αντίδραση της ακεταλδεΐδης (αιθανάλη) σε αποχρωματισμένους με ενεργό άνθρακα οίνους. Η αντίδραση γίνεται με νιτροφερικουανιδίνη και πιπεριδίνη και προκαλεί μεταχρωματισμό πράσινου έως ιώδες χρώματος η ένταση του οποίου μετριέται με φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 570 nm.

Τα αντιδραστήρια της μεθόδου αποτελούνται από το διάλυμα πιπεριδίνης ( $C_5H_{11}N$ ) 10% (v/v), το οποίο παρασκευάζεται ακριβώς πριν τη χρήση του αναμιγνύοντας 2 ml πιπεριδίνης με 18 ml απεσταγμένου νερού, διάλυμα καυστικής νιτροφερικουανιδίνης, 0,4% (m/v), το οποίο παρασκευάζεται σε ογκομετρική φιάλη 250 ml. Εκεί, διαλύεται 1 g ουσίας,  $Na_2[Fe(CN)_5NO] \cdot 2H_2O$ , σε απεσταγμένο νερό και γίνεται συμπλήρωση του όγκου. Τέλος, χρησιμοποιείται ενεργός άνθρακας για το φιλτράρισμα των προς ανάλυση δειγμάτων σε ποσότητα 2 g/ δείγμα.

Κατά τη διαδικασία, τοποθετούνται 25 ml του κάθε δείγματος προς ανάλυση σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες. Στους σωλήνες έχουν ήδη εισαχθεί 2 g ενεργού άνθρακα. Ο οίνος αναμιγνύεται με τον ενεργό άνθρακα και αφήνεται σε ηρεμία για 2 λεπτά. Εν συνεχεία διηθείται με χαρτί φίλτρου διαμέτρου 2 μm ώστε να συλλεχθεί τελείως καθαρό δείγμα.

Έπειτα, 2 ml του φιλτραρισμένου δείγματος, αναμιγνύονται με 5 ml διαλύματος πιπεριδίνης και 5 ml διαλύματος νιτροφερικουανιδίνης και γίνεται αμέσως μέτρηση σε φασματοφωτόμετρο στα 570 nm ως προς αέρα. Ο μεταχρωματισμός από πράσινο σε ιώδες γίνεται ραγδαία και μετριέται η μέγιστη απορρόφηση στα 570 nm η οποία παρουσιάζεται σε περίπου 50 δευτερόλεπτα. Η μέγιστη τιμή καταγράφεται και η συγκέντρωση της ακεταλδεΐδης προκύπτει μέσω πρότυπης καμπύλης όπως παρουσιάζεται στο γράφημα 3.



Γράφημα 3 Πρότυπη καμπύλη μεθόδου προσδιορισμού ακεταλδεΐδης

#### ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΜΕ GC-FID SPME

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό των αρωματικών ενώσεων είναι η SPME (Solid Phase Micro Extraction). Θεωρείται απλή μέθοδος, γρήγορη και εφαρμόζεται χωρίς την ανάγκη χρήσης διαλυτών. Η διαδικασία, απαιτεί να γίνει ταυτοποίηση των αρωματικών ουσιών, χρησιμοποιώντας πρότυπες ουσίες και διευκρινίζοντας το χρόνο εμφάνισης κορυφής ( $t_R$ ) της κάθε αρωματικής ουσίας. Στη συνέχεια, παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα των υπό μελέτη ουσιών και αναλύονται κάτω από τις ίδιες συνθήκες με το άγνωστο δείγμα. Έπειτα, κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη αναφοράς, όπου ο λόγος της συγκέντρωσης της ουσίας προς τη συγκέντρωση του εσωτερικού προτύπου (3-οκτανόλη) είναι συνάρτηση του λόγου του εμβαδού της κορυφής της ουσίας στο χρωματογράφημα, προς το εμβαδό της κορυφής του εσωτερικού προτύπου. Από αυτή τη καμπύλη αναφοράς, βρίσκεται η συγκέντρωση της ουσίας στο δείγμα. Όλες οι αρωματικές πρότυπες ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν, ήταν της εταιρίας Sigma – Aldrich (Milan, Italy).

Για την ανάλυση των αρωματικών ουσιών με τη μέθοδο SPME, χρησιμοποιήθηκε Supelco solid phase microextraction holder (Bellefonte, PA, USA) και είναι τριστρωματικής σύνθεσης, [Supelco SPME Fiber assembly 2cm, 50/30  $\mu$ m divinylbenzene-carboxen-poly (dimethylsiloxane), DVB – CAR – PDMS, gray].

Η προετοιμασία των δειγμάτων, όπως προαναφέρθηκε, είναι γρήγορη και χωρίς τη χρήση διαλυτών. Σε γυάλινο φυαλίδιο SPME 20 ml (με βιδωτό πώμα που διαθέτει ελαστικό διάφραγμα), εισάγονται 7 ml του προς ανάλυση δείγματος, 3ml απιονισμένο νερό, 10 µL 3-οκτανόλης (εσωτερικό πρότυπο) και 3 gr χλωριούχο νάτριο (NaCl, Sigma – Aldrich). Στη συνέχεια, το δείγμα τοποθετείται σε μαγνητικό αναδευτήρα και παραμένει υπό ανάδευση στα 400 rpm για 10 λεπτά σε υδατόλουτρο με θερμοκρασία 35 °C. Μετά το πέρας των 10 min, εισάγεται η ίνα στο εσωτερικό του vial και απελευθερώνεται για 30 min ώστε να γίνει η προσρόφηση των πτητικών ενώσεων. Τέλος, η ίνα μεταφέρεται στην υποδοχή έγχυσης (injector), όπου παραμένει για 10 min ώστε να εκροφηθούν από την ίνα οι αρωματικές ενώσεις αλλά και να γίνει καθαρισμός της ίνας ώστε να είναι έτοιμη για το επόμενο δείγμα.

Κάθε vial χρησιμοποιείται μόνο μία φορά, ως εκ τούτου όλες οι μετρήσεις έγιναν εις διπλούν προκειμένου να υπάρχει επανάληψη. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το εξής: υπό αρχικές συνθήκες η θερμοκρασία εισόδου (inlet) είναι 220 °C, η θερμοκρασία ανιχνευτή (detector) 250 °C και η θερμοκρασία φούρνου (oven) 40 °C. Σε αυτή τη θερμοκρασία διατηρείται ο φούρνος για 5 min και στη συνέχεια με ρυθμό 3 °C / min ανεβαίνει στους 220 °C, όπου παραμένει για 5 min. Όλο το πρόγραμμα διαρκεί 70 min. Στην αρχή κάθε ημέρας ανάλυσης, γινόταν καθαρισμός της ίνας και της στήλης, κάνοντας ένα blank test. Το GC- FID, που χρησιμοποιήθηκε είναι της εταιρίας Hewlet Packard (series II 5890, HP), ως φέρον αέριο χρησιμοποιείται ήλιο (He). Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν πολική DB-WAX, 30 m I.D 0,32 mm, film 0,25 µm.

#### ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΥΡΙΩΝ ΠΤΗΤΙΚΩΝ (GC)

Τα κύρια πτητικά [ακεταλδεΐδη, μεθανόλη, οξικός αιθυλεστέρας, προπανόλη, ισοβουτανόλη, αμυλικές αλκοόλες (3- και 2-μέθυλο-βουτανόλη)] στους οίνους, προσδιορίστηκαν με απευθείας έγχυση των δειγμάτων σε αέριο χρωματογράφο GC2010 plus της εταιρίας Shimadzu, ο οποίος ήταν εξοπλισμένος με αυτόματο δειγματολήπτη, εισαγωγέα *split-splitless* (*split ratio* 1/25) και ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (FID). Η καταγραφή των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό GC SoLUTION. Οι συνθήκες λειτουργίας του οργάνου ήταν οι ακόλουθες:

∅ Θερμοκρασία εισαγωγέα: 200°C

∅ Θερμοκρασία ανιχνευτή: 220°C

∅ Τριχοειδής στήλη: CP-Wax 57CB (50m X 0,25mm, DF=0,20 µm) της Agilent

∅ Φέρον αέριο: Ήλιο υψηλής καθαρότητας με ταχύτητα ροής 2,0 mL/min

Το πρόγραμμα θερμοκρασίας του φούρνου του αέριου χρωματογράφου ήταν το ακόλουθο:

Η θερμοκρασία του φούρνου προγραμματίστηκε στους 40°C για 10 min και έπειτα αυξήθηκε στους 110°C με ρυθμό 5°C/min. Στη συνέχεια, αυξήθηκε στους 190°C με ρυθμό 30°C/min και διατηρήθηκε σε αυτή τη θερμοκρασία για 2 min. Οι θερμοκρασίες του εισαγωγέα και του ανιχνευτή ήταν 200 και 250°C αντίστοιχα.

Η ποσοτική ανάλυση βασίστηκε στη μέθοδο του εσωτερικού προτύπου, το οποίο ήταν η 3-πεντανόλη. Μητρικά διαλύματα των παραπάνω ενώσεων παρασκευάστηκαν με διάλυση των πρότυπων ουσιών σε αιθανόλη. Κατόπιν παρασκευάστηκαν τα διαλύματα εργασίας σε

αλκοολικό διάλυμα 14% v/v, με τέτοιο τρόπο ώστε οι συγκεντρώσεις τους να καλύπτουν το συνηθισμένο εύρος συγκεντρώσεων που κυμαίνονται οι ουσίες αυτές στους οίνους. Σε όλους τους οίνους γινόταν προσθήκη γνωστής ποσότητας εσωτερικού προτύπου. Η ανάλυσή τους γινόταν εις διπλούν.

#### ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΜΕ HPLC ΜΕΣΩ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΑΥΤΩΝ ΜΕ ΟΞΙΚΟ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑ

Τα φαινολικά συστατικά του οίνου αναλύθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν βάση της μεθόδου που περιεγράφηκε από τους Garcia-Viguera et. al, 1995. Ένα μείγμα από 250 μL άλμης (νερό με NaCl), 250 μL εσωτερικού προτύπου (2mM syringic acid) και 500 μL απιονισμένου νερού διηθήθηκαν μέσω φίλτρου από νάιλον με πόρους διαμέτρου 0,45 μm. Ένας ομαλός διαιρέτης (aliquot) χορηγήθηκε με ένεση (10 μL) στο χρωματογράφο. Το σύστημα του χρωματογράφου αποτελείτο από μία αντλία Jasco PU-2080, έναν αυτόματο δειγματολήπτη Jasco AS-1555, μία στήλη φούρνου μοντέλο 7990 (Jones Chromatography) και μία συστοιχία ανιχνευτή διόδων Jasco MD-910 ενωμένη σε σειρά με έναν Jasco FP-920 ανιχνευτή φθορισμού. Το σύστημα της HPLC λειτουργήθηκε με το πρόγραμμα ChromPass software (Jasco). Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Luna C18(2) (250 mm X 4.6 mm i.d., 5μm, Phenomenex). Ο διαχωρισμός των φάσεων επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας διάλυμα έκλουσης με αρχική σύνθεση 90% διπλά απεσταγμένο νερό με 0,1% μυρμηγκικό οξύ και 10% μεθανόλη. Το ποσοστό του δεύτερου διαλύτη (μεθανόλη) αυξανόταν σταδιακά. Μετά από 25 λεπτά αυξήθηκε κατά 11% και διατηρήθηκε σε αυτό το επίπεδο για 20 λεπτά. Ύστερα, αυξήθηκε σε συνολικό ποσοστό 50% και μετά από παραμονή 10 λεπτών σε αυτό το επίπεδο ανήλθε στο 95% όπου και παρέμεινε για 8 λεπτά. Κατά τις τελευταίες φάσεις μειώθηκε το ποσοστό του δεύτερου διαλύτη στο αρχικό επίπεδο του 10%. Το πρόγραμμα είχε συνολική διάρκεια 70 λεπτών. Ο ρυθμός ροής ήταν σταθερός στα 0,9mL/min και η θερμοκρασία στους 30 °C. Τα φαινολικά συστατικά παρακολουθήθηκαν στα 260nm, 280nm και 320 nm χρησιμοποιώντας DAD και στα 280nm οι φλαβανόλες με χρήση ανιχνευτή φθορισμού. Η ποσοτικοποίηση επιτεύχθηκε μετά από χρήση πρότυπων διαλυμάτων ουσιών, υπολογισμό των χρόνων εμφάνισης των κορυφών και αντίστοιχη βάση δεδομένων.

Η διαδικασία της προετοιμασίας των δειγμάτων είχε ως εξής:

- Χρήση Falcon 50ml. Εισαγωγή 10ml δείγματος, 10ml dH<sub>2</sub>O και 10ml οξικού αιθυλεστέρα
- Ανάδευση σε vortex για 2min
- Φυγοκέντρηση στις 5000rpm για 3min στους 15 βαθμούς κελσίου
- Συλλογή υπερκείμενου με χρήση πιπέτας σε vial
- Επανάληψη 3 φορές

Μετά τη συλλογή του υπερκείμενου σε vial ακολουθεί εξάτμιση του διαλύτη:

- Ρύθμιση στις 60rpm με 30 °C
- Πλύσιμο φιάλης με 1ml MeOH/H<sub>2</sub>O
- Συλλογή με σύριγγα και φιλτράρισμα σε vial HPLC

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### ΠΟΡΕΙΑ ΖΥΜΩΣΗΣ ΚΑΙ ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί σε προηγούμενο κεφάλαιο, η αλκοολική ζύμωση παρακολουθείτο καθημερινά σχεδόν, καταγράφοντας τους βαθμούς Brix στους 20 °C προς καθορισμό της πυκνότητας του γλεύκους. Σχηματικά η πορεία της αλκοολικής ζύμωσης παρουσιάζεται στο γράφημα 4.



Γράφημα 4 Πορεία της αλκοολικής ζύμωσης

Παράλληλα με το ειδικό βάρος, γίνονταν μετρήσεις ως προς την ολική ογκομετρούμενη οξύτητα του γλεύκους και το pH, ενώ με το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης και μετά το φιλτράρισμα του οίνου μετρήθηκαν τα επίπεδα του θειώδη ανυδρίτη (ολικού και ελεύθερου), ο αλκοολικός βαθμός και η πτητική οξύτητα. Τα αποτελέσματα των προαναφερθέντων αναλύσεων παρουσιάζονται στο πίνακα 4.

Πίνακας 4 Αποτελέσματα βασικών αναλύσεων

Ροδίτης	Brix	Vol %	pH	O.O.	SO2 ΟΛ.	SO2 ΕΛ.	Πτητική Οξ.
13/10/2015	18,7	-	3,816	4,35	-	-	-
14/10/2015	17,7	-	3,795	4,82	-	-	-
15/10/2015	13,3	-	3,624	4,7	-	-	-
16/10/2015	10,3	-	3,507	5,1	-	-	-
19/10/2015	5,7	-	3,618	4,7	-	-	-
4/11/2015	0,994	10,5	3,7	4,8	33,2	5,1	0,297

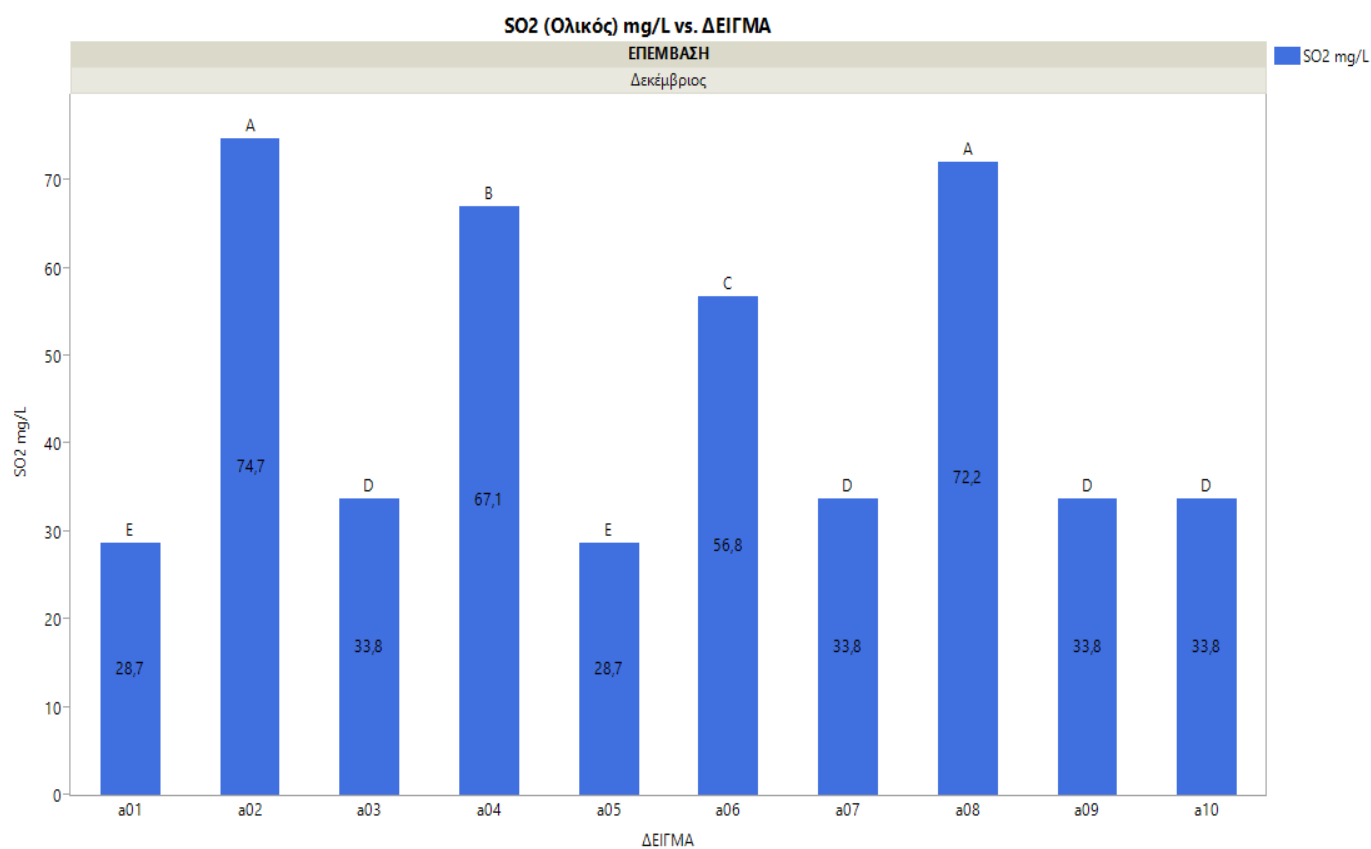
### ΟΛΙΚΟ ΔΙΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΘΕΙΟΥ (SO<sub>2</sub> total)

Στα γραφήματα που ακολουθούν (5, 6, 7) φαίνονται οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων (a1-a10) σε ολικό θειώδη ανυδρίτη και πως αυτές διαφέρουν ή όχι στατιστικώς από δείγμα σε δείγμα. Η σημαντικά στατιστική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων φαίνεται από το γράμμα που χαρακτηρίζει την κάθε συγκέντρωση, τα διαφορετικά γράμματα διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους μετά από στατιστική ανάλυση ζευγών Tukey HSD,  $p < 0,01$ .

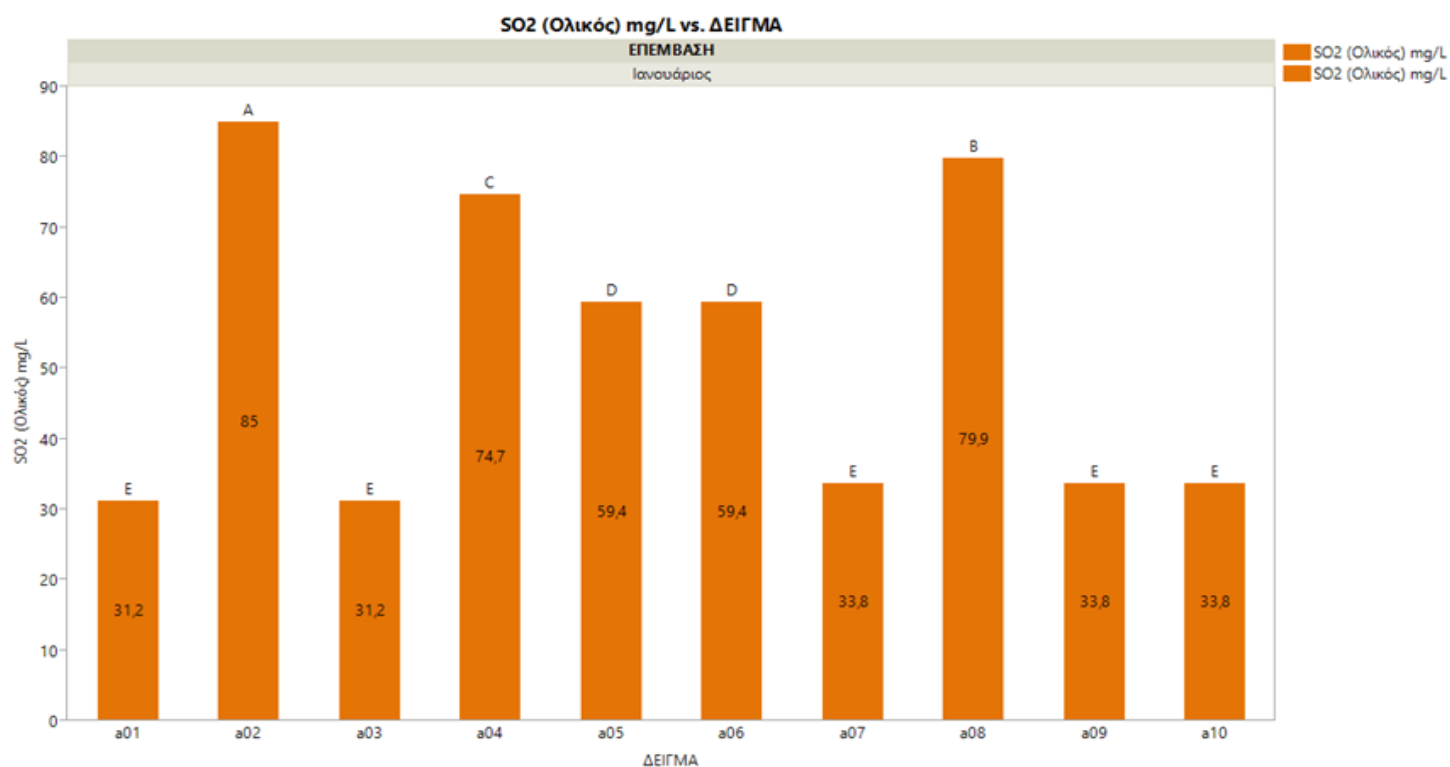
Σε όλες τις επεμβάσεις (μήνες) η συγκέντρωση των δειγμάτων σε θειώδη ανυδρίτη και γλουταθειόνη είναι αυτή που έχει ήδη αναφερθεί στους πίνακες 1 και 2. Η διαφοροποίηση που υπάρχει μεταξύ των επεμβάσεων είναι το χρονικό διάστημα που έχει περάσει μετά την προσθήκη των αντιοξειδωτικών ουσιών και το αποτέλεσμα που επιδιώκεται είναι η διαφοροποίηση στη συντήρηση ή μη των αντιοξειδωτικών ουσιών με το πέρασμα του χρόνου, ώστε να διευκρινισθεί αν τα δείγματα με γλουταθειόνη όντως προσφέρουν αντιοξειδωτική προστασία σε σχέση με το θειώδη ανυδρίτη.

