

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ-
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΑΜΠΕΛΟΥΡΓΙΑ-ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ»

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΙΝΟΛΟΓΙΑΣ

**«ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΨΗΛΗΣ ΥΔΡΟΣΤΑΤΙΚΗΣ ΠΙΕΣΗΣ (ΗΗΠ) ΣΤΟ
ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ ΕΡΥΘΡΩΝ
ΟΙΝΩΝ»**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

που εκπονήθηκε στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΣΤΕΦΑΝΙΑ ΧΡΙΣΤΟΦΗ

Χημικός – Χημικός Τροφίμων & Περιβάλλοντος

ΑΘΗΝΑ 2017

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΥΤΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΑΜΠΕΛΟΥΡΓΙΑ-ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ»

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΙΝΟΛΟΓΙΑΣ

**«ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΨΗΛΗΣ ΥΔΡΟΣΤΑΤΙΚΗΣ ΠΙΕΣΗΣ (ΗΗΠ) ΣΤΟ
ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ ΕΡΥΘΡΩΝ
ΟΙΝΩΝ»**

ΜΕΤΑΠΥΤΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

που εκπονήθηκε στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΣΤΕΦΑΝΙΑ ΧΡΙΣΤΟΦΗ

Χημικός – Χημικός Τροφίμων & Περιβάλλοντος

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Στ. Καλλίθρακα (Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ, Επιβλέπουσα)

Ε. Πανάγου (Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ)

Αικ. Μπινιάρη (Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ)

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Τελειώνοντας την παρούσα εργασία, θα ήθελα να ευχαριστήσω την εταιρία Creta Farm SA για την παραχώρηση του μηχανήματος υψηλής υδροστατικής πίεσης για την προετοιμασία των δειγμάτων, και την εταιρία Biodynamics SA τόσο για την παραχώρηση του ‘One analyser’ και των απαραίτητων αντιδραστηρίων, όσο και τη συνεχή της υποστήριξη καθ’ όλη τη διάρκεια. Χωρίς αυτές η εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής θα ήταν αδύνατη.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την ακαδημαϊκή μου σύμβουλο κα. Σταματίνα Καλλίθρακα που μου εμπιστεύτηκε την ανάθεση της συγκεκριμένης εργασίας, για τις πολύτιμες υποδείξεις της και τη συνεχή καθοδήγηση της, όπως επίσης για τη στήριξη, την υπομονή και τον πολύτιμο χρόνο που μου αφιέρωσε όποτε χρειαζόμουν την βοήθεια της. Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να πω και στο κ. Ευστάθιο Πανάγου για την καθοδήγηση του για το μικροβιολογικό κομμάτι, και την κα. Αικατερίνη Μπινιάρη για την αξιολόγηση της παρούσας εργασίας.

Φυσικά δεν θα μπορούσα να παραλείψω την κα. Νίκη Προξενιά για την ανεκτίμητη βοήθεια της, και την ψυχολογική στήριξη που μου πρόσφερε όλο αυτό το διάστημα. Χωρίς την προθυμία και την υπομονή της να ενισχύσει την προσπάθεια επίλυσης των προβλημάτων που συναντήσαμε στη πορεία, η παρούσα διατριβή δε θα μπορούσε να ολοκληρωθεί. Ακόμα, θα ήθελα να πω ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ στο κ. Αντώνη Μπατή και την κα Κατερίνα Κοντινοπούλου που ήταν πάντα εκεί, πρόθυμοι να βοηθήσουν. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τις φοιτήτριες Ματούλα και Ηρώ για τη βοήθεια τους στο εργαστήριο μικροβιολογίας και τις χρήσιμες πληροφορίες που μου έδιναν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου και τους φίλους μου Μαρία, Σωτήρη και Σμαράγδα που έκαναν αυτά τα δύο χρόνια πιο εύκολα και όμορφα.

Αθήνα, Ιούλιος 2017

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η υψηλή υδροστατική πίεση (HHP) είναι μια μη-θερμική φυσική μέθοδος επεξεργασίας, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων ώστε να αυξηθεί η ασφάλεια και ο χρόνος ζωής των τροφίμων, μέσω απενεργοποίησης ανεπιθύμητων μικροοργανισμών. Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η αξιολόγηση της πιθανής χρήσης της HHP ως εναλλακτική τεχνική για την συντήρηση των οίνων, που θα μπορούσε να οδηγήσει και στη μείωση των χρησιμοποιούμενων ποσοτήτων SO₂. Για το σκοπό αυτό, δείγματα ερυθρού οίνου με 0 ppm, 30 ppm, 60 ppm και 100 ppm SO₂, υποβλήθηκαν σε υψηλή υδροστατική πίεση 350 MPa για 10 λεπτά στους 8 °C. Μια δεύτερη ομάδα δειγμάτων που περιείχαν μόνο SO₂ χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Ακολούθως, μελετήθηκαν οι παράμετροι χρώματος (ένταση, απόχρωση), ο μέσος βαθμός πολυμερισμού των ταννινών και η αντιοξειδωτική ικανότητα, και οι συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, οξικού οξέος, ανθοκυανών, πολυφαινολών και προανθοκυανιδινών για περίοδο 6 μηνών. Τέλος, προσδιορίστηκε η μικροβιολογική σταθερότητα των δειγμάτων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η HHP μπορούσε να εξασφαλίσει την μικροβιολογική σταθερότητα των οίνων ενώ δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ πιεσμένων και απίεστων δειγμάτων, με λίγες εξαιρέσεις στην περίπτωση των δειγμάτων με 0 ppm SO₂. Η HHP θα μπορούσε επομένως σε συνδυασμό με μικρότερες συγκεντρώσεις SO₂ να είναι μια υποσχόμενη τεχνική για την μείωση των χρησιμοποιούμενων δόσεων.

Λέξεις κλειδιά: Υψηλή υδροστατική πίεση (HHP), θειώδης ανυδρίτης (SO₂), μικροβιακός πληθυσμός, φαινολικές ενώσεις, μέσος βαθμός πολυμερισμού (mDP)

ABSTRACT

High hydrostatic pressure (HHP) is a non-thermal processing physical technology, which has been widely applied in the food industry in order to increase food safety and extend shelf life, by inactivation of undesired microorganisms. The aim of this work was to explore the possible use of HHP as an alternative method for wine preservation which could also lead to the production of wines with reduced amounts of SO₂. For this purpose, red wine samples containing 0 ppm, 30 ppm, 60 ppm and 100 ppm of sulphur dioxide (SO₂) were subjected to pressure of 350 MPa for 10 min at 8 °C. A second set of samples containing only SO₂ was used as control. Colour parameters (intensity and hue), acetaldehyde, acetic acid, individual anthocyanin content, antioxidant activity and tannin mean polymerization degree, were determined over a period of six months. In addition to chemical composition, wine microbial stability was also determined. The results showed that HHP could ensure microbial stability of wine while initially the chemical properties did not differ significantly between pressurized and unpressurized samples. HHP combined with reduced SO₂ contents might be a promising technology for wine industry.

Key words: High hydrostatic pressure, sulphur dioxide (SO₂), microbial population, phenolic compounds, mean degree of polymerization (mDP)

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

| | |
|--|-----|
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ | iv |
| ABSTRACT..... | v |
| ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ..... | vi |
| ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ | xi |
| ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ | xii |
| 1 Εισαγωγή..... | 15 |
| 1.1 Θειώδης ανυδρίτης (SO ₂) | 15 |
| 1.1.1 Χρήσεις θειώδους ανυδρίτη..... | 15 |
| 1.1.2 Μειονεκτήματα θειώδους ανυδρίτη..... | 16 |
| 1.2 Υποκατάστατα θειώδους ανυδρίτη..... | 17 |
| 1.2.1 Dimethyl dicarbonate (DMDC)..... | 17 |
| 1.2.2 Βακτηριοσύνες..... | 18 |
| 1.2.3 Φαινολικές ουσίες..... | 19 |
| 1.2.4 Λυσοζύμη..... | 21 |
| 1.2.5 Ασκορβικό οξύ..... | 22 |
| 1.3 Εναλλακτικές τεχνικές..... | 23 |
| 1.3.1 Παλμικά ηλεκτρικά πεδία..... | 23 |
| 1.3.2 Υπέρηχοι..... | 24 |
| 1.3.3 Υπεριώδες ακτινοβολία | 24 |
| 1.3.4 Υψηλή υδροστατική πίεση | 25 |
| 1.4 Παράμετροι που μελετήθηκαν..... | 31 |
| 1.4.1 Ακεταλδεΰδη..... | 31 |
| 1.4.2 Οξικό οξύ..... | 32 |
| 1.4.3 Φαινολικά συστατικά..... | 33 |

| | | |
|-------|---|----|
| 1.4.4 | Αντιοξειδωτική Ικανότητα..... | 40 |
| 1.4.5 | Μικροβιακός πληθυσμός | 41 |
| 1.5 | Αναλυτικές τεχνικές..... | 43 |
| 1.5.1 | Εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid phase extraction, SPE)..... | 43 |
| 1.5.2 | Φασματοφωτομετρία Ορατού- Υπεριώδους..... | 44 |
| 1.5.3 | Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης | 48 |
| 1.5.4 | Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων | 52 |
| 2 | Πειραματικό Μέρος..... | 53 |
| 2.1 | Προετοιμασία δειγμάτων | 53 |
| 2.1.1 | Οινοποίηση | 53 |
| 2.1.2 | Θείωση | 53 |
| 2.1.3 | Εφαρμογή Υψηλής Υδροστατικής Πίεσης (HHP) | 54 |
| 2.1.4 | Κωδικοποίηση δειγμάτων | 54 |
| 2.2 | Μέτρηση Ακεταλδεΐδης | 55 |
| 2.2.1 | Αρχή της Μεθόδου | 55 |
| 2.2.2 | Όργανο Μέτρησης | 56 |
| 2.2.3 | Χημικά Αντιδραστήρια..... | 56 |
| 2.2.4 | Προετοιμασία Διαλυμάτων..... | 56 |
| 2.2.5 | Πειραματική Διαδικασία..... | 56 |
| 2.3 | Μέτρηση Οξικού Οξέος..... | 57 |
| 2.3.1 | Αρχή της Μεθόδου | 57 |
| 2.3.2 | Όργανο Μέτρησης | 57 |
| 2.3.3 | Χημικά Αντιδραστήρια..... | 57 |
| 2.3.4 | Προετοιμασία Διαλυμάτων..... | 58 |
| 2.3.5 | Πειραματική Διαδικασία..... | 58 |
| 2.4 | Μέτρηση Ανθοκυανών | 58 |

| | | |
|-------|---------------------------------------|----|
| 2.4.1 | Αρχή της Μεθόδου | 58 |
| 2.4.2 | Όργανο Μέτρησης | 59 |
| 2.4.3 | Χημικά Αντιδραστήρια..... | 59 |
| 2.4.4 | Πειραματική Διαδικασία..... | 59 |
| 2.5 | Μέτρηση Προκυανιδινών | 60 |
| 2.5.1 | Αρχή της Μεθόδου | 60 |
| 2.5.2 | Όργανο Μέτρησης | 60 |
| 2.5.3 | Χημικά Αντιδραστήρια..... | 60 |
| 2.5.4 | Προετοιμασία Διαλυμάτων..... | 61 |
| 2.5.5 | Πειραματική Διαδικασία..... | 61 |
| 2.6 | Μέτρηση Παραμέτρων για το χρώμα | 61 |
| 2.6.1 | Αρχή της Μεθόδου | 61 |
| 2.6.2 | Όργανο Μέτρησης | 61 |
| 2.6.3 | Χημικά Αντιδραστήρια..... | 61 |
| 2.6.4 | Πειραματική Διαδικασία..... | 61 |
| 2.7 | Μέτρηση Πολυφαινολών Α..... | 62 |
| 2.7.1 | Αρχή της Μεθόδου | 62 |
| 2.7.2 | Όργανο Μέτρησης | 62 |
| 2.7.3 | Χημικά Αντιδραστήρια..... | 62 |
| 2.7.4 | Πειραματική Διαδικασία..... | 62 |
| 2.8 | Μέτρηση Πολυφαινολών Β | 62 |
| 2.8.1 | Αρχή της Μεθόδου | 62 |
| 2.8.2 | Όργανο Μέτρησης | 63 |
| 2.8.3 | Χημικά Αντιδραστήρια..... | 63 |
| 2.8.4 | Προετοιμασία Διαλυμάτων..... | 63 |
| 2.8.5 | Πειραματική Διαδικασία..... | 63 |