Κατά το μήνα Δεκέμβριο λοιπόν, όπως φαίνεται στο γράφημα 5, αξίζει να παρατηρηθούν αρχικά τα δείγματα 1 και 5. Αυτά, δεν περιέχουν GSH αλλά διαφοροποιούνται ως προς τη συγκέντρωση σε SO<sub>2</sub>, το 1 δεν περιέχει SO<sub>2</sub> ενώ το 5 περιέχει 50 mg/L σε ολικό θειώδη ανυδρίτη. Παρά τη διαφορά αυτή τα δείγματα δεν διαφέρουν στατιστικώς ως προς τη συγκέντρωση σε θειώδη ανυδρίτη. Το ίδιο παρατηρείται και στα δείγματα 2 και 8 τα οποία διαφοροποιούνται ως προς τη συγκέντρωση σε GSH ενώ περιέχουν και τα δύο 100 mg/L SO<sub>2</sub>. Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης η διαφορά μεταξύ των δειγμάτων 3 και 6. Τα δύο δείγματα ενώ περιέχουν ίδια συγκέντρωση GSH διαφοροποιούνται εξαιτίας τις διαφορετικής ποσότητας θειώδη που περιέχουν. Η προστασία όμως του ολικού θειώδη φαίνεται να επηρεάζεται και από τη συγκέντρωση GSH αν παρατηρήσει κανείς τα δείγματα 1 και 3 τα οποία διαφοροποιούνται μόνο ως προς τη GSH και διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους.

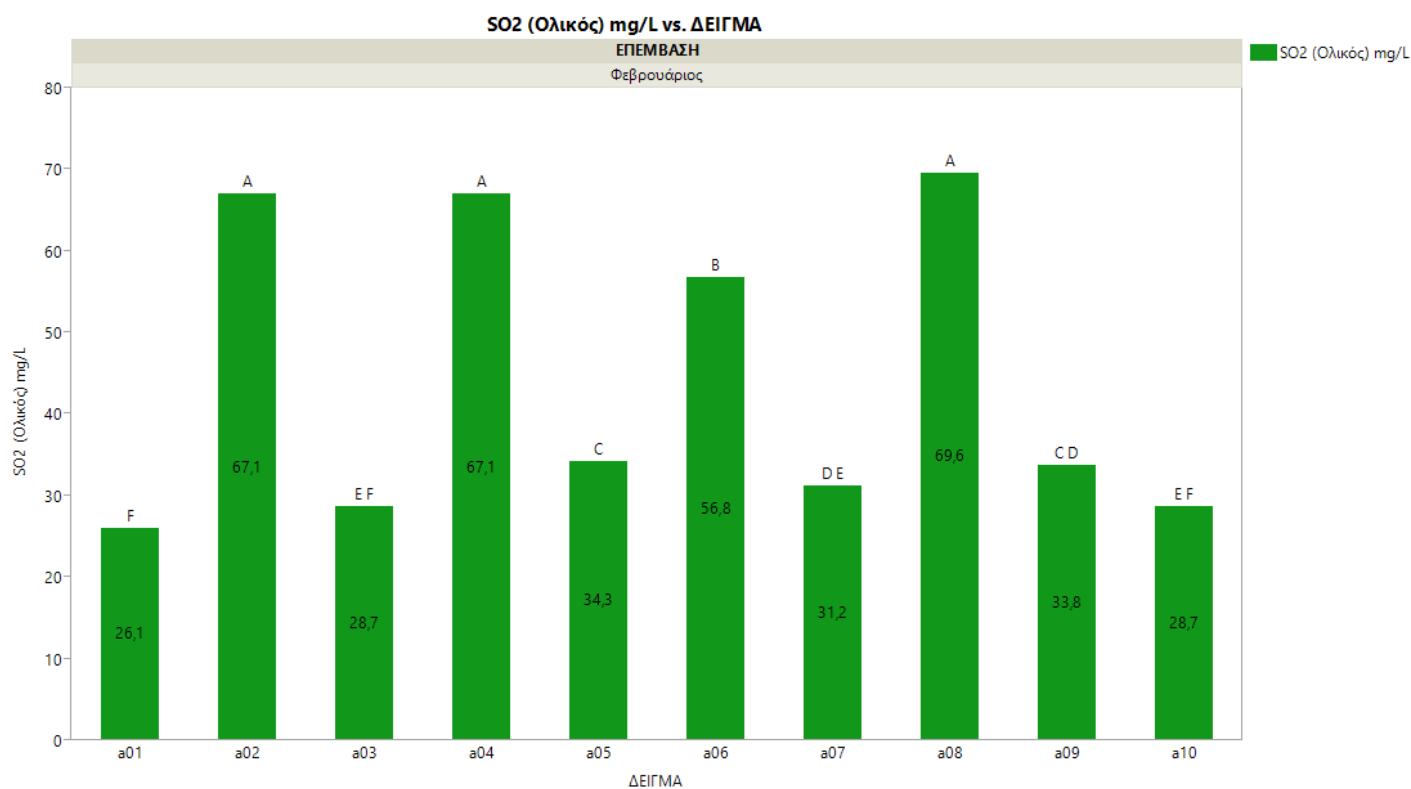
Στις επόμενες μετρήσεις, τους μήνες Ιανουάριο (γράφημα 6) και Φεβρουάριο (γράφημα 7), οι διαφοροποιήσεις των δειγμάτων δεν άλλαξαν μεταξύ τους. Αξίζει όμως να σημειωθεί, πως τα δείγματα που περιείχαν GSH σε υψηλή συγκέντρωση (3, 6) διατήρησαν μικρότερο ρυθμό μείωσης της συγκέντρωσης του ολικού SO<sub>2</sub> σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα, καταδεικνύοντας ίσως την προστατευτική αντιοξειδωτική δράση της GSH.



Γράφημα 5 Συγκέντρωση ολικού θειώδη ανυδρίτη το μήνα Δεκέμβριο



Γράφημα 6 Συγκέντρωση ολικού θειώδη ανυδρίτη το μήνα Ιανουάριο



*Γράφημα 5 Συγκέντρωση ολικού θειώδη ανυδρίτη το μήνα Φεβρουάριο*

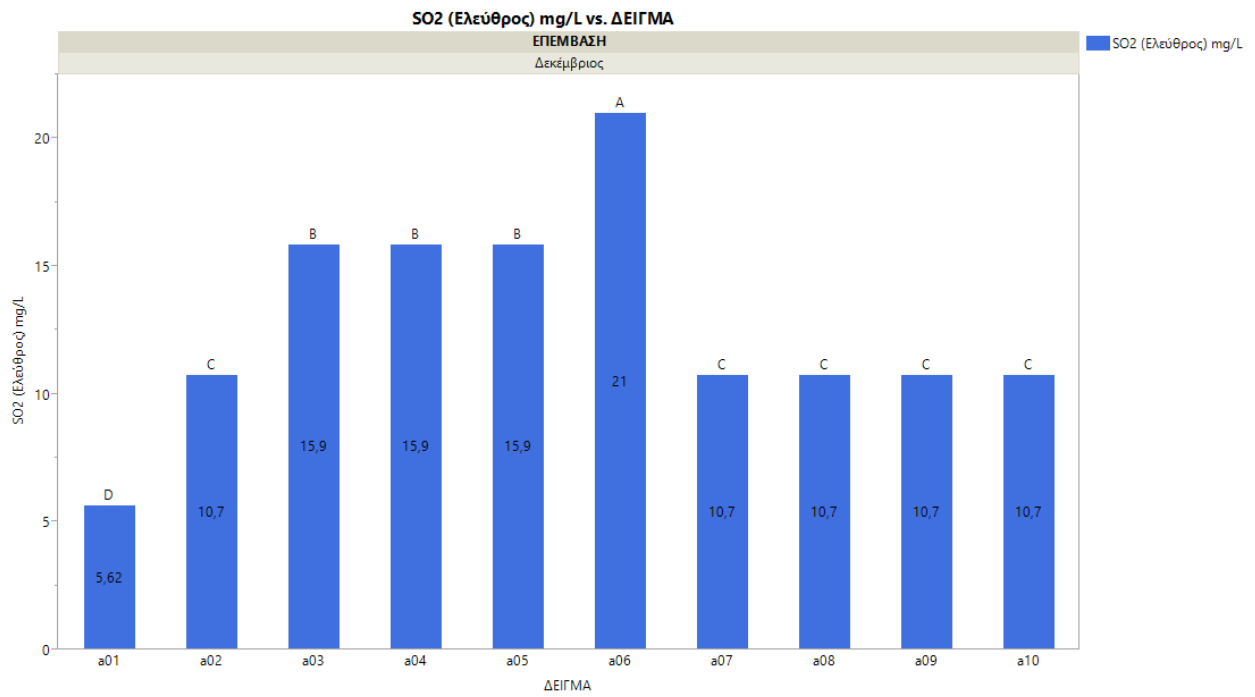
### ΕΛΕΥΘΕΡΟ ΔΙΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΘΕΙΟΥ (SO<sub>2</sub> free)

Στα γραφήματα που ακολουθούν (8, 9, 10) παρουσιάζονται οι αντίστοιχες μετρήσεις ανά μήνα του ελεύθερου θειώδη ανυδρίτη και οι στατιστικές διαφοροποιήσεις μεταξύ τους.

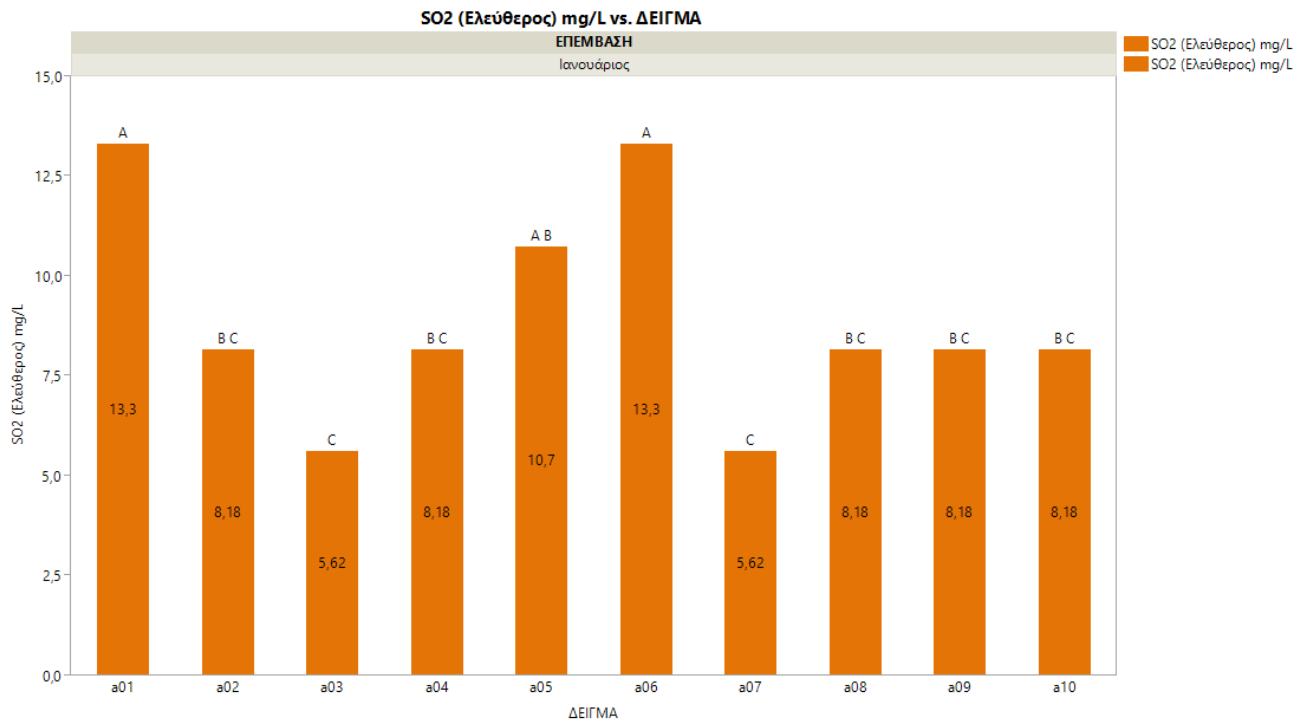
Η περιεκτικότητα του ελεύθερου θειώδη ανυδρίτη θεωρείται πως πρέπει να κυμαίνεται πάνω από 20 – 25 mg/L ώστε να προσφέρει αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική προστασία, ωστόσο, όπως ήδη αναφέρθηκε δεν έχει γίνει προσθήκη θειώδους πέρα της αρχικής επέμβασης, ώστε να αξιολογηθεί η συνεισφορά της GSH στη διατήρηση των επιπέδων του SO<sub>2</sub>.

Στους πρώτους μήνες η αναλογίες και οι διαφοροποιήσεις μεταξύ των δειγμάτων φαίνεται να έχουν διατηρηθεί σε αναλογία με τις μετρήσεις του ολικού θειώδη ανυδρίτη. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει όμως το δείγμα 6 το οποίο περιέχει 20 mg/L GSH και μόλις 50 mg/L SO<sub>2</sub>. Από τον πρώτο κιόλας μήνα διατηρεί στα υψηλότερα επίπεδα τη συγκέντρωση του ελεύθερου θειώδη ενώ το Φεβρουάριο διαφέρει στατιστικώς από όλα τα υπόλοιπα. Αντίθετα το δείγμα 4 το οποίο διαφέρει ως προς την υψηλότερη συγκέντρωση θειώδη φαίνεται να οξειδώθηκε πιο γρήγορα κι έφτασε στα επίπεδα των υπόλοιπων δειγμάτων. Βέβαια, από αυτή και μόνο την ανάλυση δεν μπορεί να βγει ασφαλές συμπέρασμα για το ρόλο της GSH ως υποκατάστατο του SO<sub>2</sub> αλλά φαίνεται πως η παρουσία της επιδρά θετικά. Συμπερασματικά, θα αναπτυχθεί ο ρόλος της σε επόμενο κεφάλαιο λαμβάνοντας υπόψιν τη δράση της και στις υπόλοιπες αναλύσεις των οποίων τα αποτελέσματα θα εκτεθούν στη συνέχεια του παρόντος κεφαλαίου.

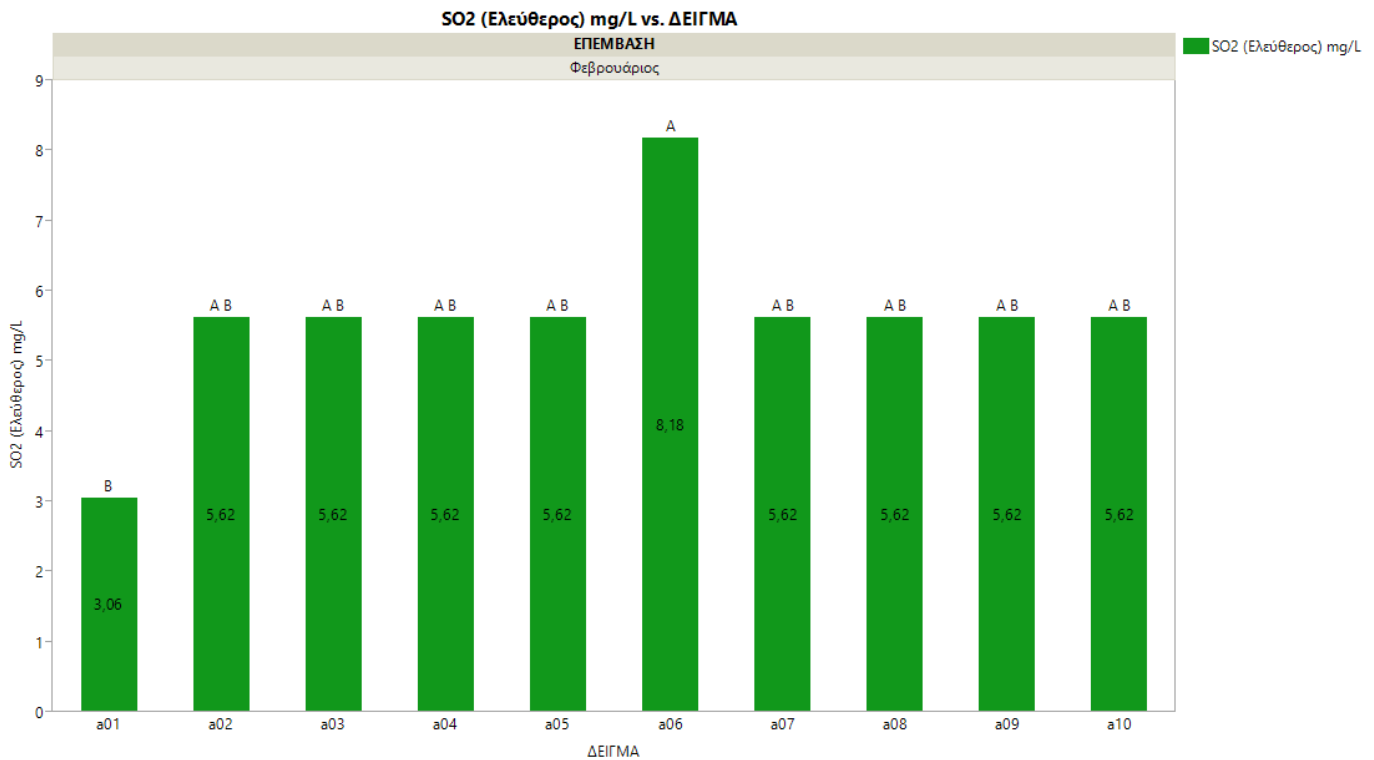




Γράφημα 6 Συγκέντρωση ελεύθερου θειώδη ανυδρίτη το μήνα Δεκέμβριο



Γράφημα 7 Συγκέντρωση ελεύθερου θειώδη ανυδρίτη το μήνα Ιανουάριο



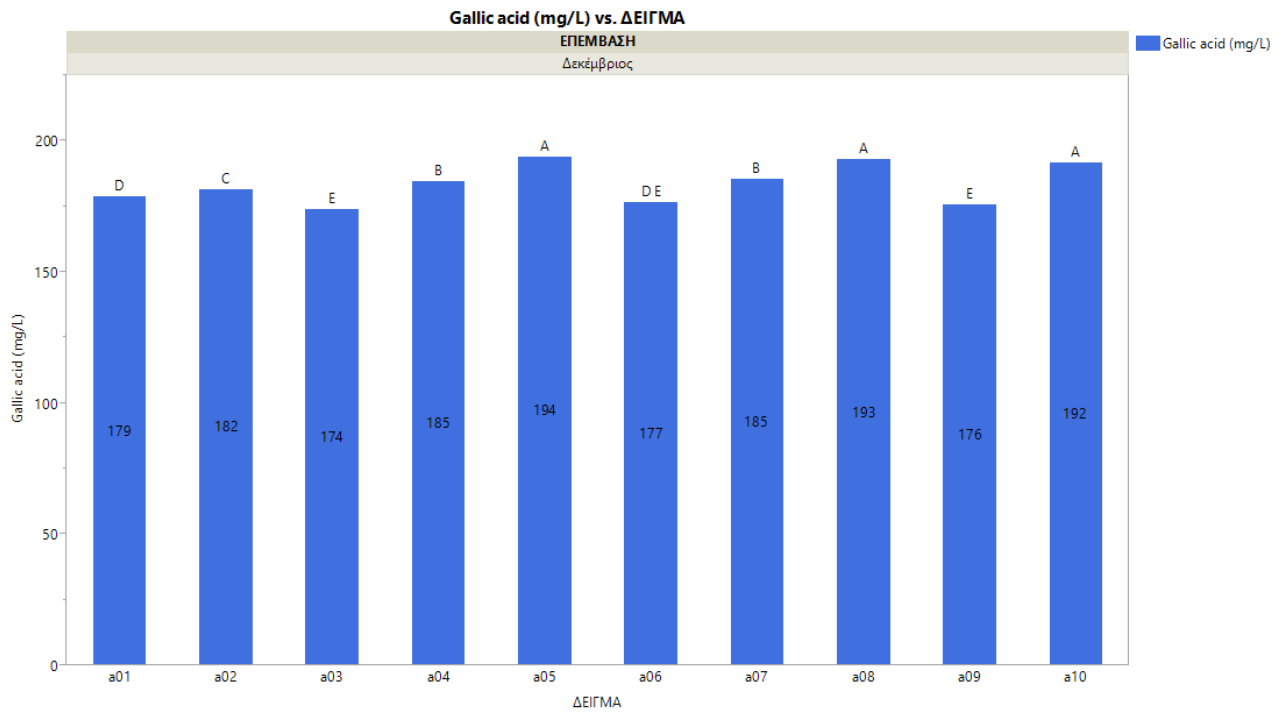
Γράφημα 8 Συγκέντρωση ελεύθερου θειώδη ανυδρίτη το μήνα Φεβρουάριο