| | | |
|--------|--|----|
| 2.9 | Μέτρηση Αντιοξειδωτικής ικανότητας..... | 64 |
| 2.9.1 | Αρχή της Μεθόδου | 64 |
| 2.9.2 | Όργανο Μέτρησης | 64 |
| 2.9.3 | Χημικά Αντιδραστήρια..... | 64 |
| 2.9.4 | Προετοιμασία Διαλυμάτων..... | 64 |
| 2.9.5 | Πειραματική Διαδικασία..... | 65 |
| 2.10 | Προσδιορισμός Ανθοκυανών με HPLC..... | 65 |
| 2.10.1 | Όργανο Μέτρησης | 65 |
| 2.10.2 | Χημικά Αντιδραστήρια..... | 65 |
| 2.10.3 | Προετοιμασία Διαλυμάτων..... | 65 |
| 2.10.4 | Πειραματική Διαδικασία..... | 66 |
| 2.11 | Προσδιορισμός μέσου βαθμού πολυμερισμού (mDP) τανινών σε οίνο με HPLC..... | 67 |
| 2.11.1 | Όργανο Μέτρησης | 67 |
| 2.11.2 | Χημικά Αντιδραστήρια..... | 67 |
| 2.11.3 | Προετοιμασία Διαλυμάτων..... | 67 |
| 2.11.4 | Προετοιμασία Δείγματος | 68 |
| 2.11.5 | Πειραματική Διαδικασία..... | 69 |
| 2.12 | Προσδιορισμός Μικροβιακού φορτίου..... | 70 |
| 2.12.1 | Αρχή της Μεθόδου | 70 |
| 2.12.2 | Υλικά..... | 70 |
| 2.12.3 | Προετοιμασία Διαλυμάτων..... | 70 |
| 2.12.4 | Πειραματική Διαδικασία..... | 71 |
| 3 | Αποτελέσματα και συζήτηση | 72 |
| 3.1 | Μικροβιακός πληθυσμός | 72 |
| 3.2 | Συγκέντρωση ανθοκυανών και παραμέτρων του χρώματος..... | 72 |

| | | |
|-----|---|----|
| 3.3 | Συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων, προανθοκυανιδινών και μέσος βαθμός πολυμερισμού ταννινών..... | 80 |
| 3.4 | Πτητική οξύτητα..... | 91 |
| 4 | Συμπεράσματα και μελλοντική έρευνα..... | 93 |
| 4.1 | Συμπεράσματα..... | 93 |
| 4.2 | Μελλοντική έρευνα..... | 94 |
| | ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... | 95 |

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

| | |
|---|-----------|
| Πίνακας 1 Κωδικοποίηση δειγμάτων | 55 |
| Πίνακας 2 Gradient διαλυτών για διαχωρισμό ανθοκυανών | 66 |
| Πίνακας 3 Τιμές μοριακής απορρόφησης για την εξαγωγή πρότυπων καμπύλων για τις επεκτατικές υπομονάδες | 68 |
| Πίνακας 4 Gradient διαλυτών για προσδιορισμό του mDP..... | 69 |
| <i>Πίνακας 1 Ποσοστιαία μείωση στην συγκέντρωση ανθοκυανών</i> | <i>77</i> |
| <i>Πίνακας 2 Ποσοστιαία μείωση στην συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων</i> | <i>82</i> |
| <i>Πίνακας 3 Ποσοστιαία μείωση στη συγκέντρωση των προανθοκυανιδινών.....</i> | <i>84</i> |
| <i>Πίνακας 4 Ποσοστιαία μείωση του mDP μετά από 6 μήνες</i> | <i>91</i> |
| <i>Πίνακας 5 Ποσοστιαία μείωση της συγκέντρωσης του οξικού οξέος.....</i> | <i>92</i> |

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

| | |
|---|-----------|
| <i>Γράφημα 1 Πρότυπη καμπύλη για τον υπολογισμό των επιμέρους ανθοκυανών</i> | <i>73</i> |
| <i>Γράφημα 2 Εξέλιξη στη συγκέντρωση των ανθοκυανών πιεσμένων και απίεστων δειγμάτων κατά τη διάρκεια 6 μηνών. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών.</i> | <i>74</i> |
| <i>Γράφημα 3 Ποσοστιαία μείωση στη συγκέντρωση της ακεταλδεύδης κατά τη διάρκεια των 6 μηνών. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών.....</i> | <i>74</i> |
| <i>Γράφημα 4 Εξέλιξη της έντασης του χρώματος και της τιμής του κόκκινου πιεσμένων δειγμάτων και μαρτύρων κατά τη διάρκεια των 6 μηνών. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών.....</i> | <i>75</i> |
| <i>Γράφημα 5 Αύξηση της απόχρωσης και της τιμής του κίτρινου και του μπλε πιεσμένων δειγμάτων και μαρτύρων κατά τη διάρκεια των 6 μηνών. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών.....</i> | <i>76</i> |
| <i>Γράφημα 6 Συγκέντρωση των ανθοκυανών για τα δείγματα με 0 ppm, 30 ppm, 60 ppm και 100 ppm SO₂ στους 6 μήνες παλαίωσης τους. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).....</i> | <i>78</i> |
| <i>Γράφημα 7 Εξέλιξη στη συγκέντρωση των ανθοκυανών που μετρήθηκαν με την βοήθεια της HPLC, πιεσμένων και απίεστων δειγμάτων κατά τη διάρκεια 6 μηνών. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών.</i> | <i>78</i> |
| <i>Γράφημα 8 Συγκέντρωση της μαλβιδίνης για τα δείγματα με 0 ppm, 30 ppm, 60 ppm και 100 ppm SO₂ στους 6 μήνες παλαίωσης τους. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).....</i> | <i>80</i> |
| <i>Γράφημα 9 Πρότυπες καμπύλες για την κατεχίνη, την επικατεχίνη, το γαλλικό εστέρα της επικατεχίνης και τις αντίστοιχες επεκτατικές υπομονάδες τους που δηλώνονται με P (phloroglucinol) δίπλα από το όνομα.....</i> | <i>81</i> |

| | |
|---|-----------|
| <i>Γράφημα 10 Εξέλιξη στη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων πιεσμένων και απίεστων δειγμάτων κατά τη διάρκεια 6 μηνών. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών</i> | <i>82</i> |
| <i>Γράφημα 11 Συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων για τα δείγματα με 0 ppm, 30 ppm, 60 ppm και 100 ppm SO₂ στους 6 μήνες παλαίωσης τους. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p<0.05$)</i> | <i>83</i> |
| <i>Γράφημα 12 Σύγκριση της συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων όπως μετρήθηκαν με τον 'One' και με την κλασική μέθοδο Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p<0.05$)</i> | <i>84</i> |
| <i>Γράφημα 13 Εξέλιξη στη συγκέντρωση των μονομερών προανθοκυανιδινών πιεσμένων και απίεστων δειγμάτων κατά τη διάρκεια 6 μηνών. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών</i> | <i>85</i> |
| <i>Γράφημα 14 Συγκέντρωση των προανθοκυανιδινών για τα δείγματα με 0 ppm, 30 ppm, 60 ppm και 100 ppm SO₂ στους 6 μήνες παλαίωσης τους. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p<0.05$)</i> | <i>86</i> |
| <i>Γράφημα 15 Μεταβολή στο %P πιεσμένων και απίεστων δειγμάτων κατά τη διάρκεια 6 μηνών. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών.....</i> | <i>86</i> |
| <i>Γράφημα 16 Μεταβολή στο %G πιεσμένων και απίεστων δειγμάτων κατά τη διάρκεια 6 μηνών. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών.....</i> | <i>87</i> |
| <i>Γράφημα 17 Ποσοστό των υπομονάδων που φέρουν εστέρες του γαλλικού οξέος σε όλα τα δείγματα μετά από 6 μήνες. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p<0.05$)</i> | <i>88</i> |
| <i>Γράφημα 18 Μεταβολή στην AOA πιεσμένων και απίεστων δειγμάτων κατά τη διάρκεια 6 μηνών. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών.....</i> | <i>89</i> |
| <i>Γράφημα 19 Μεταβολή στο mDP πιεσμένων και απίεστων δειγμάτων κατά τη διάρκεια 6 μηνών. (A) Δείγματα με 0 ppm SO₂ (B) Δείγματα με 30 ppm SO₂ (Γ) Δείγματα με 60 ppm SO₂</i> | |

(Δ) Δείγματα με 100 ppm SO₂. Οι μπάρες δείχνουν το ± τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών90

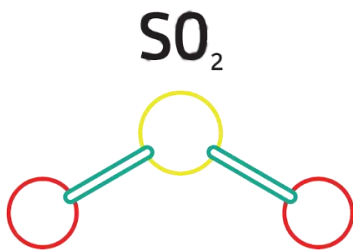
Γράφημα 20 Αύξηση της συγκέντρωσης του οξικού οξέος πιεσμένων και απίεστων δειγμάτων κατά τη διάρκεια 6 μηνών. Οι μπάρες δείχνουν το ± τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών91

1 Εισαγωγή

1.1 Θειώδης ανυδρίτης (SO₂)

1.1.1 Χρήσεις θειώδους ανυδρίτη

Οι απαιτήσεις των καταναλωτών για τροφές υψηλής διατροφικής αξίας, που να είναι μικροβιολογικά ασφαλείς και με την ελάχιστη δυνατή επεξεργασία ούτως ώστε να διατηρούν τα φυσικά τους χαρακτηριστικά, έχουν αυξηθεί εκθετικά τα τελευταία χρόνια. Αυτό οδήγησε τις αντίστοιχες εταιρίες να υιοθετήσουν νέες τεχνικές συντήρησης τροφίμων έναντι των παραδοσιακών, όπως την χρήση του θειώδους ανυδρίτη (SO₂).



Εικόνα 1 Μοριακός θειώδης ανυδρίτης

Ο SO₂ ξεκίνησε να χρησιμοποιείται ως συντηρητικό, στα τέλη του 18^{ου} αιώνα. Στις μέρες μας, χρησιμοποιείται ευρέως από διάφορες βιομηχανίες τροφίμων, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις τροφών με χαμηλό pH, όπως χυμοί φρούτων και αλκοολούχα ποτά. Έτσι, κατέκτησε πρωταγωνιστικό ρόλο και στην οινική βιομηχανία. Προστίθεται ταυτόχρονα με την μεταφορά του σταφυλοπολτού σε δεξαμενές ή στο πιεστήριο για προστασία από ανεπιθύμητα βιολογικά και φυσικοχημικά φαινόμενα. Η αντισηπτική του δράση μπορεί να περιγραφεί γενικά ως αναστολή της ανάπτυξης όλων των τύπων μικροοργανισμών όπως είναι οι ζύμες, τα γαλακτικά βακτήρια και τα οξικά βακτήρια. Επίσης, η ένωση αυτή εμποδίζει την ανεπιθύμητη έναρξη μηλογαλακτικής ζύμωσης, αναστέλλει την ανάπτυξη *Brettanomyces* και μικροδερμικών ζυμών, και προφυλάσσει τους οίνους από διάφορα ελαττώματα βακτηριακής προέλευσης (Bakker et al., 1998; MacHado, Toledo, & Vicente, 2009). Σαν αντιοξειδωτικό η ένωση αυτή μπορεί να δράσει άμεσα ή έμμεσα με διάφορους τρόπους. Άμεσα, αφού αντιδρά με το οξυγόνο και το υπεροξείδιο του υδρογόνου, οξειδώνεται ο ίδιος και έτσι προφυλάσσει άλλα ευοξειδωτα συστατικά του οίνου. Δύναται

ακόμα να ανάξει τις κινόνες που σχηματίζονται μέσω διεργασιών οξειδωσης πίσω στη φαινολική τους μορφή. Έμμεσα δρα απενεργοποιώντας τις οξειδάσες, ένζυμα που καταλύουν αντιδράσεις οξειδωσης (Oliveira et al., 2011). Απενεργοποίηση άλλων ενζύμων από το SO₂ όπως πολυφαινολοξειδάσες, περοξειδάσες και πρωτεάσες, όπως επίσης και αναστολή της αντίδρασης αμάβρωσης Maillard, προστατεύουν τους οίνους από το καφέτιασμα (Garde-Cerdan et al., 2008; Mayen, Merida, & Medina, 1996). Παρουσία του επίσης καθιζάνουν διάφορα κολλοειδή και καθυστερεί η έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης, δίνοντας έτσι χρόνο για απολάσπωση του γλεύκους, με τελικό αποτέλεσμα ένα πιο διαυγές τελικό προϊόν. Ακόμα, η προσθήκη του διευκολύνει την εκχύλιση πρωτογενών αρωματικών συστατικών, χρωστικών και διαφόρων φαινολικών μέσω καταστροφής των κυττάρων του φλοιού, σταθεροποιώντας έτσι το χρώμα. Η αύξηση της οξύτητας μέσω σχηματισμού του H₂SO₃ αποτελεί ακόμα μια επίδραση της προσθήκης του. Σαν πυρηνόφιλη ένωση, ο SO₂ μπορεί να αντιδράσει εύκολα με διάφορα συστατικά στο κρασί όπως την ακεταλδεύδη και το πυροσταφυλικό οξύ, και σε μικρότερο βαθμό αντιδρά με ανθοκυάνες, κινωμωμικά οξέα και ανάγοντα ζάχαρα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την μείωση του βαθμού πολυμερισμού των φαινολικών και απώλεια του χρώματος, που παρατηρείται συνήθως κατά την παλαίωση.

1.1.2 Μειονεκτήματα θειώδους ανυδρίτη

Η ανεξέλεγκτη χρήση του SO₂ πρέπει να αποφεύγεται, ανεξάρτητα από τα πλεονεκτήματα του. Από οινολογική σκοπιά, σε μεγάλες συγκεντρώσεις μπορεί να ανασταλεί η έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης και της μηλογαλακτικής στα ερυθρά, να αυξηθεί η αίσθηση σκληρότητας των οίνων λόγω σχηματισμού θειικών αλάτων, και να προκαλέσει αλλοιώσεις του οργανοληπτικού προφίλ του τελικού προϊόντος (Ribereau-Gayon, et al. 2006), είτε διαφοροποιώντας το άρωμα με την δημιουργία πτητικών με δυσάρεστη οσμή, είτε επιφέροντας αλλαγές στο χρώμα όπως προαναφέρθηκε. Επίσης, τα θειώδη που προκύπτουν από την προσθήκη θειώδους ανυδρίτη στο κρασί, έχουν συνδεθεί με διάφορες αλλεργικές αντιδράσεις σε μερίδα καταναλωτών (Timbo et al., 2004; H. Vally, Misso, & Madan, 2009; Vally, & Thompson, 2003; Vally & Thompson, 2001). Το μεγαλύτερο ποσοστό ατόμων με μεγάλη ευαισθησία στα θειώδη, μπορούν να παρουσιάσουν πληθώρα συμπτωμάτων όπως δερματίτιδα, κνίδωση, αγγειοοίδημα, κοιλιακούς πόνους, διάρροια, βρογχοσπασμούς και αναφυλαξία, ακόμα και σε ποσότητες 20-50 mg (H. Vally et al., 2009; H. Vally, & Thompson, 2003; H. Vally, & Thompson, 2001). Παρ' όλα αυτά, δερματικές αντιδράσεις και προβλήματα στο αναπνευστικό, μπορούν να παρουσιαστούν σε όλες τις περιπτώσεις, ακόμα και αν η ευαισθησία στα θειώδη είναι μικρή. Έντονα συμπτώματα σε μη-ασθματικά άτομα

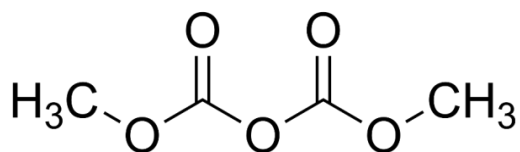
είναι σπάνια (H Vally & Thompson, 2001), ενώ ασθματικοί που είναι εξαρτημένοι από στεροειδή ή με υπερδραστηριοποίηση των αεραγωγών, μπορούν να παρουσιάσουν μεγαλύτερο ρίσκο αλλεργικής αντίδρασης στα θειώδη. Ωστόσο, για τα ασθματικά άτομα η αντίδραση αυτή μπορεί να οδηγήσει σε πολύ σοβαρότερα προβλήματα, αφού τα παράγωγα του SO₂ δύνανται να ενεργοποιήσουν τα πρωτο-ογκογονίδια, να απενεργοποιήσουν τα ογκοκατασταλτικά γονίδια, ακόμα και να συμμετάσχουν στην παθογένεια καρκίνου των πνευμόνων.

Λόγω λοιπόν των προβλημάτων υγείας που έχουν συσχετιστεί με τη χρήση του SO₂, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Οίνου και Αμπέλου (OIV) έχει μειώσει σταδιακά τα ανώτατα επιτρεπόμενα όρια του στο κρασί (A. García-Ruiz et al., 2008). Στις μέρες μας τα όρια αυτά είναι 150mg/L ολικού SO₂ για ερυθρούς οίνους και 200mg/L για λευκούς (Regulation (EC) No 607/2009). Εντούτοις, ένα ανεπαρκές συντηρητικό, δεν διασφαλίζει την απαιτούμενη σταθερότητα του οίνου σε περίπτωση εκτεταμένης οξειδωσης ή μικροβιακής ανάπτυξης, γεγονός που μπορεί να θέσει σε κίνδυνο την ποιότητα του. Από την άλλη πάλι, λόγω της σύνθετης χημικής ισορροπίας του SO₂ στο κρασί που έχει σαν επακόλουθο τη δέσμευση του από διάφορες ενώσεις, καθιστά δύσκολη την επίτευξη ενός επαρκούς και ασφαλούς επιπέδου ελεύθερου SO₂ (10-20 mg/L). Έχοντας επίγνωση όλων αυτών λοιπόν, γεννήθηκε το ενδιαφέρον για εύρεση νέων συντηρητικών και καινοτόμων τεχνολογιών, που να μπορούν να αντικαταστήσουν, ή τουλάχιστον να δράσουν συνεργιστικά με το SO₂, ώστε να καταστεί εφικτή η μείωση της χρήσης του στην οινική βιομηχανία.

1.2 Υποκατάστατα θειώδους ανυδρίτη

1.2.1 Dimethyl dicarbonate (DMDC)

Το DMDC αποτελεί ένα χημικό αναστολέα για τους μικροοργανισμούς και έχει προταθεί για την αντικατάσταση του SO₂ (Divol, Strehaiano, & Lonvaud-Funel, 2005). Η χρήση της συγκεκριμένης ένωσης στο κρασί, έχει εγκριθεί πρόσφατα από την Ευρωπαϊκή Ένωση (E.E.), σε συγκεντρώσεις όμως που να μην ξεπερνούν τα 200mg/L κατά την εμφιάλωση για οίνους με περισσότερο από 5g/L ανάγωντων σακχάρων (Regulation (EC) No 643/2006).



Εικόνα 2 Μοριακή δομή Dimethyl Dicarbonate (DMDC)

Βασικές του δράσεις είναι η αναστολή συγκεκριμένων ενζύμων όπως η αλκοολική-αφυδρογονάση και η αφυδρογονάση της 3-φωσφο-γλυκεραλδεύδης, και η μεθοξυκαρβονυλίωση πυρηνόφιλων ενώσεων (ιμιδαζόλια, αμίνες και θειόλες), με αποτέλεσμα την αναστολή της κυτταρικής αύξησης (Renouf, Strehaiano, & Lonvaud-Funel, 2008). Με την προσθήκη του DMDC στο κρασί, σχηματίζεται ταχύτατα μεθανόλη που παραμένει κάτω από τα τοξικά επίπεδα, μικρές συγκεντρώσεις ανθρακικού μεθυλίου και ανθρακικών αλκυλίων μέσω αντιδράσεων με φαινολικά και οργανικά οξέα (Divol et al., 2005), και πολύ μικρές συγκεντρώσεις καρβαμικού μεθυλίου μέσω αντιδράσεων με αμμωνιακά (NH₄⁺) και αμινοξέα (Delfini et al., 2002). Ωστόσο, τα προϊόντα αυτά βρίσκονται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις, αδυνατώντας να επηρεάσουν το οργανοληπτικό προφίλ του οίνου (Delfini et al., 2002).

Όπως και στο SO₂, η αντιμικροβιακή δράση του DMDC εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως το pH, τη θερμοκρασία, τη συγκέντρωση αιθανόλης, αλλά και τα είδη, τα στελέχη και την αρχική συγκέντρωση κυττάρων (Costa et al., 2008). Αντίθετα όμως, το DMDC είναι αποτελεσματικότερο πρόσθετο κατά των ζυμών παρά κατά των βακτηρίων, με τις απαιτούμενες συγκεντρώσεις για προστασία από οξικά και γαλακτικά βακτήρια να ξεπερνούν κατά πολύ αυτές που επιβάλλει η νομοθεσία (Costa et al., 2008; Delfini et al., 2002; Divol et al., 2005).

Η αδυναμία προστασίας από τα βακτήρια και η εφήμερη δράση του DMDC λόγω της ολικής μετατροπής του σε μεθανόλη λίγες ώρες μετά την προσθήκη του στο κρασί, κατέστησε τη χρήση του για πλήρη αντικατάσταση του SO₂ αμφιλεγόμενη και αποτρεπτική.

1.2.2 Βακτηριουσύνες

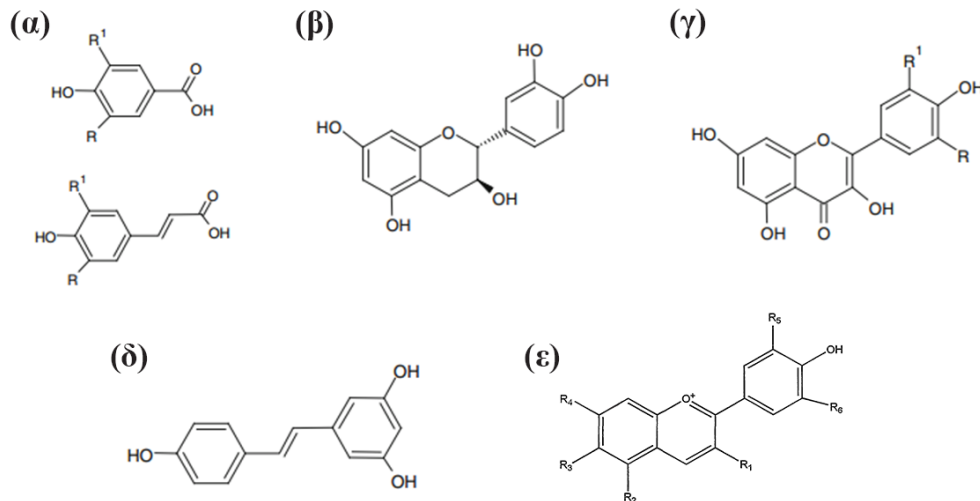
Οι Βακτηριουσύνες που παράγονται από συγκεκριμένα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB), είναι μικρά πολυπεπίδια που αποτελούν αναστολείς για άλλα είδη βακτηρίων. Πιο συγκεκριμένα, οι βακτηριουσύνες δύνανται να μεταβάλουν την διαπερατότητα των κυτταρικών μεμβρανών των gram-θετικών βακτηρίων, οδηγώντας στην λύση τους (Chung &

Hancock, 2000). Σε συνδυασμό με τις φυσικές τους ιδιότητες (άχρωμες και άοσμες), και το γεγονός ότι δεν είναι τοξικές, τις καθιστούν το ιδανικό πρόσθετο για την καταπολέμηση των gram-θετικών βακτηρίων (Abee, Krockel, & Hill, 1995). Παρόλα αυτά, η αποτελεσματικότητά τους αυτή δεν αντανακλάται απόλυτα και στα gram-αρνητικά βακτήρια, αφού εκεί εξαρτάται από το είδος (Chung & Hancock, 2000; Rojo-Bezares et al., 2007). Μικρή επίδραση φαίνεται να έχουν και στις ζύμες, αφού η ελάχιστη συγκέντρωση βακτηριοσύνης για αναστολή τους καταγράφηκε στα 400 $\mu\text{g/mL}$, με την αντίστοιχη τιμή για τα LAB να είναι 12.5 $\mu\text{g/mL}$.

Λόγω της περιορισμένης δράσης τους, προτάθηκε η συνδυαστική χρήση βακτηριοσυνών και SO_2 για τον περιορισμό της ανάπτυξης μικροοργανισμών αλλοίωσης στο κρασί, και συνεπώς την μείωση της χρησιμοποιούμενης δόσης του SO_2 (Rojo-Bezares et al., 2007). Πολλά υποσχόμενη φαίνεται να είναι και συνδυαστική χρήση βακτηριοσυνών και DMDC για την πλήρη αντικατάσταση του SO_2 . Βασικούς περιορισμούς όμως αποτελούν η μη έγκριση της χρήσης βακτηριοσυνών από την Ε.Ε., όπως επίσης και η απουσία πληροφοριών σχετικά με την αντιοξειδωτική τους δράση και την επίδραση τους στο οργανοληπτικό προφίλ των οίνων.