### ΟΛΙΚΑ ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ (Μέθοδος FOLIN-CIOCALTEAU)

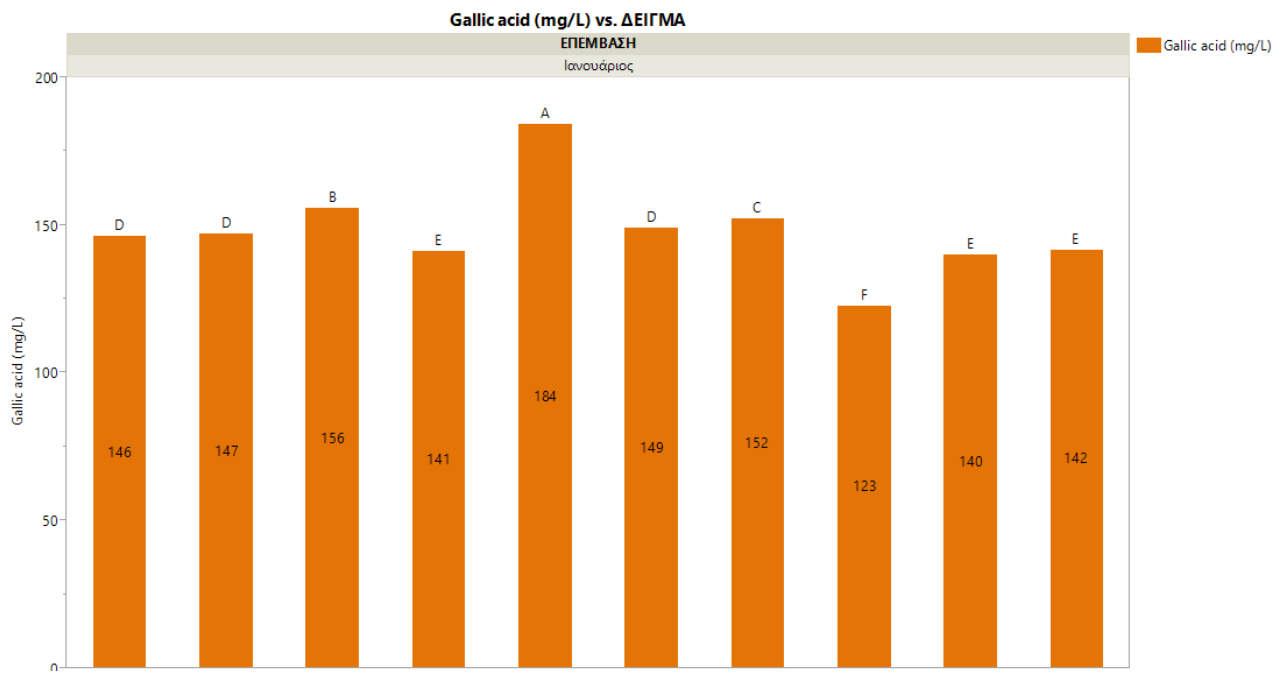
Για τη μέτρηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου χρησιμοποιήθηκε η επίσημη μέθοδος του OIV Folin – Ciocalteu. Στα διαγράμματα που ακολουθούν ( 11, 12, 13) παρουσιάζεται η συγκέντρωση των δειγμάτων σε φαινολικές ενώσεις η οποία εκφράζεται σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος. Τα γράμματα που συνοδεύουν κάθε συγκέντρωση καθορίζουν και αν τα δείγματα διαφέρουν στατιστικώς ή όχι.

Όπως παρατηρείται στα διαγράμματα η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων ακολούθησε μία πτωτική τάση με την πάροδο του χρόνου σε σχέση με τα αρχικά δείγματα όπου έγινε προσθήκη αντιοξειδωτικών ουσιών ( SO<sub>2</sub> και GSH). Ενώ εμφανίζονται στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων, η ολική συγκέντρωση σε φαινολικές ενώσεις δεν διαφοροποιείται σε πολύ μεγάλο βαθμό. Το μήνα Δεκέμβριο το εύρος συγκέντρωσης μεταξύ των δειγμάτων κυμαίνεται μεταξύ 174 – 194 mg/L ισοδύναμα γαλλικού οξέος. Τον Ιανουάριο η διαφοροποίηση των τιμών είναι μεγαλύτερη ( 123 – 184 mg/L) ενώ το Φεβρουάριο 84,6 – 114 mg/L. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα δείγματα 6 και 3 (περιέχοντα GSH χωρίς SO<sub>2</sub> και με SO<sub>2</sub> αντίστοιχα) σε σχέση με το δείγμα 2 που περιέχει μόνο SO<sub>2</sub> στην υψηλότερη συγκέντρωση (πίνακες 1, 2). Ενώ, όπως ήταν αναμενόμενο, το δείγμα 2 παρουσιάζει κατά το πρώτο μήνα (γράφημα 11) υψηλότερη συγκέντρωση φαινολικού φορτίου παρεμποδίζοντας την οξειδωσή των φαινολικών ενώσεων, τον Ιανουάριο δεν διαφέρει στατιστικώς από το δείγμα 6 και το Φεβρουάριο κυμαίνεται σε χαμηλότερες τιμές, με στατιστικώς σημαντική διαφορά, και από

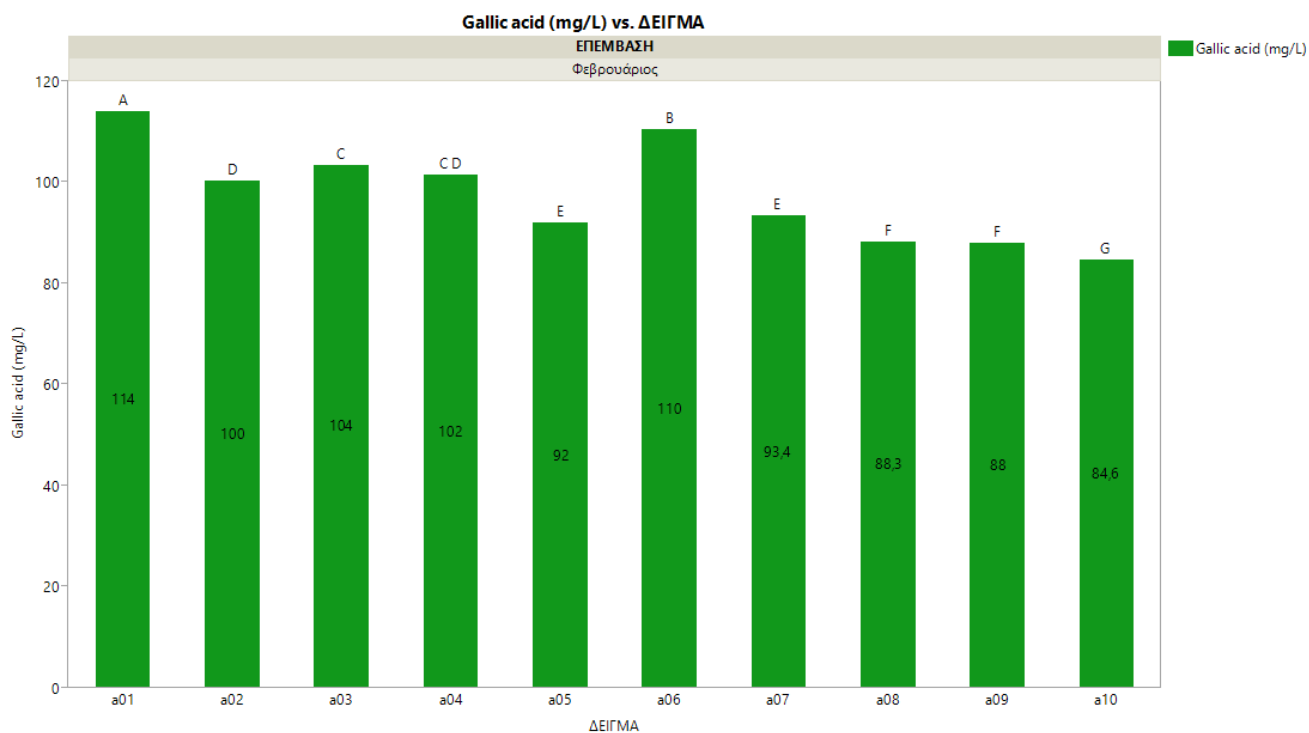
τα δύο δείγματα (3, 6) που στερούνται σχετικά της προστασίας του θειώδη. Ενισχύεται έτσι η άποψη πως η GSH προσφέρει αντιοξειδωτική προστασία στις φαινολικές ενώσεις κατά τη συντήρηση των οίνων.



Γράφημα 9 Συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων το μήνα Δεκέμβριο



Γράφημα 10 Συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων το μήνα Ιανουάριο

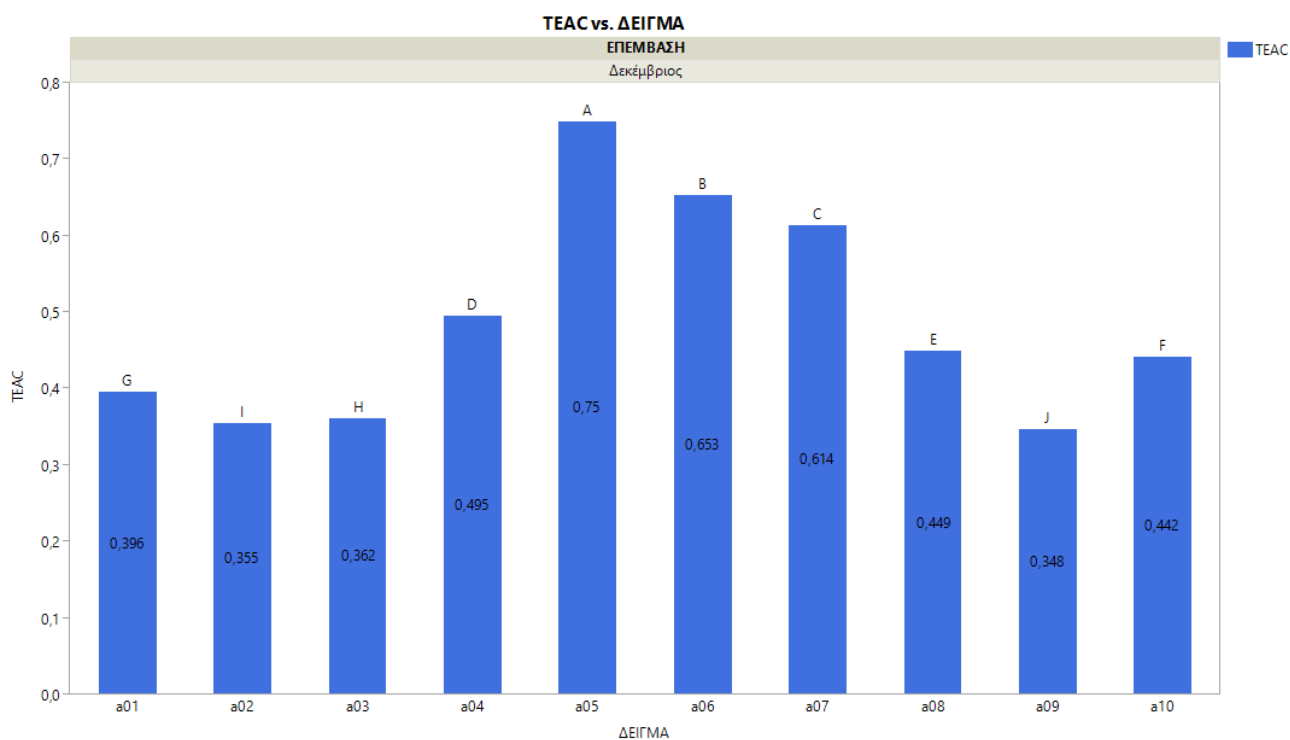


*Γράφημα 11 Συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων το μήνα Φεβρουάριο*

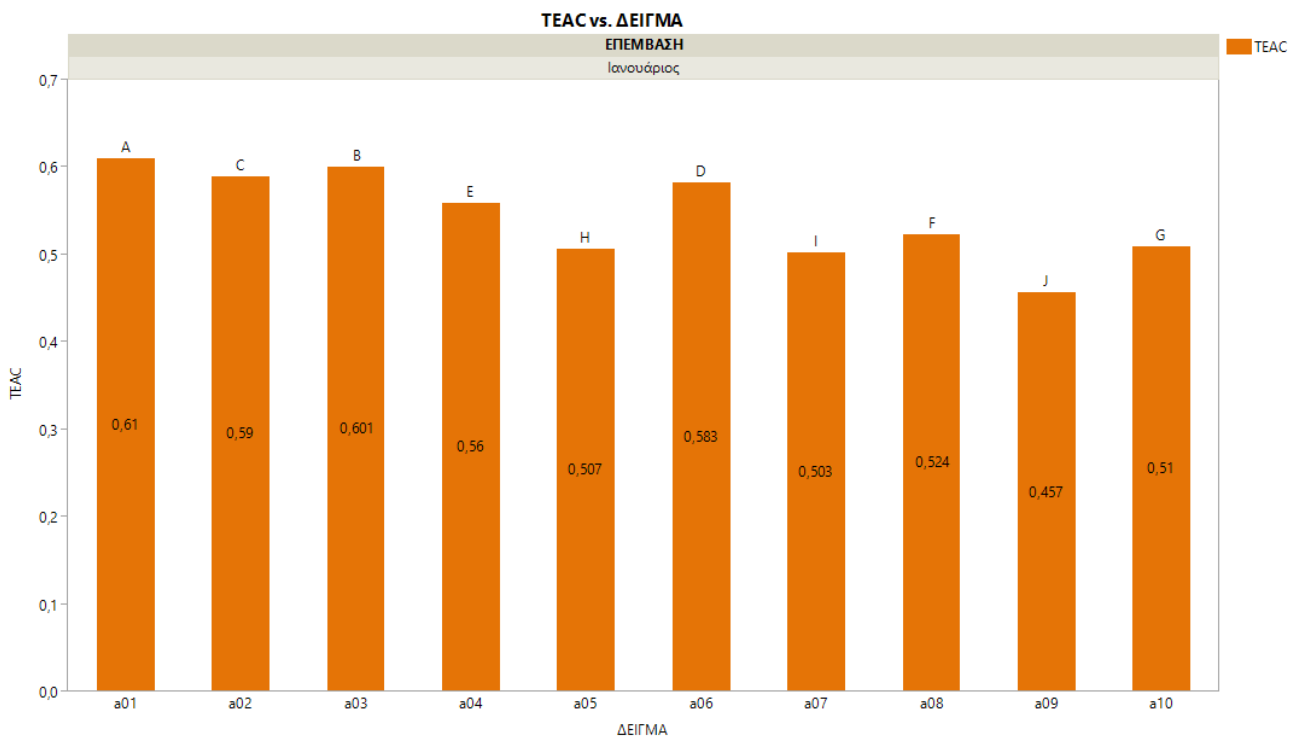
### ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ (Μέθοδος DPPH)

Τα αποτελέσματα που ακολουθούν εκφράζουν την αντιοξειδωτική ικανότητα των δειγμάτων της ποικιλίας Ροδίτη μετρημένη με τη μέθοδο DPPH. Η αντιοξειδωτική ικανότητα εκφράζεται σε ισοδύναμα mM Trolox ή αλλιώς TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). Στα γραφήματα 14, 15, 16 όπου και εμφανίζονται τα αποτελέσματα της μεθόδου τους μήνες Δεκέμβριο, Ιανουάριο και Φεβρουάριο αντίστοιχα, φαίνονται οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων σε TEAC, ενώ το γράμμα που υπάρχει δηλώνει τη στατιστικώς ή μη σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τα υπόλοιπα δείγματα. Τα δείγματα με το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικώς. Όπως σε όλες τις αναλύσεις των δειγμάτων ακολουθήθηκε η ίδια στατιστική αναλυτική μέθοδος των ζευγών Tukey HSD,  $p < 0,01$ .

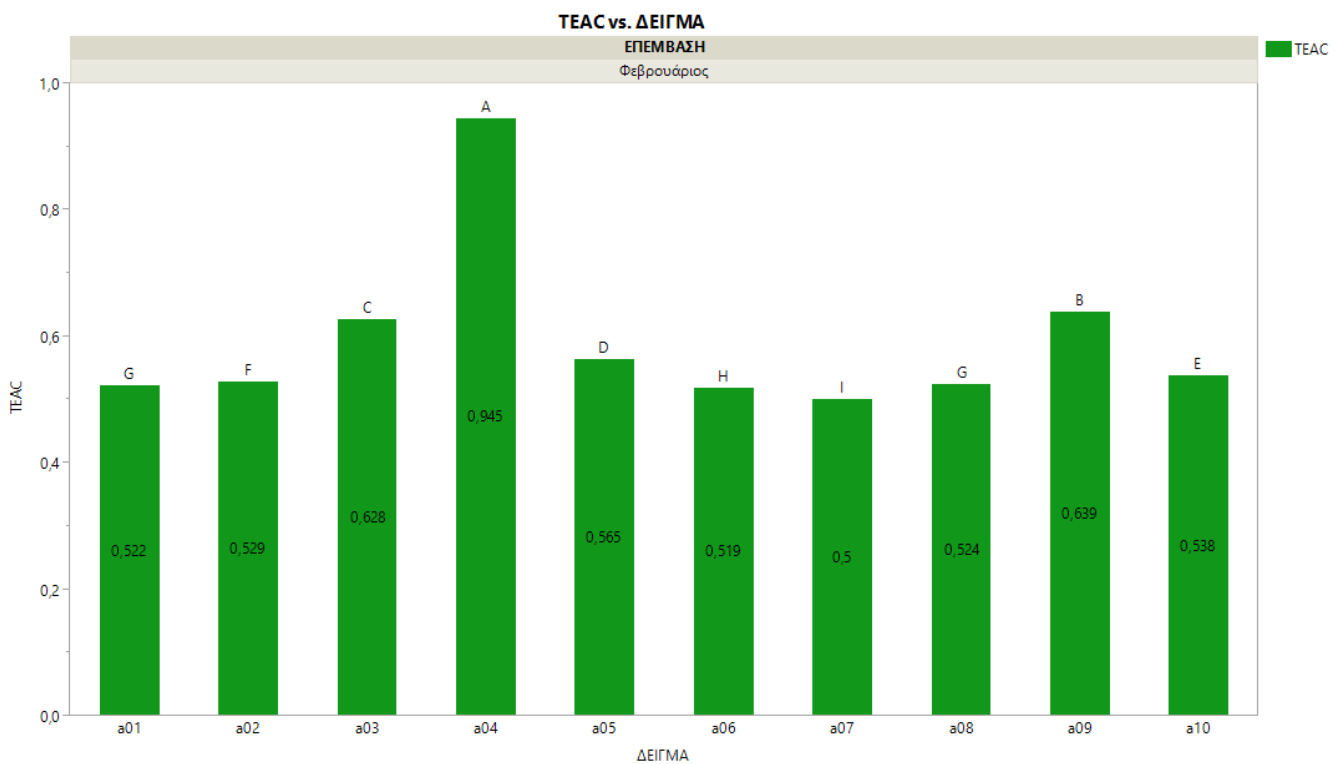
Σε όλες τις μηνιαίες μετρήσεις παρατηρείται πως όλα τα δείγματα διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους. Αυτό οφείλεται στη μέθοδο αφού εκτός από το θειώδη ανυδρίτη και τη γλουταθειόνη που δρουν ως αντιοξειδωτικά υπάρχουν και άλλες ενώσεις που δρουν ως δότες υδρογόνου ή ηλεκτρονίων. Τέτοιες ενώσεις, για παράδειγμα, είναι τα φαινολικά συστατικά του οίνου κυρίως καθώς και διάφορες πτητικές ενώσεις που διαθέτουν φαινολικούς δακτυλίους .