1.2.3 Φαινολικές ουσίες

Οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν μια πολύ σημαντική ομάδα για το κρασί αφού καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό διάφορες οργανοληπτικές ιδιότητες όπως το χρώμα και η στυπτικότητα. Οι σημαντικότερες από αυτές τις ενώσεις είναι τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή, τα στυλβένια και οι ταννίνες γενικότερα, και οι ανθοκυάνες για τα ερυθρά κρασιά. Η δομή τους, τους επιτρέπει να δεσμεύουν και να εξουδετερώνουν ελεύθερες ρίζες. Επίσης έχουν την ικανότητα να οξειδώνονται οι ίδιες παρουσία οξυγόνου σε κινόνες, ανάγοντας ταυτόχρονα το οξυγόνο σε υδρο-υπεροξειδικές ρίζες και υπεροξείδιο του υδρογόνου. Η αντιοξειδωτική αυτή τους δράση έχει συσχετιστεί με θετικές επιδράσεις από την κατανάλωση κρασιού σε ασθενείς με καρδιαγγειακά και εκφυλιστικά νοσήματα (Oliveira et al., 2011).



Εικόνα 3 Σημαντικότερες κατηγορίες φαινολικών ενώσεων α) φαινολικά οξέα, β) φλαβανόλες, γ) φλαβονόλες, δ) στυλβένια, ε) ανθοκυάνες

Τα τελευταία χρόνια, έχουν διεξαχθεί έρευνες για την πιθανή αντικατάσταση του SO₂ από τις φαινολικές ενώσεις, λόγω της αντιοξειδωτικής και αντιμικροβιακής τους δράσης. Έχει παρατηρηθεί ότι η προσθήκη οινολογικών ταννινών, μπορεί να επηρεάσει τα οξειδωτικά φαινόμενα στο γλεύκος και το κρασί, μάλλον μέσω ενός διπλού μηχανισμού ενζυμικής αναστολής, και απεντοπισμού και σταθεροποίησης ελευθέρων ριζών (Sonni et al., 2009). Χωρίς να επηρεάζει την διαδικασία της ζύμωσης (Cejudo-Bastante et al., 2010), η προσθήκη ταννινών μπορεί επίσης να βελτιώσει οργανοληπτικά το τελικό προϊόν (Sonni et al., 2009). Η χρήση ωστόσο δύο διαφορετικών ειδών οινολογικών ταννινών, όπως γαλλοτανίνες και προκυανιδίνες, είχε αντίθετα αποτελέσματα αφού αύξησε το κίτρινο χρώμα και μείωσε την αρωματική ένταση (Cejudo-Bastante et al., 2010). Η αντιμικροβιακή τους δράση βασίζεται στην ικανότητα τους να αυξάνουν την διαπερατότητα της κυτοπλασματικής μεμβράνης (Campos et al., 2009). Η ικανότητα τους αυτή έχει συσχετιστεί με το λιπόφιλο χαρακτήρα τους και τις διαφορές στην δομή τους (Campos et al., 2009; Vaquero, Alberto, & de Nadra, 2007), με τις φλαβανόλες και τα στυλβένια να παρουσιάζουν τον μεγαλύτερο βαθμό αναστολής της ανάπτυξης των LAB, τα φαινολικά οξέα και τους εστέρες τους μέτριο βαθμό και οι φλαβαν-3-όλες τον μικρότερο βαθμό (García-Ruiz et al., 2011). Η αντιμικροβιακή τους δράση συνδέθηκε επίσης και με την προστιθέμενη ποσότητα φαινολικών, που αποτελεί και τον κυριότερο περιοριστικό παράγοντα για την χρήση τους, αφού για την επίτευξη του επιθυμητού μικροβιακού πληθυσμού είναι απαραίτητη προσθήκη ποσοτήτων που ξεπερνούν κατά πολύ τις συνήθεις συγκεντρώσεις στο κρασί (Campos et al.,

2009; Vaquero, Alberto, & de Narda, 2007). Η παρουσία τους σε μεγάλες συγκεντρώσεις μπορεί επίσης να επηρεάσει τον οργανοληπτικό χαρακτήρα του οίνου καθώς χαρακτηρίζονται από πικρή γεύση και στυφάδα. Η προσθήκη λοιπόν φαινολικών ενώσεων σαν αντιοξειδωτικά, σε συνδυασμό με το DMDC και τις βακτηριοσύνες για προστασία από παθογόνους μικροοργανισμούς θα μπορούσε να είναι αποτελεσματική, αν και οι ιδανικές αναλογίες των τριών δεν είναι γνωστές και η χρήση βακτηριοσυνών ακόμα δεν έχει εγκριθεί.

1.2.4 Λυσοζύμη

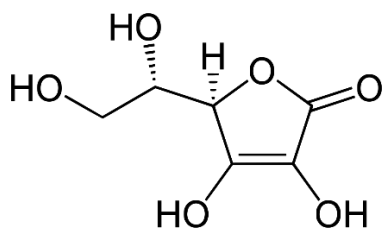
Η λυσοζύμη είναι μια πρωτεΐνη 129 αμινοξέων, η οποία απομονώθηκε από την αλβουμίνη του αυγού και έχει αποδειχτεί ένα αποτελεσματικό αντιμικροβιακό πρόσθετο σε διάφορες τροφές . Η χρήση της στην οινική βιομηχανία έχει μελετηθεί διεξοδικά λόγω της μέγιστης σταθερότητας και ενεργότητας της σε pH= 2.8-4.2 (Delfini et al., 2004). Δύναται να αναστείλει την κυτταρική αύξηση βακτηρίων στο κρασί και να ελέγξει την αυθόρμητη ανάπτυξη LAB, που συχνά οδηγούν σε αλλοιώσεις και «κολλημένες» ζυμώσεις (Bartowsky et al., 2004; Gao et al., 2002). Η αποτελεσματικότητα της λυσοζύμης στην αναστολή ανεπιθύμητων LAB διαφέρει ανάλογα με το είδος και τις συνθήκες οινοποίησης (Delfini et al., 2004; Gao et al., 2002). Παρουσιάζει μεγάλη ενεργότητα κατά των gram-θετικών βακτηρίων, μικρή κατά των gram-αρνητικών βακτηρίων, ενώ είναι ανενεργή κατά των ευκαριωτικών κυττάρων (Delfini et al., 2004).

Μερικές ερευνητικές ομάδες, έχουν παρατηρήσει ότι η λυσοζύμη είναι πιο αποτελεσματική σε λευκούς οίνους σε σχέση με ερυθρούς (Bartowsky et al., 2004). Αυτό πιθανόν να οφείλεται στις μεγάλες συγκεντρώσεις πλυφαινολών στα ερυθρά που μπορούν να δεσμεύσουν την λυσοζύμη (Bartowsky et al., 2004; Delfini et al., 2004). Εκτός από την μείωση της ενεργότητας της από την δέσμευση της από άλλα συστατικά του οίνου, μπορεί να επέλθει επίσης μείωση της έντασης του χρώματος και σχηματισμός ιζήματος ή και θολώματος, ακόμα και σε λευκούς οίνους. Παρά την αρνητική επίδραση στο χρώμα, η προσθήκη λυσοζύμης αφήνει ανεπηρέαστο το αρωματικό προφίλ (Bartowsky et al., 2004), διατηρώντας ταυτόχρονα χαμηλά επίπεδα πτητικής οξύτητας και βιογενών αμινών (Sonni et al., 2009). Μάλιστα, καλύτερα οργανοληπτικά αποτελέσματα και πιο συγκεκριμένα βελτιωμένο αρωματικό προφίλ, παρατηρήθηκαν κατά την συνδυαστική χρήση της λυσοζύμης με ταννίνες (Sonni et al., 2009). Τέλος, αν και η χρήση της λυσοζύμης έχει εγκριθεί από τον OIV εδώ και χρόνια, το προστιθέμενο κόστος στην οινοποίηση και το ρίσκο

για αλλεργίες των καταναλωτών στα αυγά, έχουν περιορίσει το ενδιαφέρον των οινοπαραγωγών.

1.2.5 Ασκορβικό οξύ

Το ασκορβικό οξύ ή βιταμίνη C, είναι μια ισχυρά αναγωγική ένωση η οποία χρησιμοποιείται κυρίως κατά τη λευκή οινοποίηση. Η ικανότητα του να αντιδρά με το μοριακό οξυγόνο ταχύτερα από τις φαινολικές ενώσεις στο κρασί, το έχει καθιερώσει εδώ και 25 χρόνια μια καλή εναλλακτική για προστασία από τις οξειδώσεις. Συνήθως προστίθεται σε συγκεντρώσεις 15 g/hL παρουσία 20-30 mg/L θειώδους ανυδρίτη, γιατί σε μικρότερες συγκεντρώσεις (SO₂) επιταχύνονται οξειδώσεις λιγότερο ευοξειδωτων συστατικών σε υπεροξειδία. Παρουσία ασκορβικού οξέος μπορούν επίσης να αντιμετωπιστούν θολώματα σιδήρου, αφού σαν αναγωγική ένωση, μπορεί να μετατρέψει τα τρισθενή ιόντα σιδήρου (Fe⁺³) σε δισθενή (Fe⁺²) (Τσακίρης, 1998).



Εικόνα 4 Μοριακή δομή ασκορβικού οξέος

Εντούτοις, έρευνες που έχουν διεξαχθεί για την επίδραση της προσθήκης ασκορβικού στο οργανοληπτικό προφίλ είναι αντιφατικές. Παλαιότερες έρευνες υποστήριζαν την προσθήκη του, όχι μόνο για αντιοξειδωτική προστασία, αλλά λόγω και των ευνοϊκών αποτελεσμάτων στο άρωμα και την γεύση των παραγόμενων οίνων (Bauernfeind & Pinkert, 1970). Νεότερες έρευνες όμως τοποθετούνται αρνητικά, αφού όχι μόνο δεν εντοπίζουν διαφορές από την προσθήκη του σε οίνους που είδη περιέχουν SO₂, αλλά ισχυρίζονται ότι αυξάνεται η πιθανότητα αμαύρωσης (Marks & Morris, 1993; Peng et al., 1998). Από την οξείδωση του ασκορβικού οξέος, ιδιαίτερα παρουσία ιόντων μετάλλων που δρουν καταλυτικά, προκύπτουν ενώσεις που αυξάνουν την απορρόφηση στα 440nm, υπεροξειδίο του υδρογόνου που ενισχύει περαιτέρω τις αντιδράσεις οξείδωσης, φουρφουράλη που αντιδρά με την κατεχίνη δίνοντας κίτρινες χρωστικές (Bauernfeind & Pinkert, 1970; Bradshaw, Prenzler, & Scollary, 2001; Gonzalez-Flores et al., 2012) κ.ά.. Η μηδενική λοιπόν αντιμικροβιακή δράση και η αμφισβητούμενη οξειδωτική δράση της βιταμίνης C, έχουν περιορίσει κατά πολύ την χρήση του για μείωση του SO₂.

1.3 Εναλλακτικές τεχνικές

1.3.1 Παλμικά ηλεκτρικά πεδία

Τα παλμικά ηλεκτρικά πεδία (PEF) αποτελούν μια γρήγορη, μη-θερμική και πολύ αποτελεσματική τεχνική για απενεργοποίηση παθογόνων μικροοργανισμών σε τρόφιμα, χωρίς να μεταβάλουν την ποιότητα τους (Buckow et al., 2010). Μέσω αυτής της τεχνολογίας εφαρμόζονται μικροί παλμοί της τάξης των μs, μεγάλης ισχύος ηλεκτρικού πεδίου (>70Kv/cm) (Buckow et al., 2010; Puértolas, López, Condón, Raso, & Álvarez, 2009; Zhang, Barbosa-Cánovas, & Swanson, 1995). Αποτελεσματικά, οι κυτταρικές μεμβράνες γίνονται πιο διαπερατές και μεταβάλλεται το διαμεμβρανικό δυναμικό (Puértolas et al., 2009). Όταν η διαφορά μεταξύ εξωτερικού και εσωτερικού κυτταρικού δυναμικού ξεπεράσει μια κρίσιμη τιμή (~1V), επέρχεται πόλωση και τελικά καταστροφή της κυτταρική μεμβράνης (Butz & Tauscher, 2002). Η αποτελεσματικότητα των PEF εξαρτάται από το είδος του τροφίμου, τους μικροοργανισμούς και τις συνθήκες εφαρμογής τους. Επίσης, εκτός από την καταστροφή μικροοργανισμού, έχει παρατηρηθεί μείωση της ενεργότητας κάποιων ενζύμων όπως οι πολυφαινολοξειδάσες (Giner et al., 2001) και οι περοξειδάσες, μάλλον λόγω αλλαγής στην δευτεροταγή δομή τους (Zhong et al., 2007).