Γράφημα 12 Αντιοξειδωτική ικανότητα δειγμάτων σε TEAC το μήνα Δεκέμβριο



Γράφημα 13 Αντιοξειδωτική ικανότητα δειγμάτων σε TEAC το μήνα Ιανουάριο



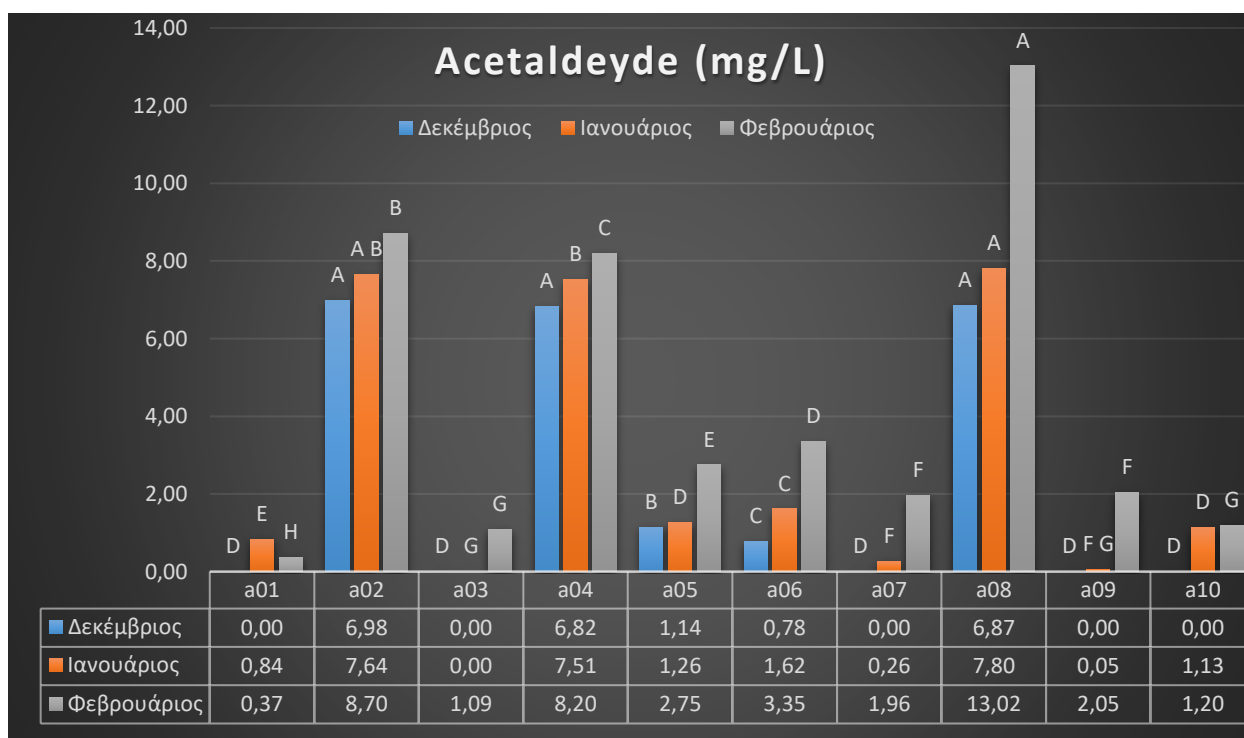
Γράφημα 14 Αντιοξειδωτική ικανότητα δειγμάτων σε TEAC το μήνα Φεβρουάριο

## ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΚΕΤΑΛΔΕΪΔΗΣ

Στο γράφημα 17 παρουσιάζεται η συγκέντρωση των δειγμάτων σε ακεταλδεΐδη (mg/l) στο διάστημα των τριών μηνών όπου πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις. Κάθε μήνας παρουσιάζεται με διαφορετικό χρώμα στηλών, όπως φαίνεται στο υπόμνημα του γραφήματος, ενώ σε πίνακα εντός του γραφήματος φαίνονται τα ποσοτικά αποτελέσματα της μεθόδου. Τα δείγματα με το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν σημαντικά στατιστικώς.

Υπενθυμίζεται πως η ακεταλδεΐδη παράγεται στους οίνους μετά την οξείδωση της αιθανόλης και η παρουσία της αποτελεί δείκτη της οξειδωτικής κατάστασης του μέσου. Η ακεταλδεΐδη επίσης σχηματίζεται και ως παραπροϊόν της αλκοολικής ζύμωσης από την αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού οξέος. Η προσθήκη θειώδους κατά την οινοποίηση έχει ως αποτέλεσμα την δέσμευση της ακεταλδεΐδης λόγω αντίδρασης προσθήκης και κατά συνέπεια την παρουσία της σε υψηλά ποσοστά στους οίνους.

Το μήνα Δεκέμβριο παρατηρείται σημαντική διαφορά των δειγμάτων 2, 4, 8 με τα υπόλοιπα δείγματα. Τα δείγματα αυτά είναι τα μόνα με συγκέντρωση SO<sub>2</sub> 100 mg/l.



Γράφημα 15 Συγκέντρωση ακεταλδεΐδης δειγμάτων σε διάστημα 3 μηνών

## ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΜΕ GC-FID SPME

Στα διαγράμματα που ακολουθούν παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μεθόδου GC-FID SPME. Οι ταυτοποιημένες πτητικές ενώσεις μαζί με τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης ANOVA παρουσιάζονται ανά μήνα, ενώ έχουν χωριστεί σε χημικές ομάδες.

Αν και αναμένονταν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων εξαιτίας των διαφορετικών συγκεντρώσεων σε θειώδη ανυδρίτη και γλουταθειόνη (βλ. πίνακες 1,2), ωστόσο δεν αναγνωρίστηκαν ως στατιστικά σημαντικές σύμφωνα με την ανάλυση ζευγών Tukey HSD,  $p < 0,01$ .

Αναλυτικότερα, όπως φαίνεται στα διαγράμματα 18 – 20, τα δείγματα δεν διαφοροποιήθηκαν μεταξύ τους σημαντικά σε κανέναν μήνα εντός του τριμήνου των μετρήσεων. Οι όποιες διαφορές προέκυψαν ως σημαντικές στατιστικά, οφείλονται στο γεγονός της μη ανίχνευσης της ουσίας και άρα τη μηδενική της συγκέντρωση.



Γράφημα 16 Συγκέντρωση αιθυλικών εστέρων ευθείας αλύσου το μήνα Δεκέμβριο



## ΑΙΘΥΛΙΚΟΙ ΕΣΤΕΡΕΣ ΕΥΘΕΙΑΣ ΑΛΥΣΟΥ (mg/L) ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ



Γράφημα 17 Συγκέντρωση αιθυλικών εστέρων ευθείας αλύσου το μήνα Ιανουάριο

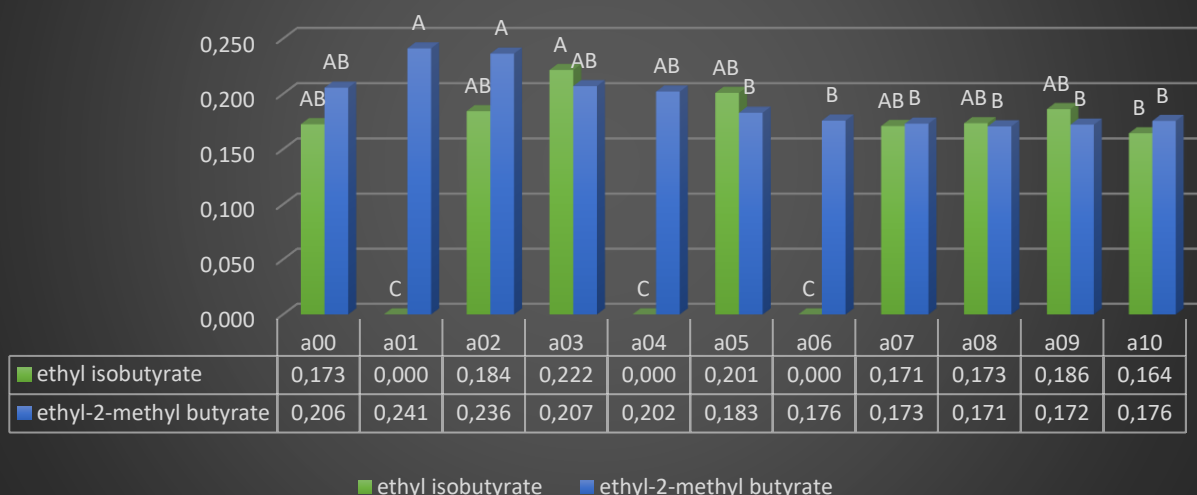
## ΑΙΘΥΛΙΚΟΙ ΕΣΤΕΡΕΣ ΕΥΘΕΙΑΣ ΑΛΥΣΟΥ (mg/L) ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ



Γράφημα 18 Συγκέντρωση αιθυλικών εστέρων ευθείας αλύσου το μήνα Φεβρουάριο

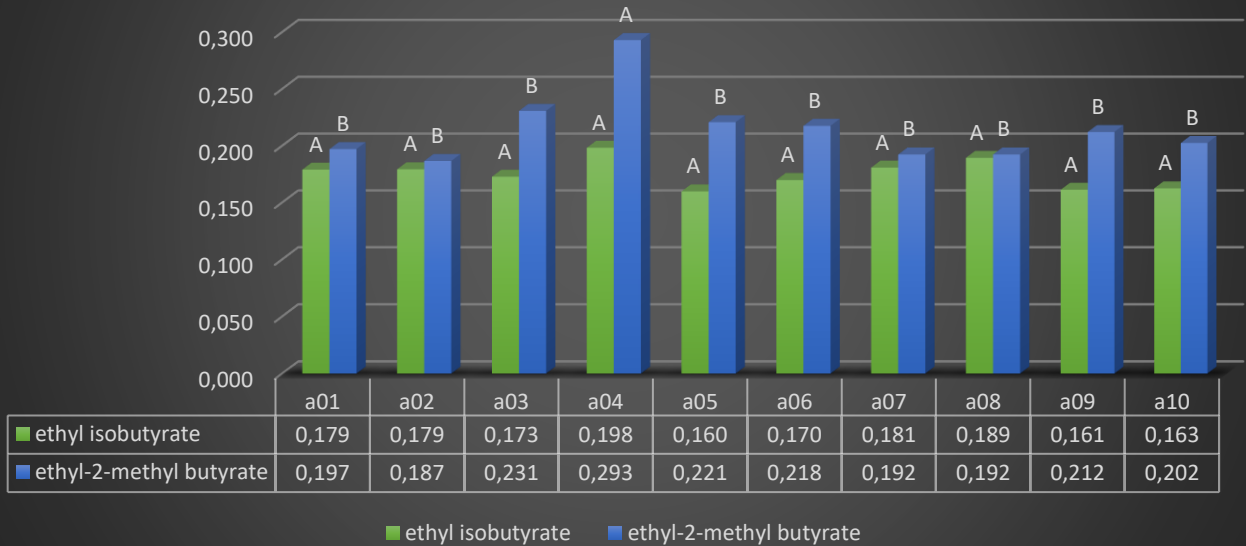
Στα διαγράμματα 21 – 23 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων σε αιθυλικούς εστέρες διακλαδωμένης αλύσου καθώς και τα αποτελέσματα της στατιστικής τους ανάλυσης. Παρατηρείται πως τα δείγματα 3,4 περιέχοντα υψηλή συγκέντρωση GSH (βλ. πίνακες 1, 2) διατήρησαν σε χαμηλότερα επίπεδα, με στατιστικώς σημαντική διαφορά, τη συγκέντρωση του αιθυλ-2-μεθυλοβουτυρικού εστέρα συγκρινόμενα με τα δείγματα 1, 2 τα οποία δεν περιείχαν γλουταθειόνη. Φαίνεται λοιπόν, πως τα ελεύθερα οργανικά οξέα του οίνου και η αντίδρασή τους με την αιθυλική αλκοόλη προς σχηματισμό εστέρων δεν επηρεάστηκαν από τη συγκέντρωση αντιοξειδωτικών ουσιών, τουλάχιστον το πρώτο μήνα μέτρησης. Κατά το μήνα Ιανουάριο όμως, φαίνεται πως το δείγμα 4 επηρεάστηκε θετικώς από την ύπαρξη GSH η οποία σε συνδυασμό με το θειώδη ανυδρίτη έδωσε στατιστικώς σημαντικά αυξημένη συγκέντρωση του αιθυλ-2-μεθυλοβουτυρικού εστέρα σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα τα οποία κινήθηκαν στα ίδια επίπεδα συγκέντρωσης. Με το πέρας τριών μηνών συντήρησης του οίνου, το μήνα Φεβρουάριο (γράφημα 23), παρατηρείται εξισορρόπηση της περιεκτικότητας σε αιθυλικούς εστέρες διακλαδωμένης αλύσου όλων των δειγμάτων με μη σημαντικές στατιστικά διαφορές. Η επίδραση λοιπόν της αρχικής προστιθέμενης ποσότητας αντιοξειδωτικών σε διάφορες συγκεντρώσεις δεν φαίνεται να διαδραμάτισε ιδιαίτερο ρόλο στο οργανοληπτικό προφίλ του οίνου, τουλάχιστον όσων αφορά τη συγκεκριμένη ομάδα αρωματικών ουσιών.

## ΑΙΘΥΛΙΚΟΙ ΕΣΤΕΡΕΣ ΔΙΑΚΛΑΔΩΜΕΝΗΣ ΑΛΥΣΟΥ (mg/L) ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ



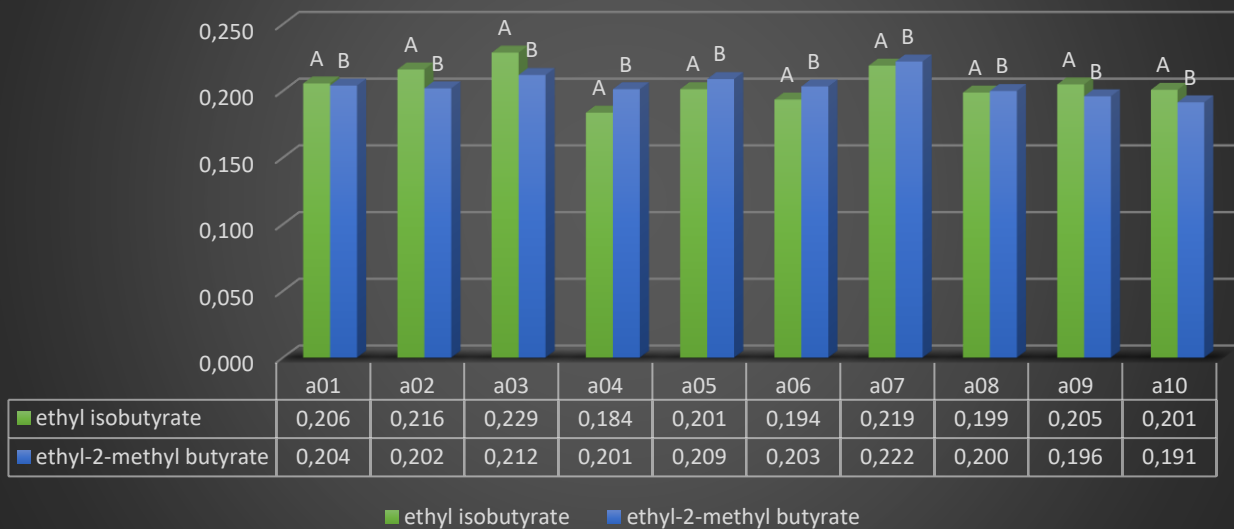
Γράφημα 19 Συγκέντρωση αιθυλικών εστέρων διακλαδωμένης αλύσου το μήνα Δεκέμβριο

## ΑΙΘΥΛΙΚΟΙ ΕΣΤΕΡΕΣ ΔΙΑΚΛΑΔΩΜΕΝΗΣ ΑΛΥΣΟΥ (mg/L) ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ



Γράφημα 20 Συγκέντρωση αιθυλικών εστέρων διακλαδωμένης αλύσου το μήνα Ιανουάριο

## ΑΙΘΥΛΙΚΟΙ ΕΣΤΕΡΕΣ ΔΙΑΚΛΑΔΩΜΕΝΗΣ ΑΛΥΣΟΥ (mg/L) ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ



Γράφημα 21 Συγκέντρωση αιθυλικών εστέρων διακλαδωμένης αλύσου το μήνα Φεβρουάριο

Από τους πιθανούς οξικούς εστέρες που μπορεί να ευρισκονται στον οίνο, ταυτοποιήθηκε με την συγκεκριμένη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε ο οξικός ισοαμυλικός εστέρας. Τα αποτελέσματα της μεθόδου φαίνονται στα γραφήματα 24 – 26 ακολουθώντας το μοτίβο παρουσίασης των προηγούμενων γραφημάτων.

Στην πρώτη μέτρηση το μήνα Δεκέμβριο (γράφημα 24) δεν φαίνονται σημαντικές στατιστικά διαφορές μεταξύ των δειγμάτων ως προς τη συγκέντρωση του εν λόγω εστέρα. Το μήνα Ιανουάριο και λόγω της χημικής πλέον εστεροποίησης, παρατηρούνται διαφορές μεταξύ των δειγμάτων. Το δείγμα 4 με τη μεγαλύτερη συνολική συγκέντρωση αντιοξειδωτικών παρουσιάζει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση ενώ το δείγμα 7 με 10 mg/l γλουταθειόνη και χωρίς θειώδη ανυδρίτη τη μικρότερη. Όλα τα υπόλοιπα δείγματα δεν διαφοροποιήθηκαν μεταξύ τους. Με το πέρας άλλου ένα μήνα σε συνθήκες συντήρησης, στη μέτρηση του Φεβρουαρίου (γράφημα 26), παρατηρείται μία εξισορρόπηση της συγκέντρωσης του οξικού ισοαμυλικού εστέρα σε όλα τα δείγματα. Τα δείγματα, ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση σε αντιοξειδωτικά δεν διαφοροποιούνται σημαντικά στατιστικώς εντός τριών μηνών συντήρησης του οίνου.



Γράφημα 22 Συγκέντρωση οξικού ισοαμυλικού εστέρα στο μήνα Δεκέμβριο



Γράφημα 23 Συγκέντρωση οξικού ισοαμυλικού εστέρα το μήνα Ιανουάριο

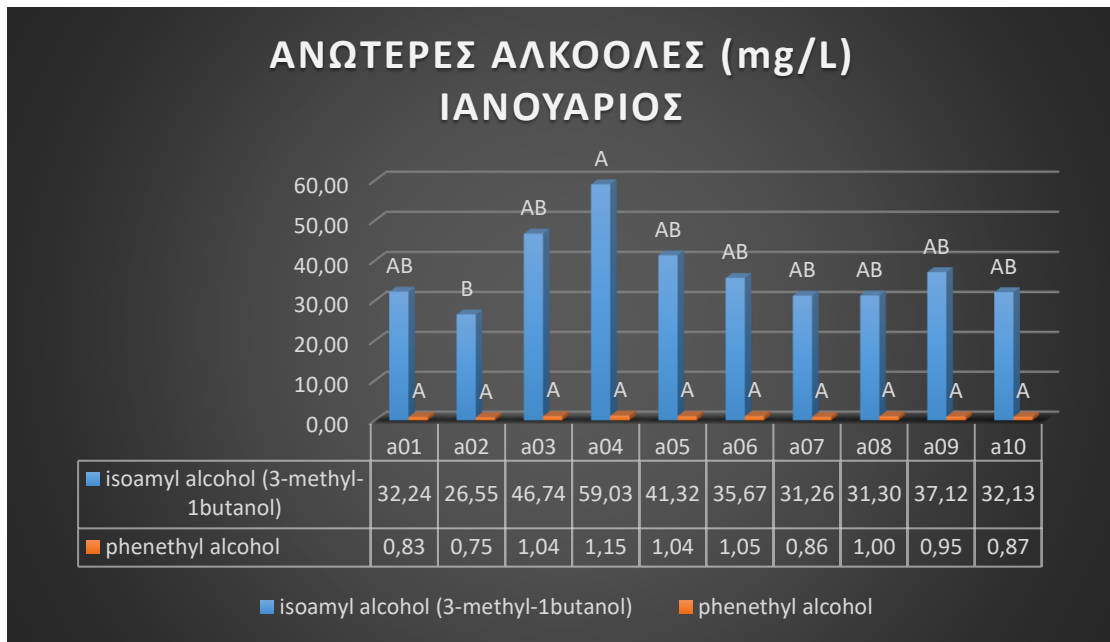


Γράφημα 24 Συγκέντρωση οξικού ισοαμυλικού εστέρα το μήνα Φεβρουάριο

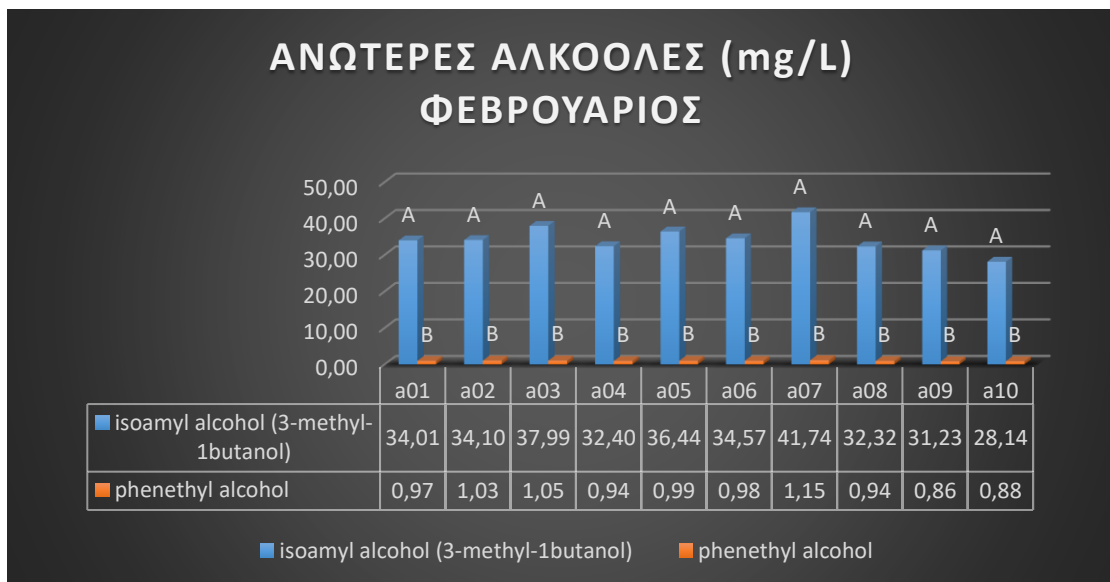
Από τις ανώτερες αλκοόλες, βρέθηκαν στα δείγματα οι 3-μεθυλοβουτανόλη (ισοβουτανόλη) και η φαιναιθυλική αλκοόλη με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας FID – SPME. Στους τρεις μήνες όπου πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις τα δείγματα δεν φαίνεται να διαφοροποιήθηκαν σημαντικά μεταξύ τους. Μόνο κατά τον Ιανουάριο το δείγμα 4, το οποίο περιέχει την υψηλότερη συγκέντρωση σε αντιοξειδωτικά, φαίνεται πως αύξησε σημαντικά την συγκέντρωσή του σε ισοαμυλική αλκοόλη (αρώματα ουίσκι, καπνιστού) με κατώφλι αντίληψης τα 30 mg/l (Coetzee, 2014). Ύστερα από ακόμη ένα μήνα συντήρησης των δειγμάτων, οι συγκεντρώσεις στις ταυτοποιημένες ανώτερες αλκοόλες εξισώνονται και δεν διαφοροποιούνται στατιστικώς.