Έρευνες για την εφαρμογή PEF τόσο σε κρασί όσο και σε γλεύκος, έχουν δείξει μεγαλύτερη ευαισθησία των ζυμών σε σχέση με τα βακτήρια. Ωστόσο, με εφαρμογή 186 kJ/kg σε 29 kV/cm παρατηρήθηκε μείωση του πληθυσμού *Brettanomyces* και *Lactobacillus* κατά 99.9%, περιορίζοντας έτσι το ρίσκο υποβάθμισης του οίνου από μικροοργανισμούς (Puértolas et al., 2009). Σημαντική ήταν επίσης η παρατήρηση ότι κατεργασία του γλεύκους με PEF, με ταυτόχρονη μείωση ή και αποκλεισμό του SO₂, άφηνε αμετάβλητη την συγκέντρωση αζωτούχων ενώσεων, λιπαρών οξέων και θρεπτικών συστατικών για την ανάπτυξη ζυμών, και δεν επηρέαζε σημαντικά ούτε τη συγκέντρωση πτητικών ενώσεων στο τελικό προϊόν, ούτε το οργανοληπτικό προφίλ (Garde-Cerdan et al., 2007). Ακόμα, μέσω της τεχνικής αυτής μπορεί να μειωθεί ο χρόνος ζύμωσης, και να αυξηθεί η εκχύλιση φαινολικών ουσιών στο γλεύκος καταλήγοντας σε μεγαλύτερη ένταση χρώματος και μείωση του χρόνου παλαίωσης (Puértolas et al., 2010). Εν τούτοις, τα βελτιωμένα χρωματικά χαρακτηριστικά και το αρωματικό μπουκέτο, δεν μπορούσαν να γίνουν αντιληπτά σε τριγωνικό οργανοληπτικό έλεγχο μετά την πάροδο 8 μηνών (Garde-Cerdan et al., 2007).

Συνοψίζοντας, η εφαρμογή PEF απαιτεί μικρές ενεργειακές δαπάνες και χρόνο εφαρμογής και μπορεί να απενεργοποιήσει μικροοργανισμούς αλλοιώσεων στο γλεύκος και στον οίνο, χωρίς να μεταβάλει σημαντικά τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά. Όλα αυτά την καθιστούν καλή εναλλακτική για μείωση του χρησιμοποιούμενου SO₂, όμως πλήρης αποκλεισμός του θα πρέπει να επανεξετάζεται αφού υποβαθμίζει τα επίπεδα γευστικής πολυπλοκότητας στους οίνους (Garde-Cerdan, et al., 2007).

1.3.2 Υπέρηχοι

Κατά την τελευταία δεκαετία, η χρήση υπερήχων αναδύθηκε σαν εναλλακτική της συμβατικής θερμικής τεχνικής παστερίωσης και αποστείρωσης τροφίμων (O'Donnell et al., 2010). Η απενεργοποίηση παθογόνων και αλλοιογόνων μικροοργανισμών και ενζύμων μέσω της κατεργασίας με υπέρηχους, λαμβάνει χώρα κυρίως μέσω φυσικών ή/και χημικών φαινομένων που αυξάνουν σημειακά τόσο τη θερμοκρασία όσο και την πίεση (O'Donnell et al., 2010; Piyasena, Mohareb, & McKellar, 2003; Tiwari, O'Donnell, & Cullen, 2009). Με αυτόν τον τρόπο, το τρόφιμο υπόκειται σε παστερίωση χωρίς να μεταβάλλεται σημαντικά η θερμοκρασία του. Η αποτελεσματικότητα των υπερήχων εξαρτάται από τον τύπο και τον πληθυσμό των βακτηρίων και την συχνότητα του μήκους κύματος του υπέρηχου. Η μέγιστη δραστηριότητα έχει παρατηρηθεί σε υψηλότερες συχνότητες και μικρότερο αρχικό μικροβιακό πληθυσμό (Piyasena et al., 2003; Tsukamoto et al., 2004).

Η χρήση τους έχει προταθεί σε διάφορα στάδια της οινοποίησης, με την εφαρμογή τους στο γλεύκος να μειώνει τους αλλοιογόνους μικροοργανισμούς και να αυξάνει στο κρασί τις χρωστικές και τις ενώσεις που συνεισφέρουν στη γεύση και το άρωμα στόματος. Κατά την διάρκεια της ζύμωσης η εκμετάλλευση των ιδιοτήτων των υπερήχων θα μπορούσε να γίνει με τρόπο ώστε να σταματήσει ή να καθυστερήσει η μηλογαλακτική ζύμωση, ή να επιταχύνει την αυτόλυση των ζυμών και να προαχθεί η μηλογαλακτική ανάλογα με το επιθυμητό προϊόν (Jiranek, Grbin, Yap, Barnes, & Bates, 2008). Όπως και τα PEF, οι υπέρηχοι δύνανται να επιταχύνουν την παλαίωση των οίνων λόγω αυξημένης εκχύλισης χρωστικών, όμως η χρήση τους για αντικατάσταση ή μείωση του SO₂ χρήζει περαιτέρω μελέτης και αξιολόγησης.

1.3.3 Υπεριώδες ακτινοβολία

Η υπεριώδης (UV) ακτινοβολία περιλαμβάνει τη χρήση του ηλεκτρομαγνητικού πεδίου από τα 100 μέχρι τα 400 nm. Σαν τεχνολογία στην βιομηχανία τροφίμων επιστρατεύτηκε για την απολύμανση επιφανειών και συσκευασιών, με διάφορα πλεονεκτήματα να έχουν καταγραφεί.

Η εφαρμογή της δεν παράγει τοξικά παραπροϊόντα, καταστρέφει οργανικούς ρύπους και απαιτεί ελάχιστη ενέργεια σε σχέση με τη θερμική παστερίωση (Keyser, et al., 2008). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η UV-C ακτινοβολία (200-280 nm), η οποία έχει την ικανότητα να απενεργοποιεί ένζυμα, ζύμες και βακτήρια, ιδιαίτερα τα LAB (Fredericks, du Toit, & Krügel, 2011; Guerrero-Beltrán & Barbosa-Cánovas, 2006) Η απενεργοποίηση ενζύμων είναι απόρροια της αποδιάταξης των πρωτεϊνών, ενώ η μείωση του μικροβιακού φορτίου οφείλεται σε καταστροφή του DNA (Manzocco, Quarta, & Dri, 2009; Tiwari et al., 2009). Η αποτελεσματικότητα της εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του προϊόντος όπως το χρώμα, η απορρόφηση, η πυκνότητα, δισταμένα σωματίδια και διαλυμένα υγρά που μπορούν να εμποδίσουν την UV ακτινοβολία να φτάσει τους μικροοργανισμούς (Fredericks et al., 2011).

Στο κρασί παρατηρήθηκε αποτελεσματική απενεργοποίηση διαφόρων μικροοργανισμών όπως *Brettanomyces*, *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* και *Oenococcus*, με τους ερυθρούς οίνους ωστόσο να παρουσιάζουν μικρότερη αποτελεσματικότητα στην αναστολή της ανάπτυξης τους σε σχέση με τους λευκούς λόγω χρώματος (Fredericks et al., 2011). Επίσης, ακόμα και σε λευκά κρασιά, η UV ακτινοβολία θα πρέπει να χρησιμοποιείται στα τελικά στάδια οινοποίησης όπου η θολότητα βαίνει μειούμενη. Άλλοι περιορισμοί στη χρήση της, θα μπορούσαν να είναι ο μεγάλος απαιτούμενος χρόνος έκθεσης του κρασιού και ο μικρός όγκος στον οποίο μπορεί να εφαρμοστεί.

1.3.4 Υψηλή υδροστατική πίεση

Παρατηρώντας λοιπόν και καταγράφοντας τις ιδιότητες των ενώσεων και των τεχνικών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για μείωση του SO₂, γίνεται εύκολα αντιληπτή η ύπαρξη βασικών περιορισμών που περιστελλούν τη χρήση τους. Το αμφιλεγόμενο κλίμα γύρω από αυτές, που διαμορφώνεται από νομοθετικά, πρακτικά και οικονομικά όρια, συντέλεσε στη διεύρυνση του πεδίου αναζήτησης. Έτσι ξεκίνησε έρευνα που αφορούσε την επίδραση της υψηλής υδροστατικής πίεσης (HHP) σε οίνους και την πιθανή χρήση της σαν εναλλακτική τεχνική για μείωση ή ακόμα και αντικατάσταση του SO₂.

1.3.4.1 Γενικές αρχές

Η υψηλή υδροστατική πίεση (HHP), που αναφέρεται επίσης ως διεργασία υψηλής πίεσης (HPP) ή υπερύψηλη πίεση (UHP), είναι μια μη-θερμική τεχνική που θεωρείται «πράσινη», αφού χρησιμοποιείται νερό ως μέσο συμπίεσης και έχει υψηλή ενεργειακή απόδοση

(Salvador, Santos, & Saraiva, 2010). Κατά την HHP, υποβάλλονται τρόφιμα είτε σε στερεή είτε σε υγρή μορφή, με ή χωρίς συσκευασία, σε πιέσεις από 100-1000 MPa (Cao et al., 2011). Παράλληλα, μπορεί να γίνει έλεγχος της θερμοκρασίας η οποία μπορεί να διατηρηθεί σταθερή σε εύρος επιπέδων, από <0 °C για ελαχιστοποίηση των επιδράσεων αδιαβατικής θέρμανσης, μέχρι και >100 °C. Συγκεκριμένα για παστερίωση χρησιμοποιούνται πιέσεις περίπου 600 MPa σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, ενώ για αποστείρωση πιέσεις 500-900 MPa και θέρμανση για μερικά λεπτά στους 90-121 °C. Οι συνήθεις χρόνοι έκθεσης κυμαίνονται από ms μέχρι και μεγαλύτεροι των 20 λεπτών, αν και οικονομικοί παράγοντες συχνά συντέμνουν τους παλμούς αυτούς κάτω από τα 20 λεπτά. Η HHP δρα άμεσα και ομοιόμορφα σε όλη τη μάζα του τροφίμου, ανεξάρτητα από το μέγεθος, το σχήμα και τη σύσταση του (Cao et al., 2011; Ramirez, Saraiva, & Torres, 2009). Έτσι, τα χαρακτηριστικά αυτά δεν λαμβάνονται υπόψη για τη περιγραφή της διαδικασίας.

Οι πιέσεις που χρησιμοποιούνται συνήθως στα τρόφιμα, παρουσιάζουν μικρή επίδραση στους ομοιοπολικούς δεσμούς (Taoukis et al., n.d.), περιορίζοντας σημαντικά τις χημικές μεταβολές στο σύνολό τους, ιδιαίτερα όταν η κατεργασία γίνεται κοντά σε θερμοκρασία δωματίου. Συχνά ωστόσο, η HHP συνδυάζεται με θέρμανση για αποτελεσματικότερη απενεργοποίηση μικροβίων και ενζύμων. Οι χημικές μεταβολές στο τρόφιμο είναι ανάλογες τελικά της θερμοκρασίας, της διάρκειας και του μεγέθους της εφαρμοζόμενης πίεσης.

Το έργο συμπίεσης κατά την HHP, αυξάνει τη θερμοκρασία του τροφίμου μέσω αδιαβατικής θέρμανσης κατά 3 °C περίπου ανά 100 MPa, ανάλογα με την σύσταση του. Μείωση της θερμοκρασίας στα αρχικά επίπεδα παρατηρείται κατά την αποσυμπίεση, με την προϋπόθεση ότι δεν έχει χαθεί (ή αποκτηθεί) ενέργεια από τα τοιχώματα του δοχείου πίεσης κατά την διάρκεια της συμπίεσης. Στο δοχείο πίεσης επομένως, πρέπει να διατηρείται θερμοκρασία ίση με την τελική αύξηση της θερμοκρασίας του τροφίμου, για πραγματικά ισοθερμικές συνθήκες. Μια αρχικά ομοιόμορφη κατανομή θερμοκρασίας, είναι επίσης απαραίτητη για την επίτευξη ομοιογενούς αύξησης της στο σύστημα κατά τη συμπίεση. Η αυξομείωση της θερμοκρασίας στο τρόφιμο πρέπει να προσδιορίζεται και να αναπαράγεται κάθε φορά, εφόσον αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της αντιμικροβιακής δράσης της HHP.

Η διακύμανση που παρατηρείται στον όγκο των τροφίμων θέτει δύο περιορισμούς. Ο πρώτος αφορά τις προδιαγραφές της συσκευασίας που θα χρησιμοποιηθεί στην HHP. Συγκεκριμένα, η συσκευασία αυτή πρέπει να είναι ανθεκτική στην μείωση του όγκου της μέχρι και κατά 15%, διατηρώντας την δυνατότητα επιστροφής στον αρχικό όγκο. Μεταλλικά

κουτιά, γυάλινες φιάλες και χάρτινα κουτιά κρίνονται ακατάλληλα. Συσκευασίες από πολυμερή και συμπολυμερή με τουλάχιστον μια εύκαμπτη πλευρά αποτελούν τις συνηθέστερες επιλογές, αφού εκτός από την εύκολη προσαρμογή του όγκου τους, είναι αδιαπέραστα από νερό, οξυγόνο και φως, δύνανται να εξασφαλίσουν συνθήκες κενού και είναι συμβατά με την τεχνολογία της HHP. Ο δεύτερος περιορισμός σχετίζεται με το είδος των τροφίμων που μπορούν να ανταπεξέλθουν σε συνθήκες HHP. Έχοντας σαν δεδομένο ότι η πιθανότητα αλλαγής της εμφάνισης του τροφίμου αυξάνεται παράλληλα με την διάρκεια και το επίπεδο πίεσης, πλούσια σε πρωτεΐνες και δομικά ευαίσθητα τρόφιμα (π.χ. φράουλες) αποκλείονται από τις διαδικασίες HHP. Αντίθετα προϊόντα στα οποία εφαρμόζεται HHP (μαρμελάδες, χυμοί και ποτά, dressing για σαλάτες, σάλτσες και ντιπ, θαλασσινά και ψάρια, κέικ ρυζιού, κρέατα, πουλερικά και γαλακτοκομικά) βρίσκονται είδη στην αγορά, έχοντας φτάσει το 2013 κέρδη \$3 δισεκατομμυρίων.

1.3.4.2 Επίδραση του pH στην HHP

Κατά τη συμπίεση των τροφίμων παρατηρείται μεταβολή στο pH τους, που είναι συναρτήσεως της επιβαλλόμενης πίεσης. Η κατεύθυνση της μεταβολής αυτής και το μέγεθος της πρέπει να προσδιορίζονται για κάθε διεργασία. Για χυμό μήλου, η μεταβολή αυτή παρουσίασε πτώση 0.2 μονάδων για κάθε 100 MPa στην αύξηση της πίεσης (Heremans 1995). Με την πτώση του pH οι περισσότεροι μικροοργανισμοί εμφανίζονται πιο επιρρεπείς στην απενεργοποίηση από την HHP, με τα όξινα pH (≤ 4.5) να αποδεικνύονται τα αποτελεσματικότερα. Ακόμα όμως και σε pH=7.0, η βιωσιμότητα κυττάρων ανθεκτικού στην πίεση στελέχους E.coli, μειωνόταν αναλογικά με την αύξηση της πίεσης από τα 300 MPa στα 600 MPa (Garcia-graells, Hauben, & Michiels, 1998).

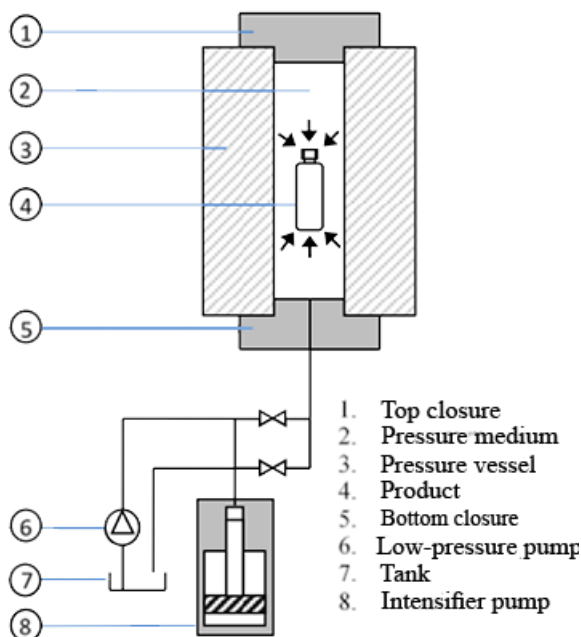
1.3.4.3 Επίδραση της ενεργότητας του νερού στην HHP

Αντιθέτως, το μέγεθος και η κατεύθυνση της μεταβολής στην περίπτωση της ενεργότητας του νερού (a_w) σαν συνάρτηση της εφαρμοζόμενης πίεσης δεν έχει καταγραφεί. Υπάρχει όμως συσχετισμός μεταξύ της μείωσης της a_w και του βαθμού απενεργοποίησης μικροοργανισμών. Λεπτομερέστερα, μείωση της a_w από 0.98-1.00 σε 0.94-0.96, είχε σαν επακόλουθο την δραματική πτώση στο βαθμό απενεργοποίησης. Η αυξημένη πίεση ωστόσο, δύναται να καταστρέψει τις κυτταρικές μεμβράνες των μικροοργανισμών, οδηγώντας στον θάνατο τους. Όσα κύτταρα επιβιώσουν, αδυνατούν να «αναρρώσουν» λόγω χαμηλής a_w .

Συμπερασματικά, δεν μπορεί να προβλεφθεί με βεβαιότητα το ακριβές αποτέλεσμα της μείωσης της a_w (Oxen & Knorr, 1993).

1.3.4.4 Εξοπλισμός για την εφαρμογή HHP

Εξοπλισμός για την εφαρμογή HHP στα τρόφιμα τροφίμων αποτελείται από (1) ένα δοχείο πίεσης κυλινδρικού σχήματος, (2) δύο κλειστά άκρα, (3) ένα μέσο για τη διατήρηση των ακραίων πωμάτων (4) μια αντλία χαμηλής πίεσης, (5) ένα ενισχυτή που χρησιμοποιεί υγρό από την αντλία χαμηλής πίεσης για την παραγωγή του υγρού υψηλής πίεσης για τη συμπίεση του συστήματος, και (6) αναγκαία συστήματα και όργανα ελέγχου. Τα έξι εξαρτήματα ενός συστήματος επεξεργασίας υψηλής πίεσης μπορούν να διευθετηθούν με διάφορους τρόπους, ώστε να είναι δυνατή και η κατεργασία ασυσκευαστων υγρών τροφών με ένα ημι-συνεχή τρόπο, και συσκευασμένων τροφίμων σε παρτίδες.



Εικόνα 5 Διάταξη ενός συστήματος επεξεργασίας υψηλής υδροστατικής πίεσης (HHP)

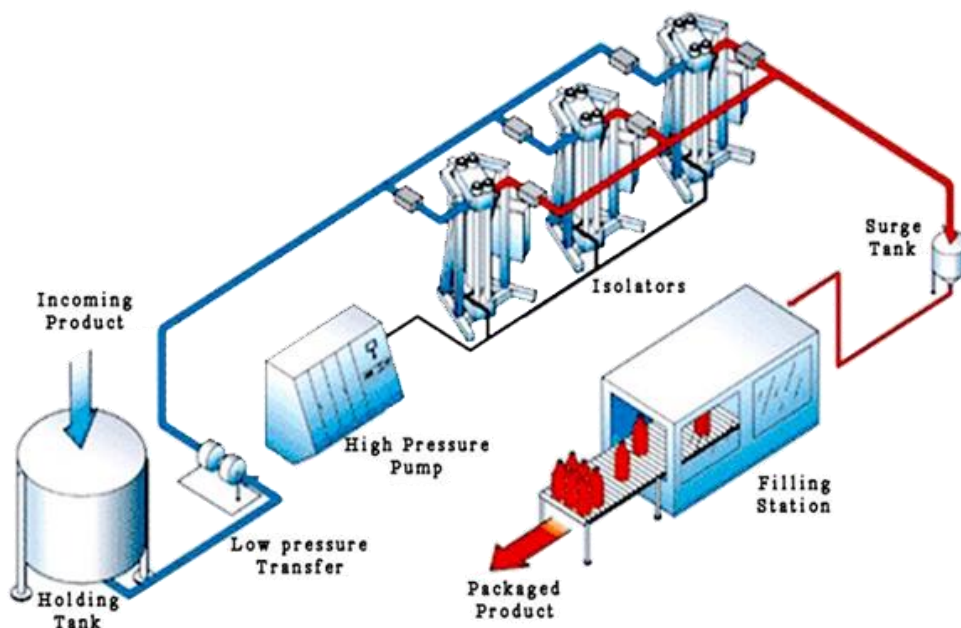
1.3.4.5 Λειτουργία HHP κατά παρτίδες

Για τη λειτουργία κατά παρτίδες, συσκευασμένα τρόφιμα τοποθετούνται στο δοχείο πίεσης, το δοχείο σφραγίζεται, και νερό αντλείται μέσα στο δοχείο για να εκτοπίσει τον αέρα. Αυτό γίνεται ώστε να μειωθεί το κόστος άντλησης και όχι για λόγους μικροβιακής αναστολής αφού η επίδραση του αέρα σε αυτή είναι μηδενική. Όταν το δοχείο πίεσης είναι πλήρες, η βαλβίδα εκτόνωσης της πίεσης είναι κλειστή, και το νερό αντλείται μέσα στο

δοχείο μέχρι να επιτευχθεί η επιθυμητή πίεση. Ο ρυθμός συμπίεσης είναι ευθέως ανάλογος προς την υποδύναμη της αντλίας χαμηλής πίεσης του ενισχυτή. Με το πέρασμα του χρόνου συμπίεσης, η βαλβίδα εκτόνωσης της πίεσης ανοίγει και το νερό που χρησιμοποιείται για τη συμπίεση αφήνεται να εκτονωθεί και να επιστρέψει σε ατμοσφαιρική πίεση. Το δοχείο ανοίγεται και τα συσκευασμένα τρόφιμα απομακρύνονται.

1.3.4.6 Ημι-συνεχής λειτουργία HHP

Τα υπάρχοντα ημι-συνεχή συστήματα για την κατεργασία υγρών τροφίμων, χρησιμοποιούν ένα δοχείο πίεσης που περιέχει ένα ελεύθερο έμβολο για τη συμπίεση τους. Μια αντλία τροφίμων χαμηλής πίεσης χρησιμοποιείται για να γεμίσει το δοχείο πίεσης. Καθώς γεμίζει το δοχείο το ελεύθερο έμβολο μετατοπίζεται. Όταν γεμίσει, η θυρίδα εισόδου είναι κλειστή και το νερό υψηλής πίεσης εισάγεται πίσω από το ελεύθερο έμβολο για τη συμπίεση του υγρού τροφίμου. Με εφαρμογή 680 MPa ο όγκος του υγρού θα μειωθεί κατά 15%. Εφόσον το σύστημα παραμείνει στις επιλεγμένες συνθήκες πίεσης για τον κατάλληλο χρόνο, αποσυμπιέζεται ελευθερώνοντας την πίεση στο νερό. Το επεξεργασμένο υγρό εκκενώνεται από το δοχείο σε ένα άλλο αποστειρωμένο. Μια αντλία νερού χαμηλής πίεσης χρησιμοποιείται για να μετακινήσει το ελεύθερο έμβολο πίσω στην αρχική του θέση. Το επεξεργασμένο υγρό τρόφιμο μπορεί να μεταφερθεί ασηπτικά σε προ-αποστειρωμένα δοχεία (Gould, 1995).



Εικόνα 6 Διάταξη ενός συστήματος HHP ημι-συνεχούς λειτουργίας

1.3.4.7 HPP μηχανισμοί απενεργοποίησης

Οι διάφορες επιδράσεις της υψηλής υδροστατικής πίεσης μπορούν να ομαδοποιηθούν σε επιδράσεις αναδίπλωσης κυττάρων, σε κυτταρικές και βιοχημικές αλλαγές, και σε επιπτώσεις σε γενετικούς μηχανισμούς. Έχει αποδειχθεί ότι η πίεση μεταβάλλει την κυτταρική μορφολογία, και ότι με εφαρμογή αυξανόμενων πιέσεων επιβραδύνεται η κυτταρική διαίρεση. Ακόμα και στην περίπτωση εφαρμογής 100 - 300 MPa πίεσης που επάγεται βλάστηση των σπορίων, τα νέα βλαστικά κύτταρα είναι πιο ευαίσθητα στις περιβαλλοντικές συνθήκες (Sale, Gould, & Hamilton, 2017). Γενικότερα, τα gram-θετικά βακτήρια είναι πιο ανθεκτικά από τα gram-αρνητικά. Όσο πιο ανεπτυγμένη εξελικτικά η μορφή ζωής, τόσο πιο ευαίσθητη είναι σε συνθήκες HHP. Επίσης, τα κύτταρα που βρίσκονται στην εκθετική φάση αύξησης είναι πιο ευαίσθητα από αυτά που βρίσκονται στην στάσιμη φάση τους.