Γράφημα 25 Συγκέντρωση ανώτερων αλκοολών το μήνα Δεκέμβριο



Γράφημα 26 Συγκέντρωση ανώτερων αλκοολών το μήνα Ιανουάριο



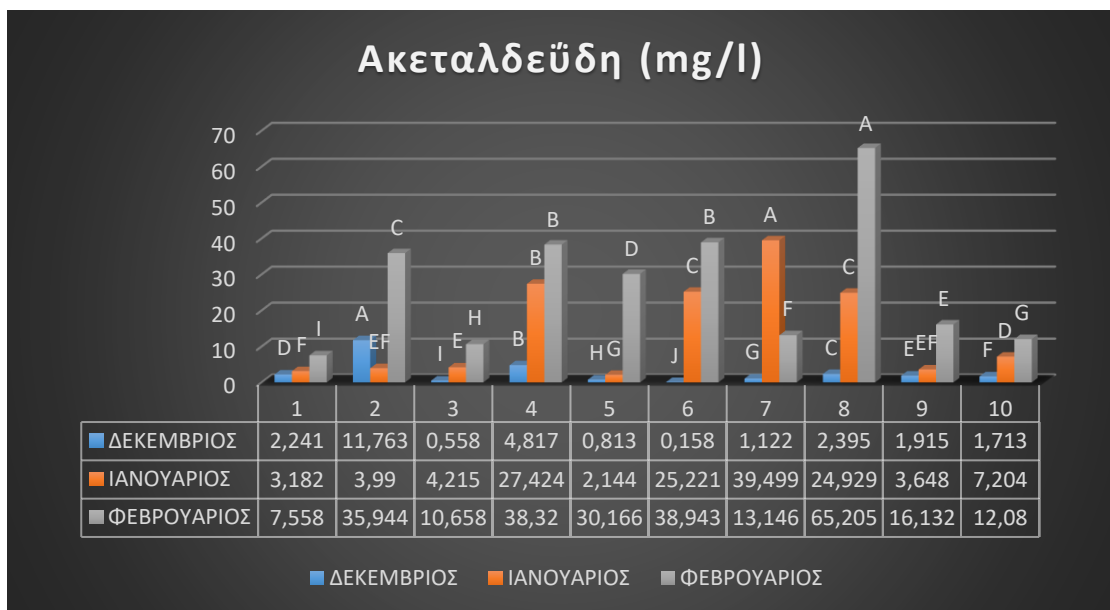
Γράφημα 27 Συγκέντρωση ανώτερων αλκοολών το μήνα Φεβρουάριο

## ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΤΗΤΙΚΩΝ (GC)

Οι κύριες πτητικές ενώσεις ταυτοποιήθηκαν με την μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας GC. Οι ουσίες προσδιορίστηκαν με απευθείας έκχυση των δειγμάτων σε αέριο χρωματογράφο. Η παρουσίαση των αποτελεσμάτων της μεθόδου ακολουθεί το ίδιο μοτίβο με τη παρουσίαση των προηγούμενων αναλύσεων.

Στο γράφημα 27 παρουσιάζεται η ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των δειγμάτων ως προς τη συγκέντρωση ακεταλδεΐδης. Σε σύγκριση με τη φασματοφωτομετρική μέθοδο προσδιορισμού της (γράφημα 17) τα αποτελέσματα δεν διαφοροποιούνται ποιοτικά αλλά υπάρχει διαφορά στη ποσοτική εκτίμηση καθώς η μέθοδος της αέριας χρωματογραφίας είναι πιο ακριβής.

Συγκεκριμένα, η τάση της συγκέντρωσης της παρουσιάζεται αυξητική με το πέρας των μηνών όπως άλλωστε αναμενόταν. Αυτή η αυξητική τάση οφείλεται πιθανότατα στην οξείδωση της αιθανόλης (Wilderandt & Singleton, 1974; Ribéreau-Gayon, 1998, 2004b). Η συγκέντρωση της ακεταλδεΐδης σε χαμηλά επίπεδα (< 0,5 mg/l) αναφέρεται πως έχει θετικό αντίκτυπο στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου προσδίδοντας αρώματα "σάπιου μήλου", "ξηρού καρπού" ή "sherry" (Coetzee, 2014) και συμβάλλοντας στην πολυπλοκότητα του αρώματος.

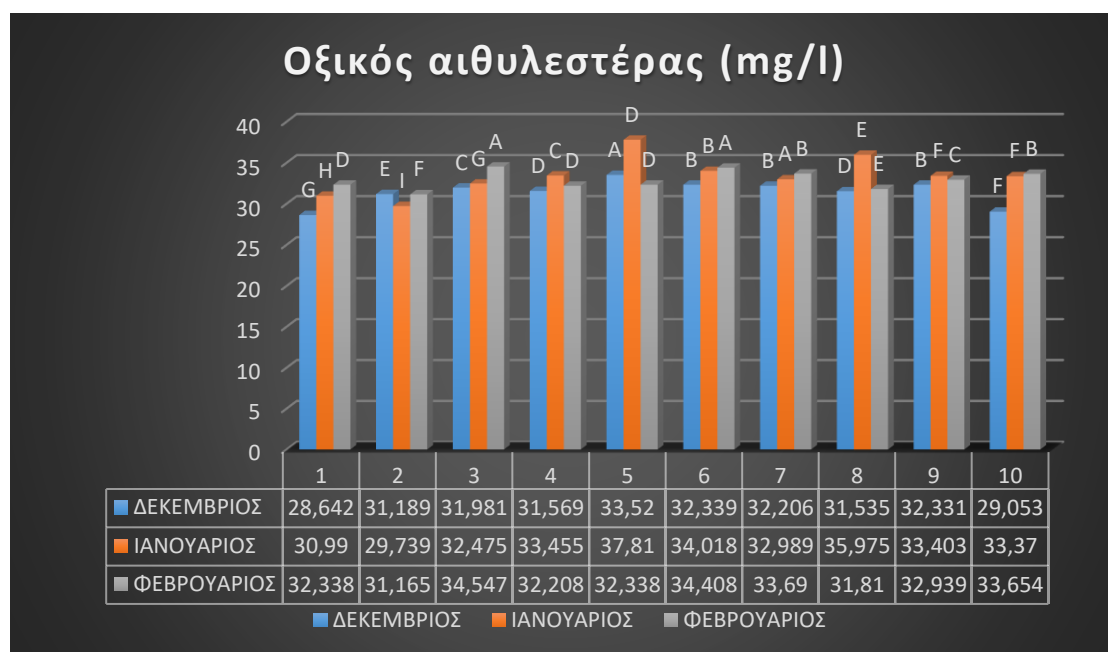


Γράφημα 28 Συγκέντρωση ακεταλδεΐδης στο τρίμηνο συντήρησης του οίνου



Η παρουσία του οξικού αιθυλεστέρα στους οίνους οφείλεται τόσο στην εστεροποίηση του οξικού οξέος και της αιθυλικής αλκοόλης, που πραγματοποιείται κατά τη διάρκεια της παλαίωσης αυτών δια της χημικής οδού, όσο και τη σύνθεση αυτού από τους μικροοργανισμούς κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης (Σουφλερός, 1997).

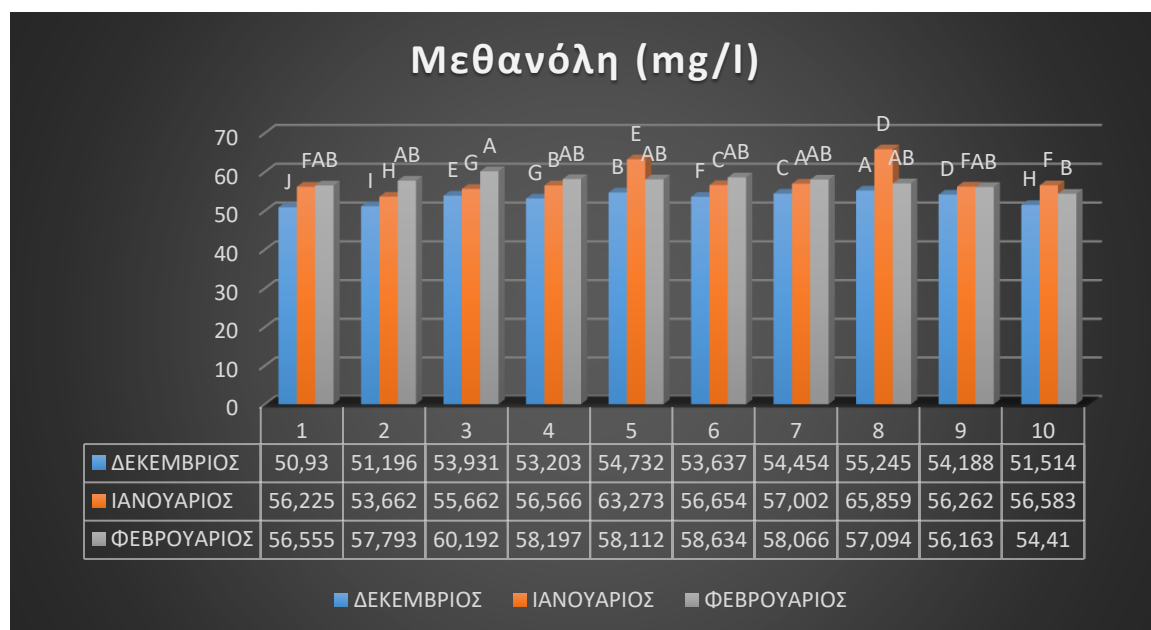
Στο γράφημα 28 φαίνεται η συγκέντρωση του εν λόγω εστέρα κατά τη διάρκεια τριών μηνών συντήρησης του οίνου. Με το πέρας του τριμήνου η συγκέντρωση του οξικού αιθυλεστέρα σταθεροποιείται περί τα 30 mg/l, συγκέντρωση η οποία δεν επηρεάζει δυσμενώς τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Ribéreau-Gayon et. al, 2006).



Γράφημα 29 Συγκέντρωση οξικού αιθυλεστέρα στο τρίμηνο συντήρησης του οίνου

Στο γράφημα 29 παρουσιάζεται η συγκέντρωση μεθανόλης στα δείγματα κατά τη διάρκεια συντήρησης αυτών. Η μεθυλική αλκοόλη περιέχεται σε όλους ανεξάρτητα τους οίνους σε ποσότητες που κυμαίνονται μεταξύ 30 – 35 mg/l προερχόμενη από την υδρόλυση των πηκτινών του σταφυλιού (Ribéreau-Gayon et. al, 2006).

Στο παρακάτω διάγραμμα, σύμφωνα με τη στατιστική ανάλυση ANOVA, φαίνεται πως με το πέρασμα των τριών μηνών συντήρησης η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε μεθανόλη σταθεροποιήθηκε στα 54 – 60 mg/l, χαμηλά δηλαδή επίπεδα σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Σουφλερός, 1997). Σε αυτό το εύρος φαίνονται να υπάρχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων που αντιπροσωπεύονται από διαφορετικό γράμμα. Λόγω όμως της μικρής απόκλισης μεταξύ τους δεν φαίνεται να υπάρχει επίδραση των αντιοξειδωτικών σε αυτές.



Γράφημα 30 Συγκέντρωση μεθανόλης στο τρίμηνο συντήρησης του οίνου

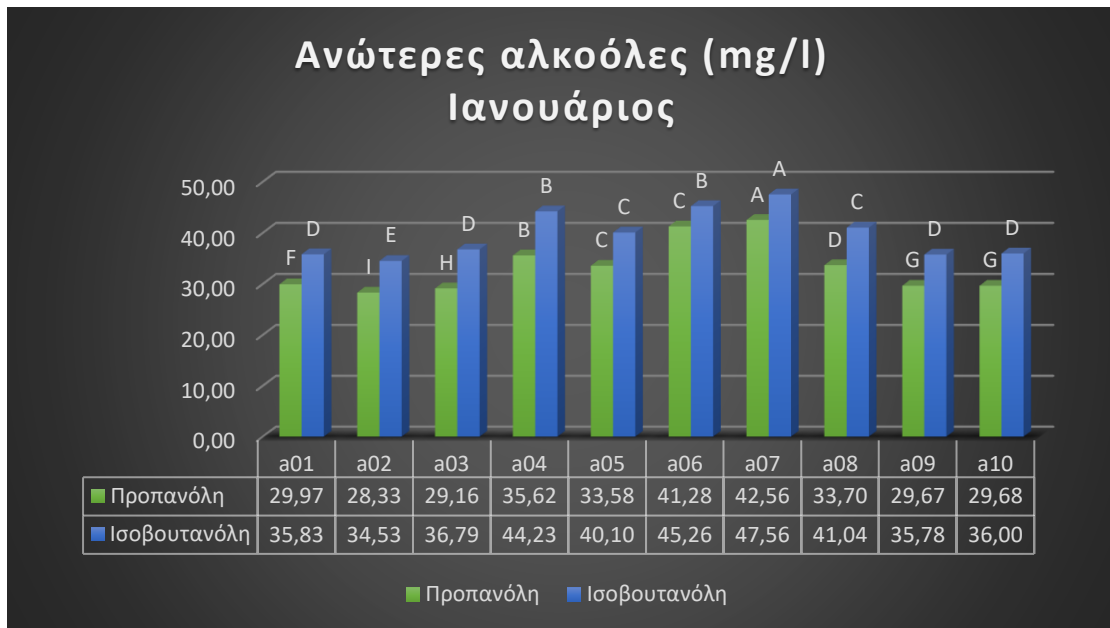
Στα γραφήματα 30 – 32 παρουσιάζονται οι ταυτοποιημένες ανώτερες αλκοόλες με τη δεύτερη μέθοδο αέριας χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα μελέτη. Στα γραφήματα (όπως και στα προηγούμενα αποτελέσματα) αναφέρονται οι συγκεντρώσεις των ουσιών σε πίνακα υπομνήματος, καθώς και οι τυχόν διαφοροποιήσεις που προέκυψαν από τη στατιστική ανάλυση ζευγών Tukey HSD  $p < 0,01$ .

Οι ανώτερες αλκοόλες που ταυτοποιήθηκαν είναι η προπανόλη και η ισοβουτανόλη. Ανήκουν στην κατηγορία των μονο-αλκοολών και είναι δευτερεύοντα προϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης. Παρά τη διαφοροποίηση των δειγμάτων όσον αφορά την αντιοξειδωτική τους προστασία τα ευρήματα της μεθόδου δεν υποδεικνύουν σημαντικές αποκλίσεις προς τη συγκέντρωση των ουσιών αυτών κατά το πρώτο μήνα συντήρησης παρότι παρουσιάζονται ως στατιστικώς σημαντικές. Το εύρος των συγκεντρώσεων χαρακτηρίζεται μικρό αφού δεν είναι ικανό να επηρεάσει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων.

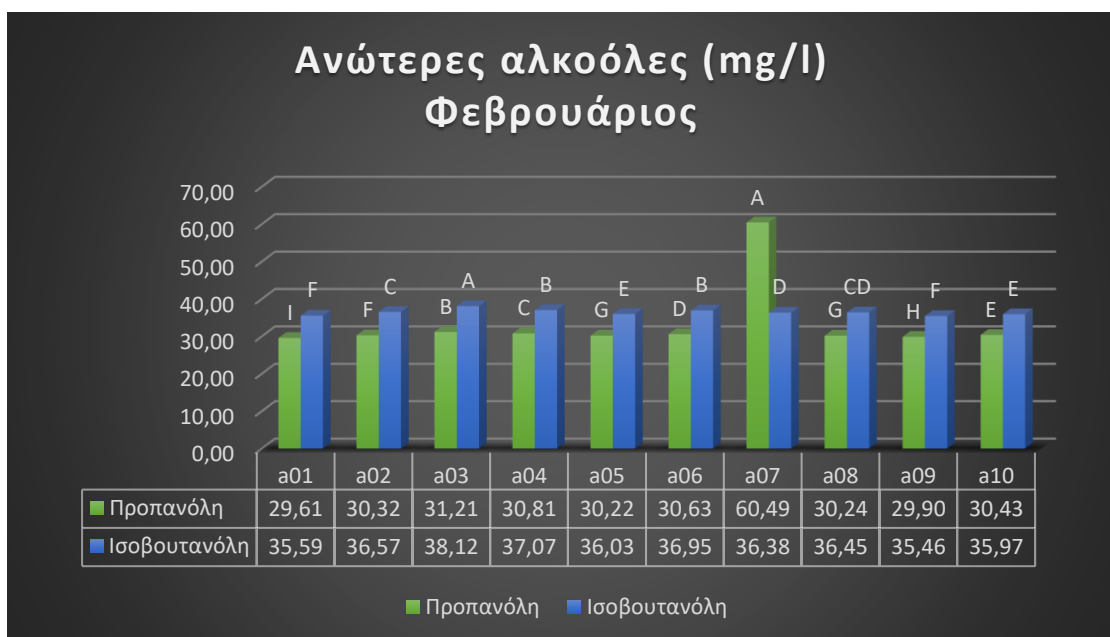
Ωστόσο, οι μετρήσεις των επόμενων μηνών παρουσιάζουν ενδιαφέρον. Το μήνα Ιανουάριο παρουσιάζεται πτώση της συγκέντρωσης των εν λόγω αλκοολών που μάλλον οφείλεται στην υδρόλυσή τους προς τους αντίστοιχους εστέρες ή την οξείδωσή τους προς τις αντίστοιχες αλδεΐδες. Στα δείγματα 4, 6, 7 αυτή η μετατροπή φαίνεται πως, έστω και σε μικρό βαθμό, εμποδίστηκε. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τη μη εύρεση υψηλότερων συγκεντρώσεων εστέρων κατά το μήνα Ιανουάριο σύμφωνα με τα αποτελέσματα της GC – FID όπως έχουν εκτεθεί σε προηγούμενη ενότητα, υποδεικνύουν την προστασία της οξείδωσης των εν λόγω αλκοολών. Το μήνα Φεβρουάριο η συγκέντρωση των ανώτερων αλκοολών αυξάνεται ελαφρώς εξαιτίας του οξειδοαναγωγικού δυναμικού του οίνου που διαμορφώνεται συνεχώς, με τα δείγματα 3, 4, 6, 7 τα οποία περιέχουν συγκεντρώσεις GSH (πίνακας 2) να διατηρούν, με στατιστικώς σημαντική διαφορά, τις υψηλότερες συγκεντρώσεις. Φαίνεται, πως η παρουσία της GSH συνέβαλε στη προστασία των αρωματικών αυτών ουσιών από τις οξειδώσεις όπως έχει αναφερθεί και σε άλλες μελέτες (Ferreira et al., 1997).



Γράφημα 31 Συγκέντρωση ανώτερων αλκοολών το μήνα Δεκέμβριο

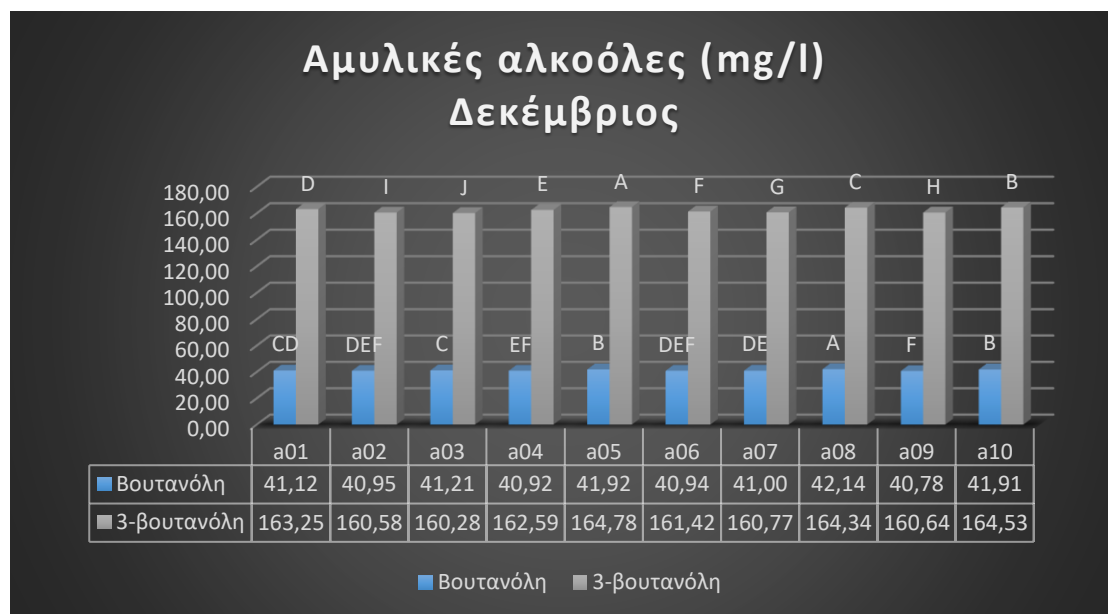


Γράφημα 32 Συγκέντρωση ανώτερων αλκοολών το μήνα Ιανουάριο

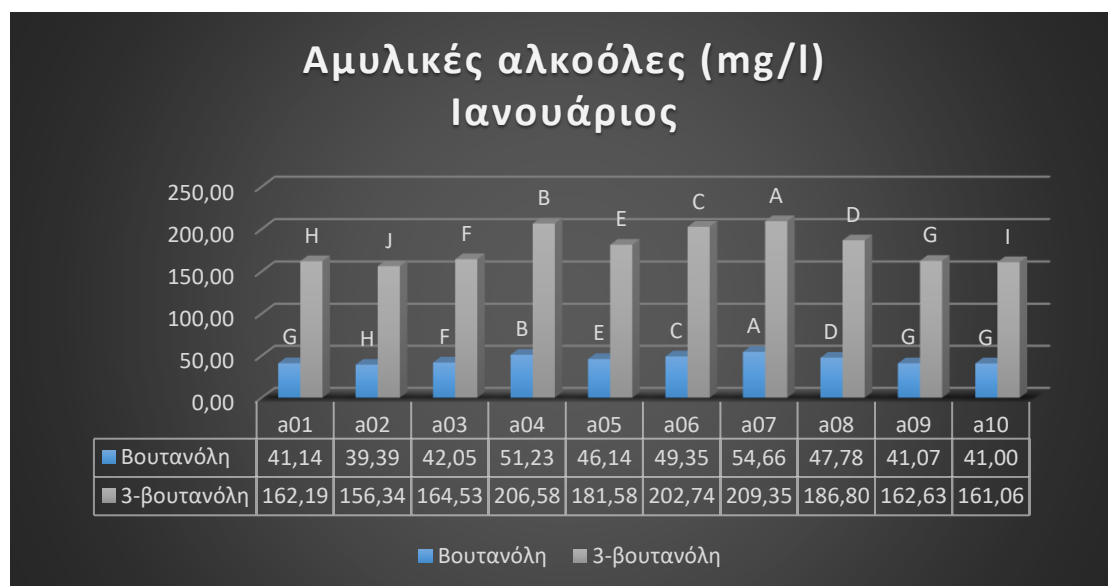


Γράφημα 33 Συγκέντρωση ανώτερων αλκοολών το μήνα Φεβρουάριο

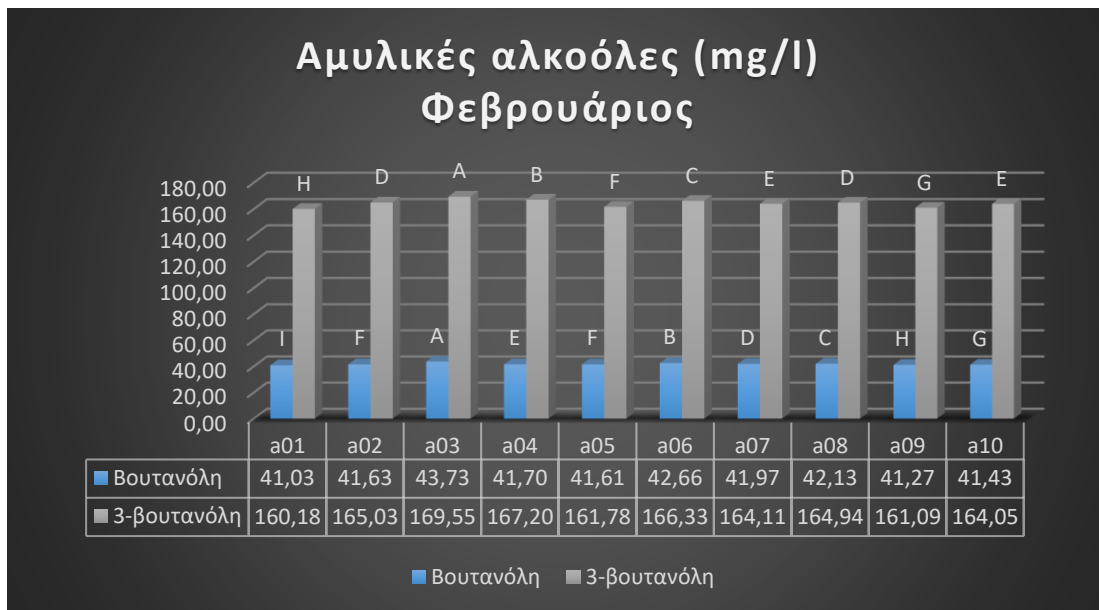
Στα διαγράμματα 33 – 35 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μεθόδου ως προς την εύρεση και ταυτοποίηση των αμυλικών αλκοολών. Ταυτοποιήθηκαν δύο αλκοολές αυτής της κατηγορίας, η βουτανόλη και η 3-βουτανόλη. Η τάση της συγκέντρωσης και στατιστικής διαφοροποίησης των εν λόγω ουσιών δεν παρέκκλινε από αυτή των ανώτερων αλκοολών που εκτέθηκε στην προηγούμενη ενότητα.



Γράφημα 34 Συγκέντρωση αμυλικών αλκοολών το μήνα Δεκέμβριο



Γράφημα 35 Συγκέντρωση αμυλικών αλκοολών το μήνα Ιανουάριο



Γράφημα 36 Συγκέντρωση αμυλικών αλκοολών το μήνα Φεβρουάριο

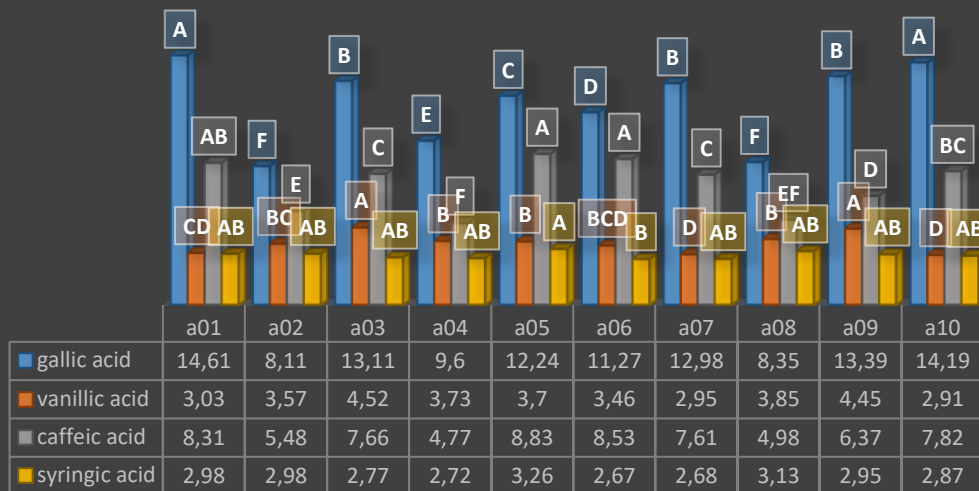
## ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΜΕ HPLC ΜΕΣΩ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΑΥΤΩΝ ΜΕ ΟΞΙΚΟ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑ

Στα ακόλουθα γραφήματα θα παρουσιαστούν τα αποτελέσματα της μεθόδου HPLC με εκχύλιση οξικού αιθυλεστέρα. Στόχος της μεθόδου ο προσδιορισμός των υφιστάμενων φαινολικών συστατικών στα δείγματα προς μελέτη και η αξιολόγηση της συγκέντρωσής τους με το πέρας τριών μηνών συντήρησης του οίνου. Προς διευκόλυνση της εξαγωγής συμπερασμάτων οι φαινολικές ουσίες χωρίστηκαν στις κύριες ομάδες και παρουσιάζονται αναλόγως. Η στατιστική ανάλυση ANOVA που ακολουθήθηκε ήταν και σε αυτή την ανάλυση η σύγκριση ζευγών Tukey HSD  $p < 0,01$ .

Από τα φαινολικά οξέα ταυτοποιήθηκαν 4 βενζοϊκά οξέα (γαλλικό, συριγκικό, βανιλικό και προκατεχικό) και 3 υδροξυκιναμωνικά (καφεϊκό, φερουλικό και π-κουμαρικό).

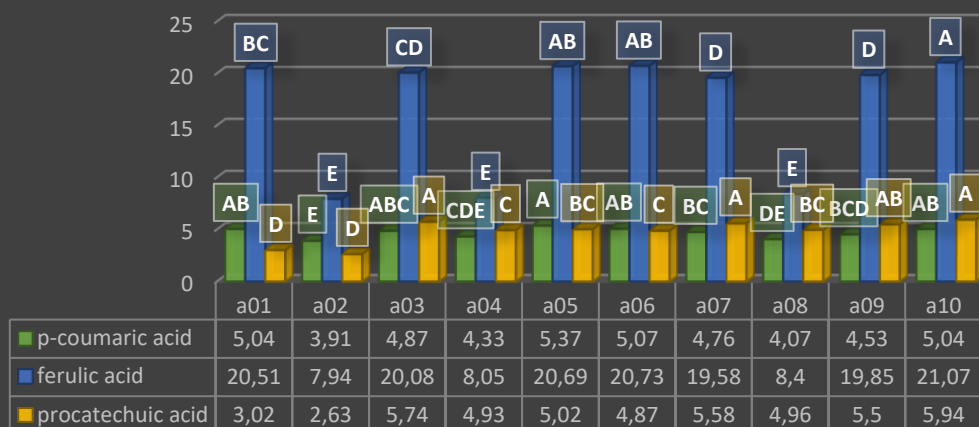
Μετά το πρώτο μήνα συντήρησης του οίνου και της προσθήκης GSH και SO<sub>2</sub> σε διάφορες συγκεντρώσεις (πίνακες 1, 2), τα δείγματα παρουσιάζουν μεν στατιστικά σημαντικές διαφορές, δεν φαίνεται όμως να υπάρχει κάποια συσχέτιση των διαφορών αυτών με τη συγκέντρωσή τους σε αντιοξειδωτικά.

## ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΟΞΕΑ 1 (MG/L) ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ



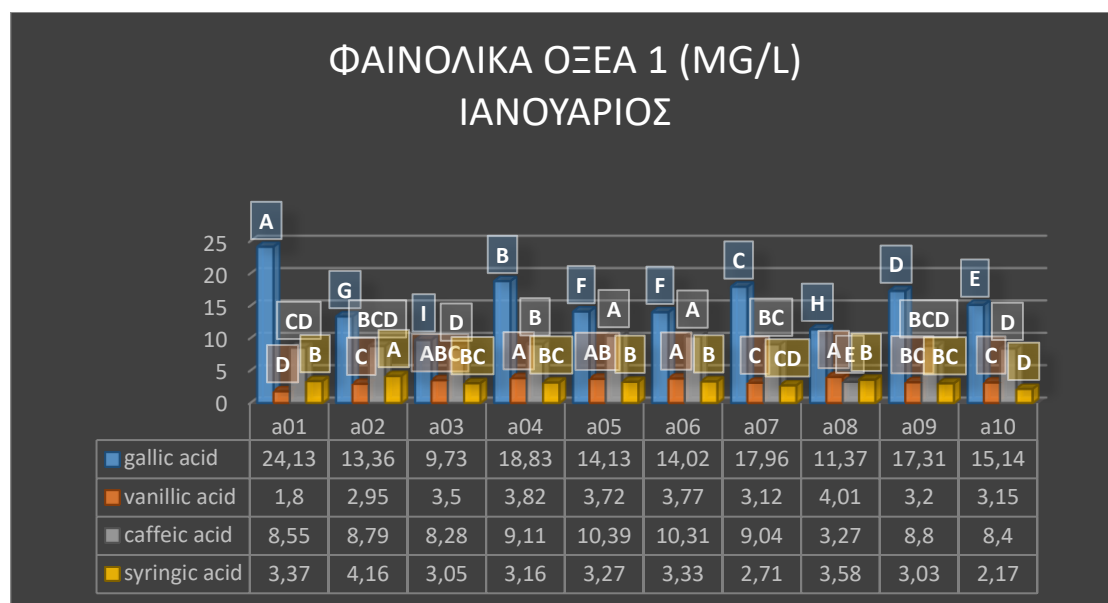
Γράφημα 37 Συγκέντρωση φαινολικών οξέων (1) κατά το μήνα Δεκέμβριο

## ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΟΞΕΑ 2 (MG/L) ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ

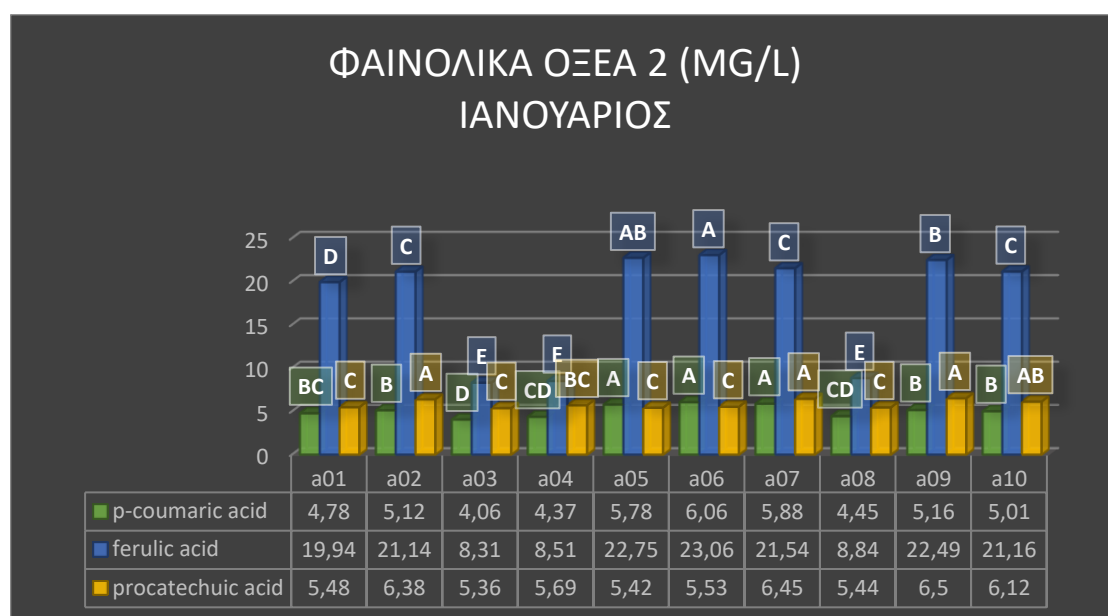


Γράφημα 38 Συγκέντρωση φαινολικών οξέων (2) κατά το μήνα Δεκέμβριο

Μετά το δεύτερο μήνα συντήρησης των δειγμάτων οι συγκεντρώσεις των φαινολικών οξέων δεν φαίνεται να αλλάζουν αισθητά. Το γαλλικό οξύ αναφέρεται πως παραμένει σχεδόν σταθερό κατά την παλαίωση των οίνων (Waterhouse, 2006) όπως παρατηρείται και στην παρούσα μελέτη (γράφημα 38). Αυτή η σταθερή αντίδραση των υδροξυκιναμικών κυρίως οξέων έχει αναφερθεί και σε προγενέστερες μελέτες (Herbst *et al.*, 2008, Hernanz *et al.*, 2009, Herbst-Johnstone *et al.*, 2011).



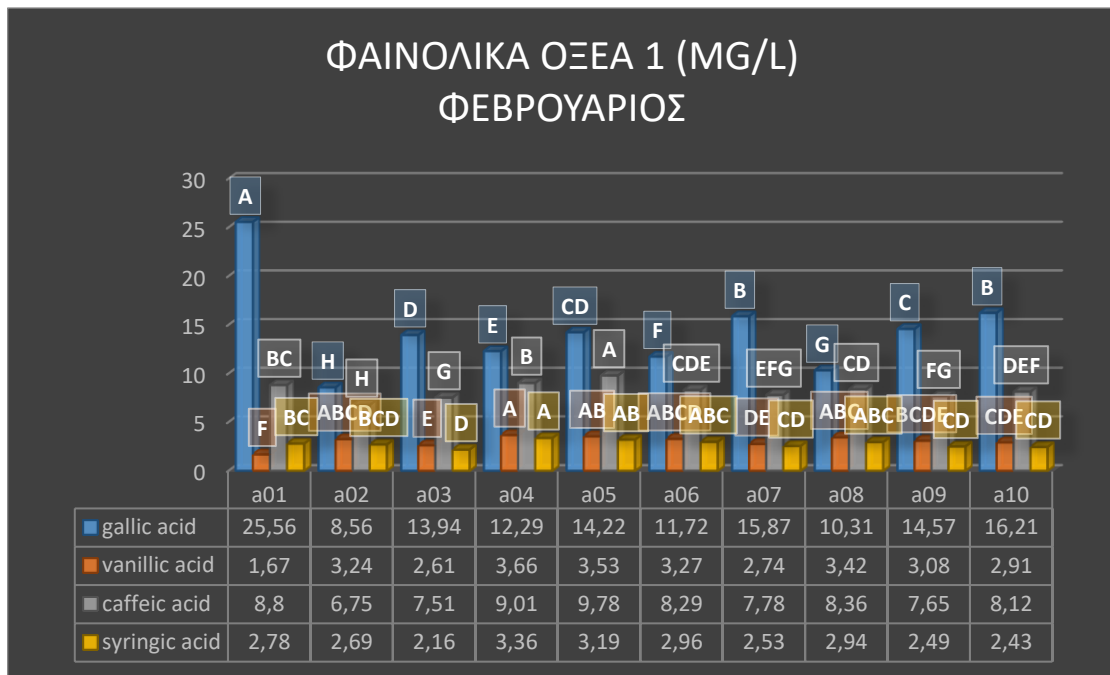
Γράφημα 39 Συγκέντρωση φαινολικών οξέων (1) το μήνα Ιανουάριο



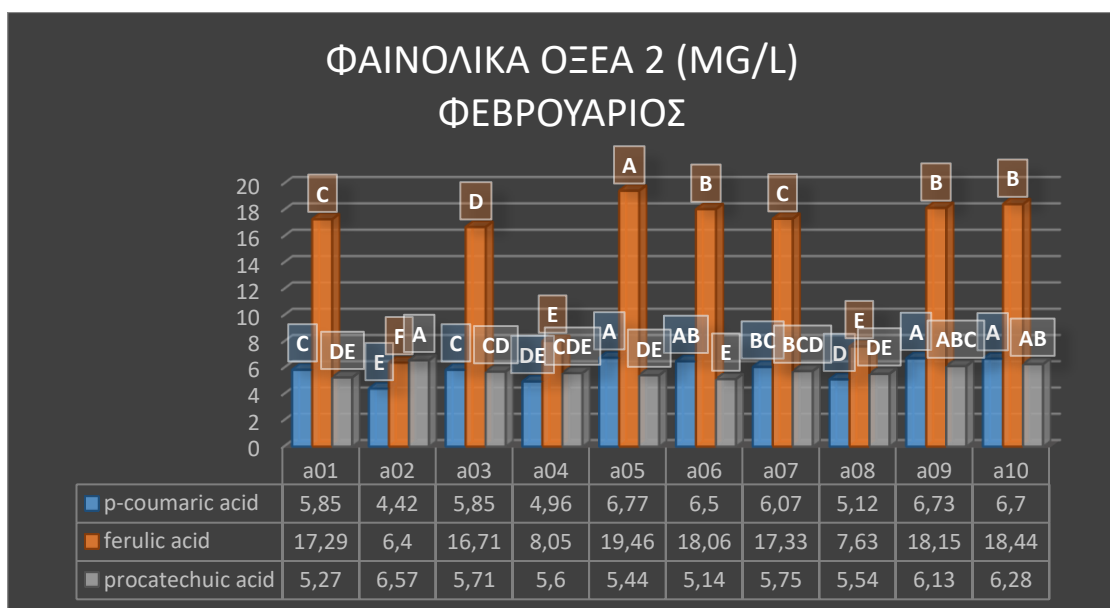
Γράφημα 40 Συγκέντρωση φαινολικών οξέων (2) το μήνα Ιανουάριο



Το μήνα Φεβρουάριο, τρίτο μήνα συντήρησης των δειγμάτων, οι συγκεντρώσεις των φαινολικών οξέων δεν φαίνεται να αλλάζουν σημαντικά (γραφήματα 40 – 41). Ωστόσο, έχει αναφερθεί (Herbst *et al.*, 2008) πως υπάρχει μία τάση ελαφράς αύξησης των συγκεντρώσεων του καφεϊκού οξέος και του π – κουμαρικού. Στη παρούσα μελέτη παρατηρείται μία ελαφρά αύξηση κυρίως του π – κουμαρικού με τη πάροδο του χρόνου. Το μήνα Φεβρουάριο παρατηρούνται οι υψηλότερες συγκεντρώσεις. Η τάση αυτή οφείλεται στην υδρόλυση των οξέων αυτών στους αντίστοιχους τρυγικούς εστέρες.