Κατά γενικό κανόνα (αρχή του Le Chatelier), η πίεση ενισχύει τις αντιδράσεις που οδηγούν σε μείωση του όγκου, ενώ αναστέλλει ή περιορίζει τις αντιδράσεις που περιλαμβάνουν αύξηση του όγκου. Στην περίπτωση των πρωτεϊνών τα αποτελέσματα ποικίλουν σε μεγάλο βαθμό λόγω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων που ενεργούν με έναν ιδιαίτερο τρόπο υπό πίεση. Μέχρι πιέσεις 100 MPa, οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις τείνουν να οδηγήσουν σε αύξηση του όγκου, ενώ πέρα από αυτό το εύρος τιμών παρατηρείται μείωση του όγκου και η πίεση τείνει να σταθεροποιήσει τις αλληλεπιδράσεις αυτές (K Suzuki, Y Taniguchi, 1972). Κατά συνέπεια, το υδρόφοβο ποσοστό μιας πρωτεΐνης θα καθορίσει σε μεγάλο βαθμό την έκταση της μετουσίωσης της σε οποιαδήποτε πίεση (Jaenicke, Ludemann, & Schade, 1981). Η τροποποίηση των ενδομοριακών δομών, οι μεταβολές στην ενεργό θέση, στο pH και στη συγκέντρωση του υποστρώματος αποτελούν επιπρόσθετους παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την απενεργοποίηση των ενζύμων (Suzuki & Suzuki, 1962). Η μετουσίωση βασικών ενζύμων σε ορισμένους οργανισμούς δύναται να οδηγήσει ακόμα και στο θάνατο τους.

Εκτός από τη μετουσίωση πρωτεϊνών και ενζύμων, πιθανή είναι και η διαφοροποίηση της διαπερατότητας των κυτταρικών μεμβρανών, αφού η μείωση του όγκου δίνει το έναυσμα για μείωση του εμβαδού διατομής ανά μόριο φωσφολιπιδίου. Η αλλαγή αυτή, σε συνδυασμό με τη μετουσίωση των πρωτεϊνών, αναστέλλει την πρόσληψη αμινοξέων. Επίσης με εφαρμογή πίεσης παρατηρείται απώλεια ενδοκυτταρικών συστατικών από την αλλοιωμένη δομή της κυτταρικής μεμβράνης. Με δεδομένα αυτά, είναι πλέον γενικώς αποδεκτό ότι για τους μικροοργανισμούς η κύρια πηγή βλάβης λόγω πίεσης, είναι οι αλλαγές που επέρχονται στην

κυτταρική μεμβράνη (Paul & Morita, 1971). Η διαπερατότητα της ωστόσο και η αντοχή σε συνθήκες HHP, επηρεάζονται από την ύπαρξη διαφόρων ενώσεων όπως η φωσφατιδυλ-γλυκερόλη, που καθιστά πιο επιρρεπή τα κύτταρα σε απενεργοποίηση, σε αντίθεση με τα ακόρεστα λιπαρά οξέα (Russell et al., 1995; Smelt, Rijke, & Hayhurst, 2006). Η επερχόμενες αλλαγές στην κυτταρική μεμβράνη ζυμών από την εφαρμογή HHP, φαίνεται να είναι ισοδύναμες με αυτές που προκαλούνται από την υψηλή θερμοκρασία και το οξειδωτικό στρες, με τις μεμβρανικές ATPase να αποτελούν το πιθανότερο σημείο κλειδί (Smelt, 1998).

1.4 Παράμετροι που μελετήθηκαν

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας ήταν η αξιολόγηση της HHP ως εναλλακτική τεχνική για την μείωση των χρησιμοποιούμενων ποσοτήτων SO₂ στους παραγόμενους οίνους, μέσω της επίδρασης της στο φυσικοχημικό και μικροβιολογικό τους προφίλ. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκαν οι συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης, οξικού οξέος, πολυφαινολών, προανθοκυανιδινών και ανθοκυανών (ολικών και μονομερών), όπως επίσης η αντιοξειδωτική ικανότητα, ο μέσος βαθμός πολυμερισμού και η ένταση και απόχρωση ενός ερυθρού οίνου.

1.4.1 Ακεταλδεΐδη

Η ακεταλδεΐδη (CH₃CHO) είναι μια από τις σημαντικότερες καρβονυλικές ενώσεις που παράγονται κατά την ζύμωση, για το οργανοληπτικό προφίλ πολλών οινοπνευματωδών ποτών όπως οι οίνοι (Miyake & Shibamoto, 1993). Τα επίπεδα ακεταλδεΐδης στους οίνους ποικίλουν, με το μέσο όρο για τους ερυθρούς να ανέρχεται στα 30 mg/L, ενώ για λευκούς και γλυκούς οίνους η τιμή αυτή είναι 80 mg/L και 300 mg/L αντίστοιχα. Χαρακτηριστικά, η ακεταλδεΐδη αποτελεί το 90% περίπου των αλδεΐδικών ενώσεων που υπάρχουν στους οίνους (McCloskey & Mahaney, 1981). Σε χαμηλά επίπεδα δίνει ένα ευχάριστο φρουτώδες άρωμα, αλλά σε υψηλές συγκεντρώσεις έχει αρνητική επίδραση στο οργανοληπτικό προφίλ των οίνων και θεωρείται ανεπιθύμητη (Miyake & Shibamoto, 1993). Τα όρια αντίληψης της στους οίνους είναι 100-125 mg/L (Zoecklein, et al. 1995). Η ένωση αυτή χαρακτηρίζεται επίσης από υψηλή δραστηριότητα, γεγονός που της επιτρέπει να αντιδράσει με τα αμινοξέα παράγοντας έτσι διάφορες άλλες αρωματικές ενώσεις (Griffith & Hammond, 1989).

Η προέλευση της μπορεί να είναι είτε μικροβιολογική είτε χημική. Μικροβιολογικά μπορεί να παραχθεί ως παραπροϊόν κατά την ζύμωση, με τα επίπεδα να ποικίλουν ανάλογα

με το στέλεχος που χρησιμοποιείται (Margalith, 1981). Αν και τα ζάχαρα θεωρούνται το βασικότερο υπόστρωμα για το σχηματισμό της σε αυτή την περίπτωση, ο μεταβολισμός αμινοξέων όπως η αλανίνη, συνεισφέρει επίσης στην αύξηση των επιπέδων της κατά την ζύμωση (Henschke, P.A. & Jiranek, 1993). Ακόμα, μετά το τέλος της ζύμωσης, η οξείδωση της αιθανόλης προς ακεταλδεύδη από film yeast είναι πολύ πιθανή (Zoecklein et al., 1995). Όπως είναι λογικό, η θερμοκρασία, το pH και η συγκέντρωση ζαχάρων, SO₂ και οξυγόνου, επηρεάζουν την παραγωγή ακεταλδεύδης από τις ζύμες (Ough & Amerine, 1958). Χημικά η ακεταλδεύδη μπορεί να παραχθεί μέσω οξείδωσης της αιθανόλης από το οξυγόνο ή ένα ισχυρό οξειδωτικό, όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂). Το H₂O₂ μπορεί να παραχθεί στους οίνους, τόσο από οξείδωση του ασκορβικού οξέος όσο και από οξείδωση φαινολικών ουσιών.

Εκτός από την επίδραση που μπορεί να έχει στο αρωματικό προφίλ των οίνων, η ακεταλδεύδη επηρεάζει σημαντικά το χρώμα και την σταθερότητα του. Σε μικρές συγκεντρώσεις επιταχύνει της αντιδράσεις πολυμερισμού μεταξύ ανθοκυανών και ταννινών επιτυγχάνοντας μεγαλύτερη ένταση χρώματος και σταθερότητα, και μείωση της πικράδας και της στυπτικότητας. Δύναται επίσης να δεσμεύσει τον SO₂ ο οποίος είναι υπεύθυνος για τον αποχρωματισμό των ανθοκυανών, ενισχύοντας έμμεσα τη σταθερότητα (Ribereau-Gayon, Paul, & Glories, 1983). Αντίθετα, περαιτέρω αντίδραση της με πολυμερισμένες ταννίνες μπορεί να οδηγήσει σε αποσταθεροποίηση τους, σχηματισμό θολώματος και καταβύθιση τους, και μείωση της έντασης (Somers, 1972). Τέλος, εξωγενής προσθήκη ακεταλδεύδης, αναστέλλει την ανάπτυξη ζυμών και την αλκοολική ζύμωση (Stanley & Pamment, 1993).

1.4.2 Οξικό οξύ

Τα οργανικά οξέα συμβάλλουν σημαντικά στη σύσταση, στη φυσικοχημική και μικροβιολογική σταθερότητα και τις οργανοληπτικές ιδιότητες όπως το χρώμα και η γευστική ισορροπία των οίνων, ιδιαίτερα των λευκών (Ribereau-Gayon et al., 1983). Γενικότερα, οι ερυθροί οίνοι είναι πιο σταθεροί σε χαμηλότερες τιμές οξύτητας, λόγω της παρουσίας των φαινολικών ενώσεων που ενισχύουν την οξύτητα και βοηθούν στη σταθεροποίηση τους κατά την παλαίωση (Sonni et al., 2009).

Δύο παράμετροι που σχετίζονται με την οξύτητα και παρουσιάζουν ενδιαφέρον κατά την οινοποίηση είναι η ολική (ή ογκομετρούμενη) οξύτητα και η πτητική οξύτητα, οι οποίες παρουσιάζουν και διαφορετική επίδραση στο οργανοληπτικό προφίλ των οίνων (Ribereau-Gayon, et al., 2006). Η ολική οξύτητα ορίζεται ως το άθροισμα των όξινων ομάδων όταν το

δείγμα εξουδετερώνεται σε pH= 7.0. Η πτητική οξύτητα οφείλεται στα λιπαρά οξέα της σειράς του οξικού που βρίσκονται στους οίνους είτε ελεύθερα, είτε με τη μορφή αλάτων. Οφείλεται, κατά ένα μεγάλο μέρος της, στο οξικό οξύ και λιγότερο στα υπόλοιπα κατώτερα λιπαρά οξέα όπως είναι το μυρμηγκικό, το προπιονικό και το βουτυρικό. Εκφράζεται συνήθως σε g οξικού ή θεικού οξέος ανά λίτρο οίνου (g/L) (Mataix & Castro, 1999; Τσακίρης, 1998).

Το οξικό οξύ το οποίο όπως προαναφέρθηκε, αποτελεί και το κυρίαρχο είδος της πτητικής οξύτητας, μπορεί να παραχθεί μέσω ενζυμικής, μικροβιακής ή ακόμα και χημικής οξειδωσης της αιθανόλης που παράγεται κατά την ζύμωση. Επίσης, δύναται να σχηματιστεί κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση, μετά από προσβολή του κιτρικού οξέος και των πεντοζών από γαλακτικά βακτήρια. Πάνω από συγκεκριμένα όρια (0.3-0.6 g/L) η πτητική οξύτητα οφείλεται σε ανεπιθύμητες βακτηριακές αλλοιώσεις συστατικών του οίνου, όπως τα σάκχαρα, το τρυγικό οξύ και η γλυκερίνη, ή της οξειδωσης της αιθανόλης προς οξικό οξύ από τα αερόβια οξικά βακτήρια (Τσακίρης, 1998). Στην περίπτωση αυτή, ο οίνος θεωρείται υποβαθμισμένος. Όταν η πτητική οξύτητα βρίσκεται εντός ορίων, η ύπαρξη του οξικού οξέος στους οίνους μπορεί να έχει θετική επίδραση τόσο στο αρωματικό τους προφίλ μέσω σχηματισμού εστέρων (Ramey & Ough, 1980), όσο και στην σταθεροποίηση του χρώματος μέσω σχηματισμού ακεταλδεύδης (Griffith & Hammond, 1989; Ribereau-Gayon et al., 1983).