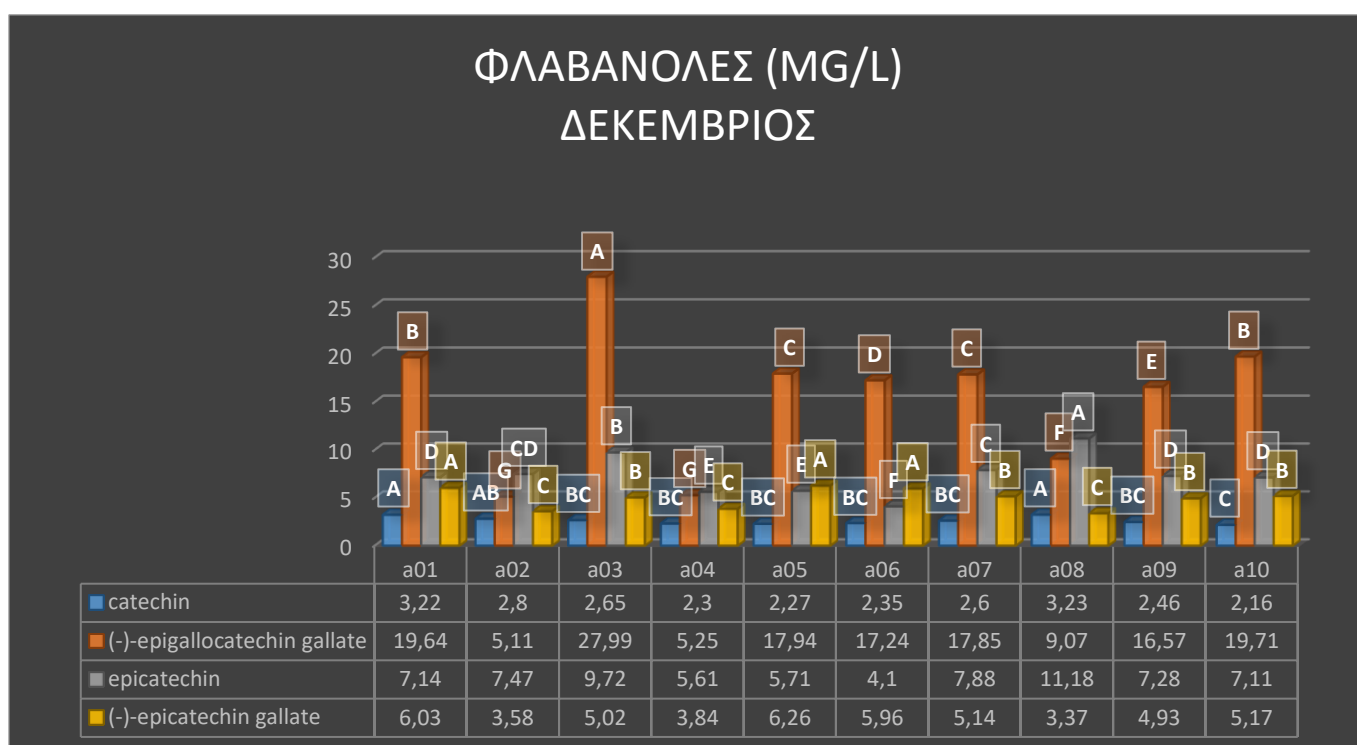


Γράφημα 41 Συγκέντρωση φαινολικών οξέων (1) το μήνα Φεβρουάριο



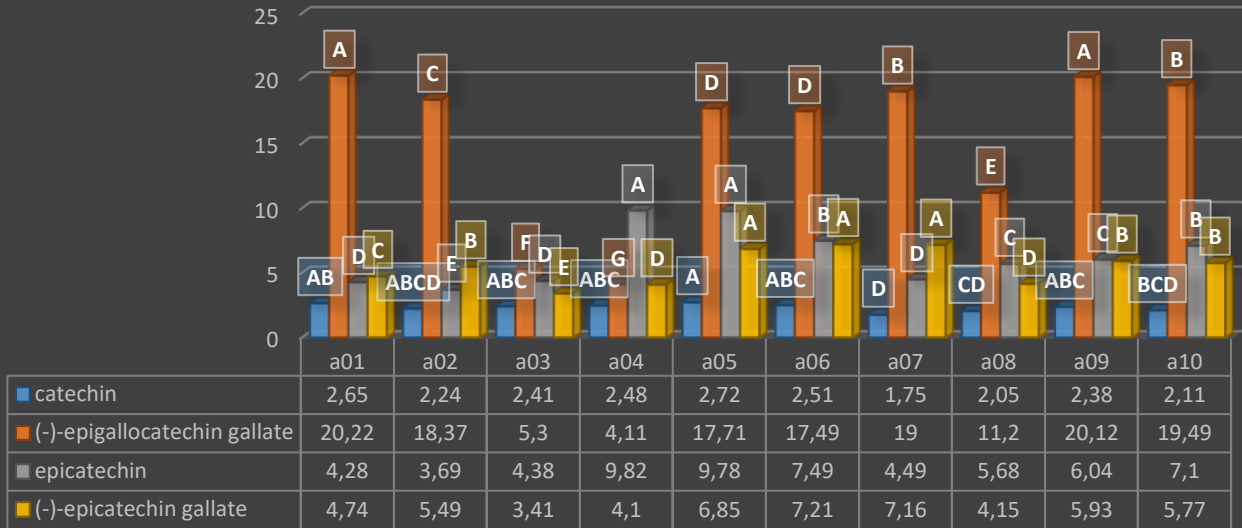
Γράφημα 42 Συγκέντρωση φαινολικών οξέων (2) το μήνα Φεβρουάριο

Στα γραφήματα 42 – 44 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων σε φλαβανόλες. Κατά τη σταδιακή παρατήρηση των συγκεντρώσεων ανά μήνα επέμβασης δεν παρατηρείται κάποια συγκεκριμένη τάση των δειγμάτων με GSH ώστε να διαφοροποιούνται από τα υπόλοιπα δείγματα. Παρομοίως, τα δείγματα με υψηλές σχετικά συγκεντρώσεις θειώδη ανυδρίτη δεν φαίνεται να διαφοροποιούνται αισθητά. Η συμπεριφορά των 3 – φλαβανολών κατά την παλαίωση περιγράφεται και από τους Herbst *et al.*, 2008, Hernanz *et al.*, 2009, Herbst-Johnstone *et al.*, 2011. Όπως αναφέρεται, οι 3 – φλαβανόλες μειώνουν τη συγκέντρωσή τους με το πέρασμα του χρόνου συμμετέχοντας σε αργές οξειδωτικές ή καταβολικές αντιδράσεις. Έτσι, είναι πολύ πιθανόν, στους τρεις πρώτους μήνες συντήρησης των δειγμάτων όποτε πραγματοποιήθηκαν και οι μετρήσεις της παρούσας μελέτης, αυτή η χημική ομάδα ουσιών να παρέμεινε σταθερή. Αυτό άλλωστε προκύπτει και από τα παρακάτω γραφήματα. Άλλες μελέτες επίσης παρουσιάζουν ελάχιστη διαφοροποίηση στο φαινολικό δυναμικό λευκών οίνων μετά από συντήρηση 60 ημερών (Fracassetti, D. et. al, 2010).



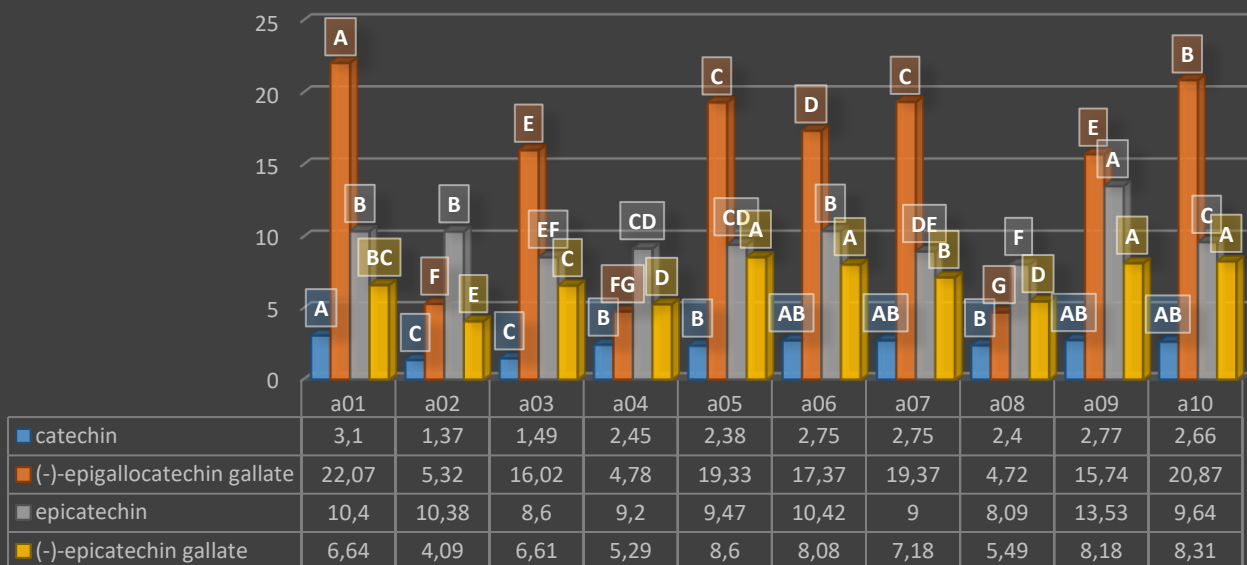
Γράφημα 43 Συγκέντρωση φλαβανολών το μήνα Δεκέμβριο

## ΦΛΑΒΑΝΟΛΕΣ (MG/L) ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ



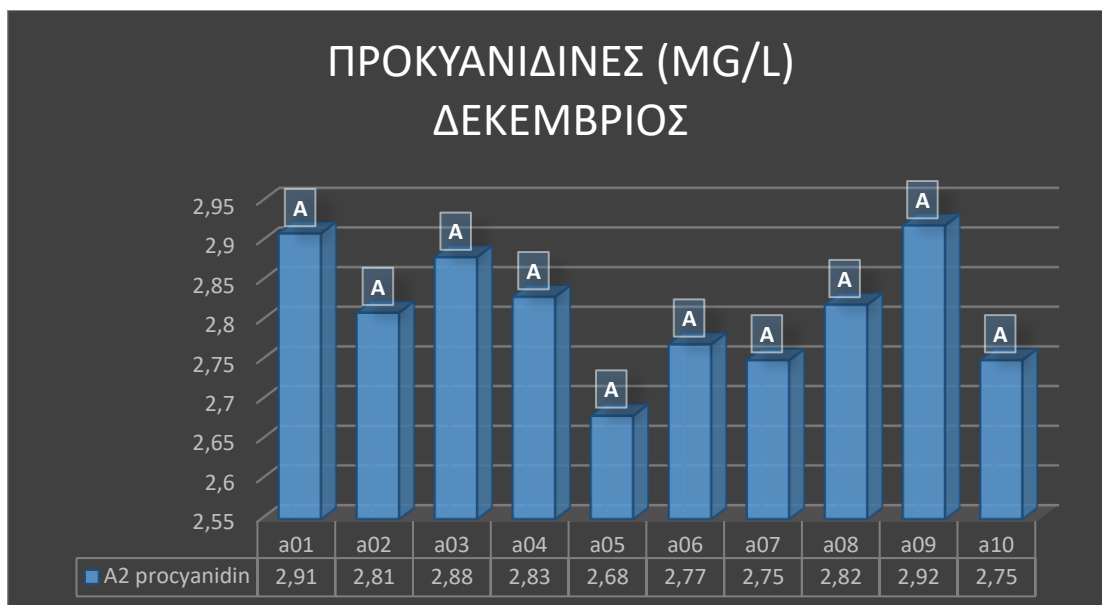
Γράφημα 44 Συγκέντρωση φλαβανολών το μήνα Ιανουάριο

## ΦΛΑΒΑΝΟΛΕΣ (MG/L) ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ

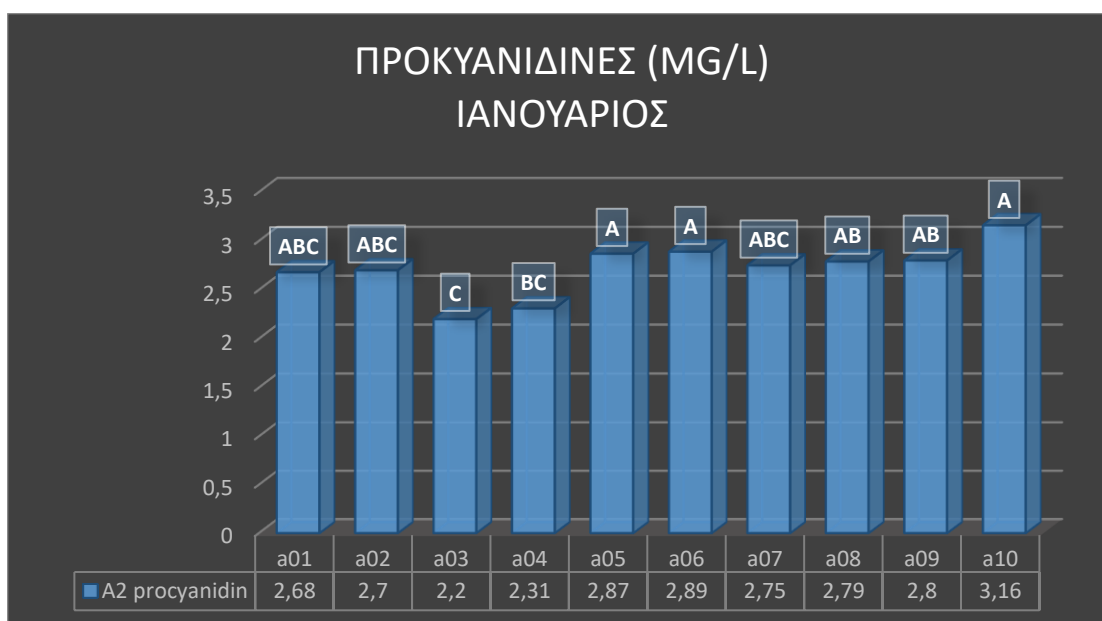


Γράφημα 45 Συγκέντρωση φλαβανολών το μήνα Φεβρουάριο

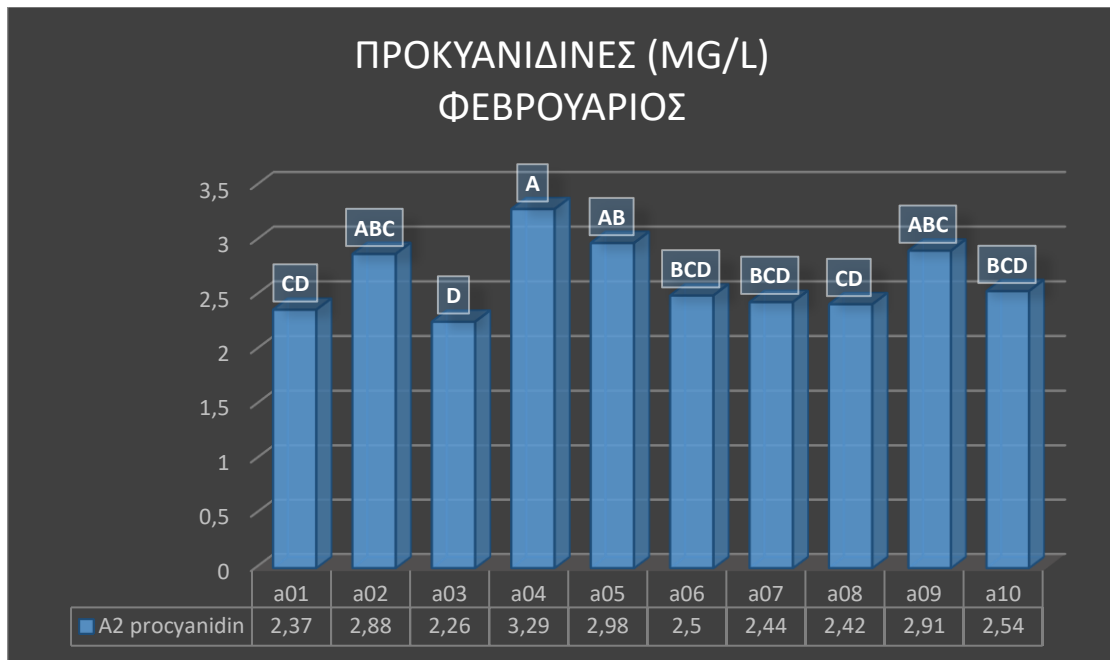
Από τις προκυανιδίνες, ποσοτικά αποτελέσματα σημειώθηκαν μόνο για την A2 προκυανιδίνη. Στα γραφήματα 45 – 47 παρουσιάζονται οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις και στατιστικές διαφοροποιήσεις στους τρεις μήνες συντήρησης των δειγμάτων.



Γράφημα 46 Συγκέντρωση A2 προκυανιδίνης το μήνα Δεκέμβριο



Γράφημα 47 Συγκέντρωση A2 προκυανιδίνης το μήνα Ιανουάριο



Γράφημα 48 Συγκέντρωση A2 προκυανιδίνης το μήνα Φεβρουάριο

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί η αντιοξειδωτική ικανότητα της γλουταθειόνης κατά τη συντήρηση λευκού οίνου και να συγκριθεί με την ικανότητα του θειώδη ανυδρίτη να προστατεύει τους οίνους από τα οξειδωτικά φαινόμενα που συμβαίνουν με το πέρασμα του χρόνου από το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης. Για το σκοπό αυτό, επιλέχθηκε η ελληνική ποικιλία Ροδίτης και όλες οι αναλύσεις που κρίθηκαν απαραίτητες για την εξαγωγή συμπερασμάτων, έλαβαν μέρος κατά το πρώτο τρίμηνο συντήρησης των δειγμάτων οίνου σε μηνιαία βάση.

Η οινοποίηση που πραγματοποιήθηκε ακολούθησε ένα κλασικό πρότυπο λευκής οινοποίησης, με στόχο την παραγωγή οίνου χωρίς οργανοληπτικά σφάλματα και με ένα οξειδοαναγωγικό δυναμικό που να επιτρέπει την παρατήρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων. Από τη στιγμή που η πτητική οξύτητα του παραχθέντος προϊόντος, το pH, η ογκομετρούμενη οξύτητα και ο αλκοολικός βαθμός κυμάνθηκαν σε φυσιολογικά και αναμενόμενα όρια για τη συγκεκριμένη ποικιλία η οινοποίηση κρίθηκε επιτυχής.

Οι μετρήσεις του θειώδους ανυδρίτη (ολικού και ελεύθερου) εντός του τριμήνου των μετρήσεων δεν παρουσίασαν κάποια απόκλιση από τα αναμενόμενα αποτελέσματα καθώς

οι προστιθέμενες συγκεντρώσεις ήταν υπολογισμένες ανά δείγμα (πίνακες 1, 2). Η πορεία της συγκέντρωσης του εν λόγω αντιοξειδωτικού κρίθηκε λογική εντός της τριμήνης διάρκειας του πειράματος. Αξίζει όμως να σημειωθεί, πως ο συνδυασμός 50 mg/l θειώδη και 20 mg/l γλουταθειόνης (δείγμα 6) φάνηκε να είναι ικανός ώστε το δείγμα να διατηρήσει σε υψηλότερα επίπεδα από τα υπόλοιπα δείγματα τη συγκέντρωση του ελεύθερου και «ενεργού» θειώδη ανυδρίτη.

Κατά τη μέτρηση του δείκτη φαινολικών ουσιών με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu παρατηρήθηκαν αξιοσημείωτες διαφοροποιήσεις μεταξύ των δειγμάτων περιέχοντα GSH και μη. Φάνηκε, πως τουλάχιστον στο διάστημα των τριών μηνών η GSH ήταν ικανή να διατηρήσει σε υψηλότερες συγκεντρώσεις το ολικό φαινολικό δυναμικό των δειγμάτων όπου χρησιμοποιήθηκε. Δυστυχώς, δεν φάνηκαν οι ίδιες έντονες διαφορές κατά τη μέτρηση των φαινολικών συστατικών των δειγμάτων μέσω HPLC. Βέβαια, στη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας ήταν δυνατό να ταυτοποιηθούν συγκεκριμένες ενώσεις βάση πρότυπων ουσιών. Η τάση των συγκεκριμένων ουσιών ήρθε σε συμφωνία με πρόσφατες μελέτες οι οποίες παρουσιάζουν ελάχιστη διαφοροποίηση στο φαινολικό δυναμικό λευκών οίνων μετά από συντήρηση 60 ημερών (Fracassetti, D. *et. al*, 2010). Τα αποτελέσματα όμως της μεθόδου Folin – Ciocalteu, υποδεικνύουν την ύπαρξη φαινολικών ενώσεων οι οποίες επηρεάζονται από την παρουσία της GSH. Στη προαναφερθείσα έρευνα παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του “καφετιάσματος” κατά τη διάρκεια συντήρησης του οίνου μετά από τρία χρόνια, αφού είχε προηγηθεί προσθήκη 20mg/L GSH κατά την εμφιάλωση. Έτσι, δημιουργήθηκε το ενδιαφέρον ως προς την εξερεύνηση της ικανότητας της γλουταθειόνης να προστατεύει το χρώμα λευκών οίνων κατά τη διάρκεια παλαίωσης σε φιάλη, όπου επικρατούν μη ενζυματικές οξειδωτικές αντιδράσεις. Αυτές οι αντιδράσεις εγείρονται από την οξείδωση των φαινολικών ουσιών και τον ακόλουθο πολυμερισμό των οξειδωμένων προϊόντων. Οι Sonpi *et. al.* (2011), κατέδειξαν πως η καθυστερημένη εμφάνιση του “καφετιάσματος” οφείλεται στην ικανότητα της γλουταθειόνης να σχηματίζει επιπρόσθετα προϊόντα με ανθρακικούς δεσμούς, όπως το γλυσοξυλικό οξύ. Μια πιο στοχευμένη στα φαινολικά συστατικά έρευνα, με μεγαλύτερο εύρος ποιοτικών αποτελεσμάτων, ίσως δώσει μία πιο καθαρή εικόνα όσον αφορά την αντίδραση μεγαλύτερου εύρους φαινολικών συστατικών στη δράση της γλουταθειόνης.

Οι μέθοδοι αέριας χρωματογραφίας που εφαρμόστηκαν στα δείγματα είχαν ως στόχο την ταυτοποίηση αρκετών αρωματικών ενώσεων και πτητικών προϊόντων ώστε να υπάρχει μεγάλο εύρος ουσιών προς παρατήρηση ως προς τις τυχόν αλλαγές στη συγκέντρωσή τους με το πέρασμα του χρόνου συντήρησης και πάντα σε συνάρτηση με τη συγκέντρωσή τους σε GSH και SO<sub>2</sub>.

Σε ουσίες όπως η ακεταλδεΐδη, η μεθανόλη και ορισμένες ανώτερες αλκοόλες παρατηρήθηκαν διαφοροποιήσεις. Στους αιθυλικούς εστέρες, που ταυτοποιήθηκαν τουλάχιστον, δεν παρατηρήθηκε κάποια διαφορά μεταξύ των δειγμάτων. Συμπερασματικά, η εξέλιξη των αρωματικών ουσιών έχριζε μεγαλύτερο διάστημα παρατήρησής τους αφού η μεταβολή του οξειδοαναγωγικού δυναμικού του οίνου εντός τριών μηνών δεν ήταν αρκετή ώστε να σημειωθούν αξίες αναφοράς αλλαγές μεταξύ των δειγμάτων. Αυτή η άποψη ενισχύεται και από πρόσφατες μελέτες με το ίδιο αντικείμενο έρευνας (Janes, L., Lisjak, K. & Vanzo, A., 2010, Papadopoulou, D. & Roussis, I. G., 2008) στις οποίες παρατηρήθηκαν διαφοροποιήσεις σε μεγαλύτερο βάθος χρόνου. Βέβαια, ο ακριβής χρόνος παρατήρησης των δειγμάτων προς εξαγωγή βásiμων συμπερασμάτων δεν μπορεί να υπολογισθεί εκ των προτέρων, αφού η ίδια η φύση του οίνου κατά τη συντήρηση δεν παρέχει κάποια νόρμα. Η

αναπόφευκτη μείωση των πτητικών ουσιών μπορεί να αποδοθεί εκτός των αντιδράσεων άμεσης οξειδωσής τους και σε άλλες χημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα. Η συγκέντρωση των εστέρων στον οίνο, για παράδειγμα, μπορεί να διαφοροποιηθεί εξαιτίας αντιδράσεων εστεροποίησης ή υδρόλυσης που είναι πιθανόν να συμβούν. Επίσης, οι περισσότερες τερπενικές αλκοόλες αντικαθίστανται από τερπενικά οξείδια, ενώ η λιναλόλη μπορεί να μετατραπεί σε α-τερπινεόλη, η οποία έχει πολύ μεγαλύτερο κατώφλι αντίληψης. Ο προστατευτικός ρόλος της γλουταθειόνης σε μερικούς εστέρες καθώς και στις τερπενικές ενώσεις, αποδίδεται στην ελεύθερη σουλφιδρυλική ομάδα της (SH), η οποία της αποδίδει μοναδικές αντιοξειδωτικές και νουκλεοφιλικές ιδιότητες, όπως έχει ήδη εκτεθεί. Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός μέσω του οποίου προστατεύει τις παραπάνω ενώσεις, χρίζει περαιτέρω έρευνας.

Στα αποτελέσματα που εκτέθηκαν, καθώς και στην εκτίμησή τους πρέπει να συνυπολογιστούν αρκετοί παράγοντες. Καταρχάς σημαντικό ρόλο παίζει η παρουσία της γλουταθειόνης στα σταφύλια πριν από την οποιαδήποτε προσθήκη. Αυτό οφείλεται στη τάση συσσώρευσης GSH κατά την ωρίμανση μέχρι τα 16 Brix. Ύστερα η συγκέντρωση σταθεροποιείται και πάνω από το 90% βρίσκεται υπό την ανηγμένη μορφή της γλουταθειόνης (Suklje *et al.*, 2013). Η μειωμένη οξειδωτική κατάσταση του χυμού καθώς και η πίεση των σταφυλιών μειώνουν αυτή τη συγκέντρωση ανάλογα (Coetzee *et al.*, 2014). Η οξείδωση του οίνου και η συντήρησή του μειώνουν τη συγκέντρωση της GSH στη συνέχεια (Ugliano *et al.*, 2013), όπως άλλωστε συνέβη και στη παρούσα έρευνα. Επίσης, σύμφωνα με αντίστοιχες μελέτες η χρήση συγκεκριμένων στελεχών ζυμομυκήτων καθώς και τα επίπεδα αφομοιώσιμου αζώτου στο γλεύκος παίζουν ιδιαίτερο ρόλο στην αύξηση ή μείωση της συγκέντρωσης της γλουταθειόνης (Kritzinger *et al.*, 2013).

Η γλουταθειόνη είναι η κύρια θειική ένωση των ζυμών, αλλά μόλις προσφάτως άρχισε η μελέτη του μεταβολισμού της και των λειτουργιών της στους μικροοργανισμούς. Υπάρχουν ήδη, ισχυρές ενδείξεις για τη διαφορετική κατά περίπτωση αντίδραση της γλουταθειόνης σε διάφορες συνθήκες δημιουργούμενες από τις βιομηχανικές ζύμες. Ωστόσο, συνεκτιμώντας και τα ήδη υπάρχοντα δεδομένα, πρέπει ακόμα να απαντηθούν αρκετά ερωτήματα που αφορούν το συγκεκριμένο τριπεπτιδίο θειόλης, όπως για παράδειγμα η ακριβής ενζυμολογία του και η κινητική του ενδοκυτταρικά, οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στη μετατόπιση της GSH σε διαφορετικά τμήματα του κυττάρου καθώς και πως μεταφέρεται από κύτταρο σε κύτταρο. Γενικά, μία καλύτερη κατανόηση των ζυμών με GSH φαίνεται να είναι επιτακτική για την μικροβιολογία και τη τεχνολογία τροφίμων. Σκοπός τη παρούσας μεταπτυχιακής έρευνας είναι να υπάρξει μέσω αυτής το ερέθισμα προς περαιτέρω έρευνα για ένα πολλά υποσχόμενο αντιοξειδωτικό στη παρασκευή και συντήρηση των λευκών οίνων.

Είναι ξεκάθαρο πλέον ξεκάθαρο στον οινολογικό κόσμο, πως η GSH μπορεί να παίζει σπουδαίο ρόλο στην ποιότητα και συντηρησιμότητα των οίνων, ιδίως των λευκών. Όπως όμως, έχει ήδη αναφερθεί στη παρούσα μελέτη, παραμένουν πάρα πολλές άγνωστες μεταβλητές που καθορίζουν το ρόλο της γλουταθειόνης στα σταφύλια και τον οίνο. Έτσι, είναι επιτακτική η περαιτέρω έρευνα με πιο στοχευμένες αναλυτικές μεθόδους ώστε να καθορισθεί με μεγαλύτερη ακρίβεια ο ρόλος της στη χημική και οργανοληπτική σύνθεση των σταφυλιών και του οίνου.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adams, D. O. & Liyanage, C., 1993. Glutathione increases in grape berries at the onset of ripening. *Am. J. Enol. Vitic.* 44, 333-338
- Anderson, M. E., 1998. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chemico-Biological Interactions* 112, 1-14)
- Arrehnius, S.P., McCloskey, L.P. & Sylvan, M., 1996. Chemical markers for aroma of *Vitis vinifera* var. Chardonnay regional wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 44, 1085-1090.
- Bailly Beatrice, 1990. Essai d'hydroxygenation des mouts sur cepages locaux en Alsace
- Blanchard, L., Darriet, P. & Dubourdieu, D., 2004. Reactivity of 3-mercaptophexanol in red wine: impact of oxygen, phenolic fractions, and sulfur dioxide. *Am. J. Enol. Vitic.* 55, 115–120
- Bradshaw, M.P., Scollary, G.R. & Prenzler, P.D., 2004. Examination of the sulfur dioxide-ascorbic acid anti-oxidant system in a model white wine matrix. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 84, 318-324
- Brajkovich, M., Tibbits, N., Peron, G., Lund, C. M., Dykes, S. I., Kilmartin, P. A., et al. (2005). Effect of screwcap and cork closures on SO<sub>2</sub> levels and aromas in Sauvignon blanc wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(26), 10006–10011
- Carmel-Harel O. & Storz G., 2000. Roles of the glutathione- and thioredoxin-dependent reduction systems in the *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* responses to oxidative stress. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 439–461
- Castellari, M., Simonato, B., Torielli, G.B., Spinelli, P. & Ferrarini, R., 2004. Effects of different enological treatments on dissolved oxygen in wines. *Ital. J. Food Sci.* 16, 387-396
- Cheynier, V., Souquet, J. M. & Moutounet, M., 1989. Glutathione content and glutathione to hydroxycinnamic acid ratio in *Vitis vinifera* grapes and musts. *Am. J. Enol. Vitic.* 40, 320-324
- Cheynier, V. F., Trousdale, E. K., Singleton, V. L., Salgues, M. J., & Wylde, R., 1986. Characterization of 2-Sglutathioylcaftaric acid and its hydrolysis in relation to grape wines. *J. Agric. Food Chem.* 34, 217-221
- Choné, X., Lavigne-Cruège, V., Tominaga, T., Van Leeuwen, C., Castagnede, C., Saucier, C. & Dubourdieu, D., 2006. Effect of vine nitrogen status on grape aromatic potential: Flavor precursors (S-cysteine conjugates), glutathione and phenolic content in *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc grape juice. *J. Int. Sci. Vigne Vin* 40, 1-6
- Chrisholm, M.G., Guiher, L.A. & Zaczekiewicz, S.M., 1995. Aroma characteristics of aged Vidal blanc wine. *American Journal of Enology and Viticulture.* 46, 56-62
- Cilliers, J.J.L. & Singleton, V.L., 1989. Nonenzymatic autooxidative phenolic browning reactions in a caffeic acid model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 37, 890-896
- Clark, A.C., Pedretti, F., Prenzler, P.D. & Scollary, G.R., 2008. Impact of ascorbic acid on the oxidative colouration and associated reactions of a model wine solution containing (+)-catechin, caffeic acid and iron. *Australian Journal of Grape and Wine Research.* 14, 238-249



- Coetzee, C. 2011. Oxygen and sulphur dioxide additions to Sauvignon blanc: effect on must and wine composition. MScAgric thesis, Stellenbosch University, Private Bax X1, 7602 Matieland, South Africa
- Coetzee, Carien. Oxidation treatments affecting Sauvignon blanc wine sensory and chemical composition 2014
- Danilewicz, J. C., Seccombe, J. T., & Whelan, J. (2008). Mechanism of interaction of polyphenols, oxygen, and sulfur dioxide in model wine and wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 59, 128–136
- Danilewicz, J.C., 2003. Review of reaction mechanisms of oxygen and proposed intermediate reduction products in wine: central role of iron and copper. *American Journal of Enology and Viticulture*. 54, 73-85
- Du Toit, W. J., Lisjak, K., Stander, M. & Prevo, D., 2007. Using LC-MSMS to assess glutathione levels in South African white grape juices and wines made with different levels of oxygen. *J. Agric. Food Chem.* 55, 2765-2769
- Dubourdieu, D. & Lavigne, V., 2004. The role of glutathione on the aromatic evolution of dry white wine. *Vinidea.net* 2, 1–9
- Dubernet, M., & Ribereau-Gayon, P., 1973. Presence et signification dans les moutes et les vins de la tyrosine du raisin. *Connaissance Vigne Vin* 7, 283–302
- Escudero, A., Asencio, E., Cacho, J. & Ferreira, V., 2002. Sensory and chemical changes of young white wines stored under oxygen. An assessment of the role played by aldehydes and some other important odorants. *Food Chemistry*. 77, 325-331
- Etievant, P. X., 1991. Wine. In: *Volatile Compounds in Foods and Beverages*. Ed. Maarse, H. Marcel Dekker, New York
- Ferreira, V., Escudero, A., Fernandez, P.E. & Cacho, J., 1997. Changes in the profile of volatile compounds in wines stored under oxygen and their relationship with the browning process
- Fracassetti, D., 2010. Investigation on cysteinyl thiol compounds from yeast affecting wine properties. PhD (Food Science) dissertation, Technology and Biotechnology, University of Milan, Italy
- Fracassetti, D. et. al, 2010. Quantification of glutathione, catechin and caffeic acid in grape juice and wine by a novel ultra-performance liquid chromatography method
- Garcia-Viguera, C.; Bridle, P. Analysis of non-coloured phenolic compounds in red wines. A compound of high-performance liquid chromatography and capillary zone electrophoresis. *Food Chem.* 1995, 54, 349-352
- Halliday, J. & Johnson, H., 1992. *The art and science of wine*. Mitchell Beazley, London
- Herbst-Johnstone, M., Nicolau, L. & Kilmartin, P.A., 2011. Stability of varietal thiols in commercial Sauvignon blanc wines. *American Journal of Enology and Viticulture*. 62, 495-502.
- Herbst, M., Kilmartin, P.A. & Nicolau, L., 2008. Aroma stability in Sauvignon blanc wines. *The Australian and New Zealand Grapegrower and Winemaker*. 6, 66-72.

- Hernanz, D., Gallo, V., Recamales, Á.F., Meléndez-Martínez, M.L., González-Miret, M.L. & Heredia, F.J., 2009. Effect of storage on the phenolic content, volatile composition and colour of white wines from the varieties Zalema and Colombard. *Food Chemistry*. 113, 530-537
- Jackson, S. R., 1994. *Wine Science. Principles and Applications*. 2nd ed. San Diego: Academic Press
- Janes, L., Lisjak, K. & Vanzo, A., 2010. Determination of glutathione content in grape juice and wine by highperformance liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal. Chim. Acta* 674, 239-242
- Kielhöfer, E. & Würdig, G., 1958. Die bindung des sauerstoffs durch schweflige säure und ascorbinsäure. *Weinberg und Keller*. 5, 644-656
- Kobayashi, H., Takase, H., Kaneko, K., Tanzawa, F., Takata, R., Suzuki, S., 2010. Analysis of S-3-(hexan-1-ol)- glutathione and S-3-(hexan-1-ol)-L-cysteine in *Vitis vinifera* L. cv. Koshu for aromatic wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 61, 176–185
- Lacroux, F., Tregoat, O., Van Leeuwen, C., Pons, A., Tominaga, T., Lavigne-Cruege, V. & Dubourdieu, D., 2008. Effect of foliar nitrogen and sulphur application on aromatic expression of *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc. *J. Int. Sci. Vigne Vin* 42, 125-132
- Lavigne, V., Pons, A. & Dubourdieu, D., 2007. Assay of glutathione in must and wines using capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection - Changes in concentration in dry white wines during alcoholic fermentation and aging. *J. Chromatogr. A* 1139, 130-135
- Leustek, T., Martin, M., Bick, J. & Davies, J., 2000. Pathways and regulation of sulfur metabolism revealed through molecular and genetic studies. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51, 141-165
- Li, H., Guo, A. & Wang, H., 2008. Mechanisms of oxidative browning of wine. *Food Chem.* 108, 1-13
- Li, Y., Wei, G. & Chen, J., 2004. Glutathione: a review on biotechnological production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66, 233–242
- Makhotkina, O. & Kilmartin, P.A., 2009. Uncovering the influence of antioxidants on polyphenol oxidation in wines using an electrochemical method: Cyclic voltammetry. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 633, 165-174
- Noble, A.C., Arnold, R.A., Buechsenstein, J., Leach, E.J., Schmidt, J.O. & Stern, P.M., 1987. Modification of a standardized system of wine aroma terminology. *American Journal of Enology and Viticulture*. 38, 143-146
- Oliveira, C. M., Ferreira, A. C. S., De Freitas, V. & Silva, A. M. S., 2011. Oxidation mechanisms occurring in wines. *Food Res. Int.* 44, 1115-1126
- Papadopoulou, D. & Roussis, I. G., 2001. Inhibition of the decline of linalool and  $\alpha$ -terpineol in muscat wines by glutathione and N-acetyl-cysteine. *Int. J. Food Sci.* 13, 413-419.
- Papadopoulou, D. & Roussis, I. G., 2008. Inhibition of the decrease of volatile esters and terpenes during storage of a white wine and a model wine medium by glutathione and N-acetyl-cysteine. *Int. J. Food Sci. Technol.* 43, 1053-1057

- Park, S. K. , Boulton, R. B. & Noble, A. C., 2000b. Automated HPLC analysis of glutathione and thiol-containing compounds in grape juice and wine using pre-column derivatization with fluorescence detection. *Food Chem.* 68, 475-480
- Park, S. K., Boulton, R. B. & Noble, A. C., 2000a. Formation of hydrogen sulfide and glutathione during fermentation of white grape musts. *Am. J. Enol. Vitic.* 51, 91-97
- Patel, P., Herbst-Johnstone, M., Lee, S. A., Gardner, R.C., Weaver, R., Nicolau, L. & Kilmartin, P. A., 2010. Influence of juice pressing conditions on polyphenols, antioxidants and varietal aroma of Sauvignon blanc microferments. *J. Agric. Food Chem.* 58, 7280-7288
- Peng, Z., Duncan, B., Pocock, K.F. & Sefton, M.A., 1998. The effect of ascorbic acid on oxidative browning of white wines and model wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research.* 4, 127-35
- Penninckx, M. J., 2000. A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stresses. *Enz. Microbial Techn.*, 26, 737–742
- Ramey, D. D. & Ough, C. S., 1980. Volatile ester hydrolysis or formation during storage of model solutions and wines. *J. Agric. Food. Chem.* 28, 928-34
- Rauhut, D., 2009. Usage and formation of sulphur compounds. In: König, H., Uden, G. A. and Fröhlich, J. (eds). *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, Germany
- Renouil, Y., 1988. *Dictionnaire du vin*. Tours: Sésame
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A. & Dubourdieu, D., 2006. *Handbook of enology: The chemistry of wine stabilization and treatments*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A. & Dubourdieu, D., 2006. In: *Handbook of Enology, Volume 2*. Ed. Ribéreau-Gayon, P., Wiley, Chichester, England
- Roland, A., Schneider, R., Guernevé, C. L., Razungles, A. & Cavelier, F., 2010a. Identification and quantification by LC-MS/MS of a new precursor of 3-mercaptohexan-1-ol (3MH) using stable isotope dilution assay: Elements for understanding the 3MH production in wine. *Food Chem.* 121, 847–855
- Roussis, I. G., Lambropoulos, I. & Tzimas P., 2007. Protection of volatiles in a wine with low sulfur dioxide by caffeic acid or glutathione. *Am. J. Enol. Vitic.* 58, 274-278
- Roussis, I. G., Papadopoulou, D. & Sakarellos-Daitsiotis, M., 2009. Protective effect of thiols on wine aroma volatiles. *Open Food Sci. J.* 3, 98-102
- Silva Ferreira, A.C., Guedes de Pinho, P., Rodrigues, P. & Hogg, T., 2002b. Kinetics of oxidative degradation of white wines and how they are affected by selected technological parameters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 50, 5919-5924
- Singleton, V.L., 1987. Oxygen with phenols and related reactions in must, wines and model systems: Observations and practical implications. *Am. J. Enol. Vitic.* 38, 69-77
- Singleton, V.L., Salgues, J., Zaya J. & Trousdale, E., 1985. Caftaric acid disappearance and conversion to products of enzymatic oxidation in grape must and wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 36, 50-56

- Singleton, V.L., Trousdale, E. & Zaya, J., 1979. Oxidation of wines I. Young white wines periodically exposed to air. *American Journal of Enology and Viticulture*. 30, 49-54
- Sonni F., Clark, A. C., Prenzler, P. D., Riponi, C. & Scollary, G. R., 2011a. Antioxidant action of glutathione and the ascorbic acid/glutathione pair in a model white wine. *J. Agric. Food Chem.* 59, 3940-3949
- Soufleros Euaggelos, ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ Τόμος 1 – 2 , 1997
- Stavroula Kourakou – Dragona, 1998, Θέματα Οινολογίας
- Suklje, K., Basa Cesnik, H., Janes, L., Kmecl, V., Vanzo, A., Deloire, A.J., Sivilotti, P. & Lisjak, K., 2012. The effect of leaf area to yield ratio on secondary metabolites in grapes and wines of *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*
- Tirelli, A., Fracassetti, D., & De Noni, I., 2010. Determination of reduced cysteine in oenological cell wall fractions of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Agric. Food Chem.* 58, 4565–4570
- Tominaga, T., Furrer, A., Henry, R. & Dubourdieu, D., 1998a. Identification of new volatile thiols in the aroma of *Vitis vinifera* L. var. Sauvignon blanc wines. *Flavour Fragr. J.* 13, 159-162
- Toukis, G., 1974. Chemistry of wine stabilization. A review. *In Chemistry of winemaking*. Webb, A.D. (ed.), pp. 116-133. *Advan. Chem. American Society, Washington*
- Ugliano, M., Kwiatkowski, M. J., Vidal, S., Capone, D., Siebert, T., Dieval, J. B., Aagaard, O. & Waters, E. J., 2011. Evolution of 3-mercatohexanol, hydrogen sulfide, and methyl mercaptan during bottle storage of Sauvignon blanc wines. Effect of glutathione, copper, oxygen exposure, and closure-derived oxygen. *J. Agric. Food Chem.* 59, 2564–2572
- Waterhouse, A.L. & Laurie, V.F., 2006. Oxidation of wine phenolics: A critical evaluation and hypotheses. *Am. J. Enol. Vitic.* 57, 306-313
- Wilderandt, H.L. & Singleton, V.L., 1974. The production of aldehydes as a result of oxidation of polyphenolic compounds and its relation to wine aging. *American Journal of Enology and Viticulture*. 25, 119-126
- Z. Lebensm. Unters. Forsch. 205, 392-396, Escudero, A., Cacho, J. & Ferreira, V., 2011. Isolation and identification of odorants generated in wine during its oxidation: a gas chromatography-olfactometric study. *Eur. Food Res. Technol.* 105-110