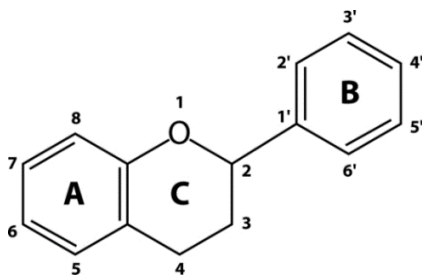
1.4.3 Φαινολικά συστατικά

Τα φαινολικά συστατικά είναι μία από τις πιο σημαντικές ομάδες ενώσεων των σταφυλιών και κατ' επέκταση των οίνων, αφού επηρεάζουν την αντιοξειδωτική και αντιβακτηριακή τους ικανότητα, τη δυνατότητα παλαίωσής τους αλλά και τις οργανοληπτικές τους ιδιότητες όπως το χρώμα, τη στυπτικότητα και την πικράδα. Οι φαινολικές ενώσεις διαθέτουν έναν βενζολικό δακτύλιο στον οποίο συνδέονται μία ή περισσότερες υδροξυλικές ομάδες, και βρίσκονται κυρίως στον φλοιό και στα γίγαρτα των σταφυλιών από τα οποία εκχylίζονται στο γλεύκος κατά την οινοποίηση (Chira, et al., 2009; Kallithraka, Bakker, & Clifford, 1998; Ribereau-Gayon, et al., 2006; Sun, et al., 2013)

Τα φαινολικά που συναντώνται στα σταφύλια και στους οίνους μπορούν να διαχωριστούν σε δύο μεγάλες ομάδες τα μη φλαβονοειδή και τα φλαβονοειδή. Στα μη φλαβονοειδή συστατικά περιλαμβάνονται τα στιλβένια και τα παράγωγα του βενζοϊκού και κινναμωμικού

οξέος των οποίων τα περισσότερα υδρογόνα των ατόμων άνθρακα του δακτυλίου έχουν αντικατασταθεί με υδροξυλομάδες (-OH) και μεθόξυ ομάδες (-OCH₃) (Ribereau-Gayon, et al., 2006). Οι κυριότερες ενώσεις είναι τα υδροξυβενζοϊκά οξέα (π.χ. γαλλικό και ελλαγικό οξύ) τα οποία συναντώνται και υπό τη μορφή εστέρων των φλαβαν-3-ολών, τα υδροξυκιναμμομικά (π.χ. καφεϊκό, και κουμαρικό οξύ) τα οποία μπορούν να προκαλέσουν αμαύρωση των λευκών οίνων όταν οξειδωθούν, ενώ έχουν την ικανότητα να ενώνονται με ανθοκυάνες (Castañeda-ovando, et al, 2009), και τα στιλβένια (π.χ. trans- και cis-ρεσβερατρόλη) τα οποία δεν συμμετέχουν στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των οίνων αλλά μπορούν να δράσουν τόσο ως αντιοξειδωτικά αλλά και ως αντικαρκινικά μόρια (Gris et al., 2011; Teixeira, et al., 2013).

Τα φλαβονοειδή χαρακτηρίζονται από ένα βασικό σκελετό με 15 άτομα άνθρακα με βασικό τύπο C₆-C₃-C₆. Δύο υδροξυλιωμένοι βενζολικοί δακτύλιοι, A και B, ενώνονται με μια αλυσίδα τριών ατόμων άνθρακα που είναι μέρος ενός ετεροκυκλικού δακτυλίου C.



Εικόνα 7 Δομή φλαβονοειδούς δακτυλίου

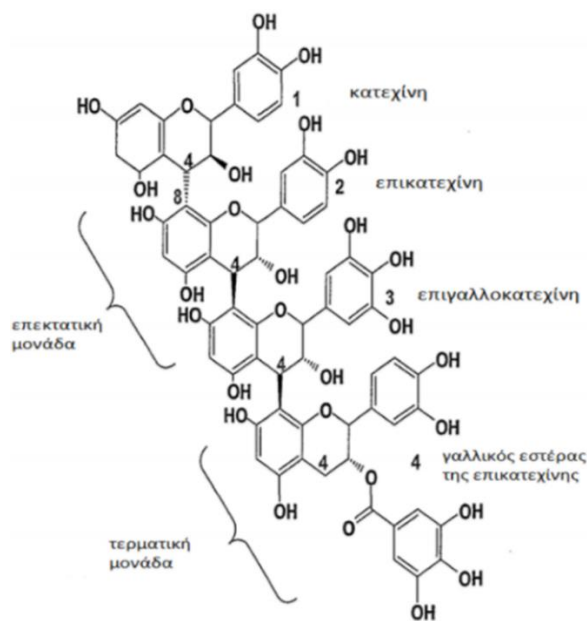
Τα φλαβονοειδή έχουν εντοπιστεί στον φλοιό, στη σάρκα και στα γίγαρτα των ραγών. Χωρίζονται σε υποομάδες, ανάλογα με το βαθμό οξείδωσης του πυρανικού δακτυλίου, οι οποίες είναι οι φλαβονόλες, οι φλαβανόνες, οι φλαβανονόλες, οι φλαβανόλες και οι ανθοκυάνες (Ribereau-Gayon, et al., 2006; Teixeira et al., 2013). Από αυτές, οι φλαβανόλες και οι ανθοκυάνες βρίσκονται στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στο σταφύλι και στον οίνο και επηρεάζουν σε πολύ μεγάλο βαθμό την ποιότητα των οίνων.

1.4.3.1 Φλαβανόλες

Οι φλαβαν-3-όλες είναι φλαβονοειδή τα οποία βρίσκονται κυρίως στα γίγαρτα, δευτερευόντως στους φλοιούς και σε ακόμα μικρότερες συγκεντρώσεις στη σάρκα (Chira et al., 2009; Prieur, et al., 1994). Παίζουν σημαντικό ρόλο στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των οίνων και χωρίζονται σε μονομερείς, ολιγομερείς και πολυμερείς ανάλογα με τη δομή τους et al., 2003; Prieur et al., 1994). Τα μονομερή χαρακτηρίζονται από την παρουσία

ομάδας υδροξυλίου στη θέση 3 του C δακτυλίου. Στις ράγες τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των φλαβαν-3-ολών έχουν τα μονομερή όπως η (+)-κατεχίνη και το ισομερές της η (-)-επικατεχίνη, ενώ σε μικρότερες συγκεντρώσεις συναντώνται ο γαλλικός εστέρας της (-)-επικατεχίνης και η (-)-επιγαλλοκατεχίνη (Chira et al., 2009; Monagas et al., 2003). Η κατεχίνη και επικατεχίνη έχουν κυρίως πικρή γεύση όταν συναντώνται ως μονομερή. Ωστόσο, οι μονομερείς φλαβαν-3-όλες κατά την ωρίμανση αντιπροσωπεύουν μόνο ένα μικρό ποσοστό, καθώς το μεγαλύτερο μέρος των φλαβαν-3-ολών είναι σε ολιγομερή και πολυμερή μορφή (Kennedy & Jones, 2001; Monagas et al., 2003; Prieur et al., 1994).

Οι ολιγομερείς και πολυμερείς φλαβαν-3-όλες είναι γνωστές ως προανθοκυανιδίνες ή συμπυκνωμένες ταννίνες που αποτελούνται από τερματικές και επεκτατικές υπομονάδες, όπως η κατεχίνη, η επικατεχίνη, ο γαλλικός εστέρας της επικατεχίνης και η επιγαλλοκατεχίνη (Downey, Harvey, & Robinson, 2003; Kennedy & Jones, 2001)

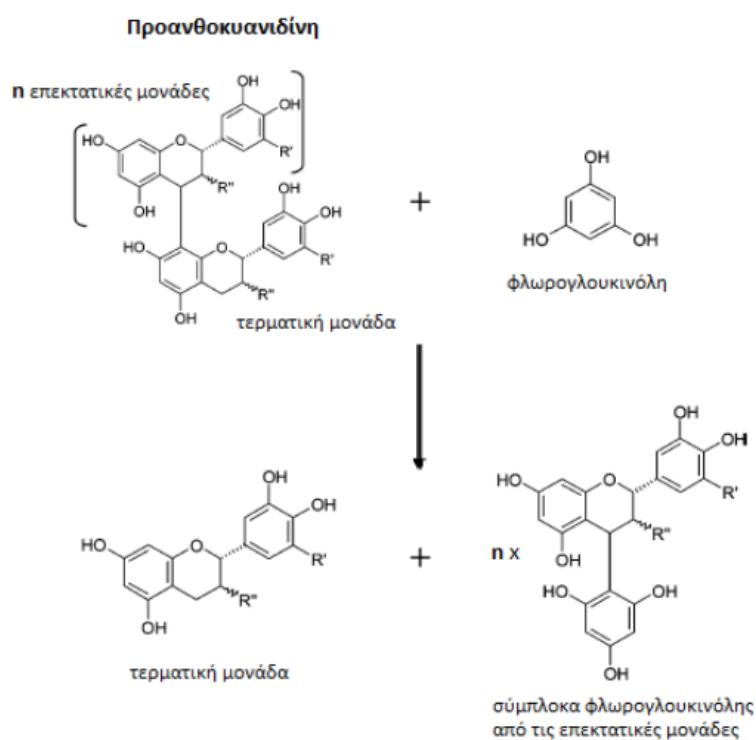


Εικόνα 8 Τερματική και επεκτατική υπομονάδα της δομής των προανθοκυανιδινών

Ποικίλουν σε μέγεθος, που κυμαίνεται από διμερή έως πολυμερή με περισσότερες από 40 μονάδες (Downey et al., 2003; Kennedy & Jones, 2001; Teixeira et al., 2013) και ονομάζονται έτσι γιατί με θέρμανση σε όξινο περιβάλλον απελευθερώνουν ανθοκυανιδίνες. Οι προανθοκυανιδίνες βρίσκονται στο φλοιό και στα γίγαρτα των σταφυλιών και επηρεάζουν άμεσα τον οργανοληπτικό χαρακτήρα των οίνων, αφού είναι υπεύθυνες για τη σταθεροποίηση του χρώματος και συμμετέχουν στην στυπτικότητα και την πικράδα (Chira et al., 2009; S Kallithraka et al., 1998; Sun et al., 2013)

1.4.3.2 Προσδιορισμός της δομής των προανθοκυανιδινών (mDP)

Για να χαρακτηριστεί η δομή των προανθοκυανιδινών, απαιτείται η εκχύλιση τους από τις ράγες με τη χρήση συγκεκριμένων διαλυτών και στη συνέχεια διαχωρισμός τους ανάλογα με το μοριακό τους μέγεθος. Η απομόνωση και ταυτοποίηση του κάθε μορίου είναι δύσκολη και επίπονη διαδικασία, για το λόγο αυτό γίνεται έμμεσα ο χαρακτηρισμός τους μετά από διάσπαση των μορίων. Η επεξεργασία των συμπυκνωμένων ταννινών με οξύ, υπό την παρουσία ενός πυρηνόφιλου αντιδραστήριου, όπως η φλωρογλουσινόλη (Chira et al., 2009; Kennedy & Jones, 2001; Monagas et al., 2003; Prieur et al., 1994), επιτρέπει τον προσδιορισμό του προφίλ των υπομονάδων, τερματικών και επεκτατικών, που συμμετέχουν στη δομή των πολυμερών προανθοκυανιδινών.



Εικόνα 9 Αντίδρασης μίας προανθοκυανιδίνης με τη φλωρογλουκινόλη. Όπου $R'=H$, $R''=OH$ προκυανιδίνη και όπου $R'=OH$, $R''=OH$ προδελφινιδίνη

Ο μέσος αριθμός των φαβαν-3-ολών μονομερών στη δομή μιας προανθοκυανιδίνης, των οποίων ο δεσμός μεταξύ των μορίων είναι $C4 \rightarrow C8$ (ή λιγότερο συχνά $C4 \rightarrow C6$) αναφέρεται ως μέσος βαθμός πολυμερισμού. Με την ανάλυση των επεξεργασμένων δειγμάτων με υγρή χρωματογραφία υψηλής ανάλυσης (HPLC) μπορεί να γίνει ο υπολογισμός του μέσου όρου της μοριακής μάζας των πολυμερισμένων φαινολικών ενώσεων του οίνου, ο οποίος εκφράζεται ως μέσος βαθμός πολυμερισμού (mDP).

Οι τιμές του mDP και η δομή των προανθοκυανιδινών επηρεάζονται από την ποικιλία και το βαθμό ωρίμανσης των ραγών (Obreque-Slier et al. (2010)). Εξίσου σημαντική στη σύνθεση και τη δομή των ταννινών είναι και η προέλευση τους. Οι ταννίνες των γιγάρτων είναι μικρότερες, με χαμηλότερο mDP και υψηλότερο ποσοστό των υπομονάδων που φέρουν εστέρες του γαλλικού οξέος, και το οποίο εκφράζεται ως βαθμός εστεροποίησης (% G), ενώ οι ταννίνες των φλοιών είναι γενικά μεγαλύτερες με υψηλότερο mDP (Chira et al., 2009; Kennedy & Jones, 2001; Prieur et al., 1994).

1.4.3.3 Οργανοληπτικές ιδιότητες των προανθοκυανιδινών

Οι προανθοκυανιδίνες είναι υπεύθυνες για τη στυπτικότητα και την πικράδα των οίνων. Η πικρή τους γεύση μπορεί να οφείλεται σε ένα ευρύ φάσμα χημικών ενώσεων, όπως τα άλατα των βαρέων μετάλλων, την αιθανόλη, τα αμινοξέα, τα πεπτίδια, κυρίως όμως οφείλεται στις φαινολικές ενώσεις. Συγκεκριμένα, οφείλεται στις μονομερείς και ολιγομερείς προκυανιδίνες, με τις μονομερείς να είναι πιο πικρές από τις πολυμερείς, και με τη μέγιστη ένταση της πικράδας να αντιστοιχεί σε τετραμερείς προανθοκυανιδίνες (Chira et al., 2009; Sun et al., 2011)

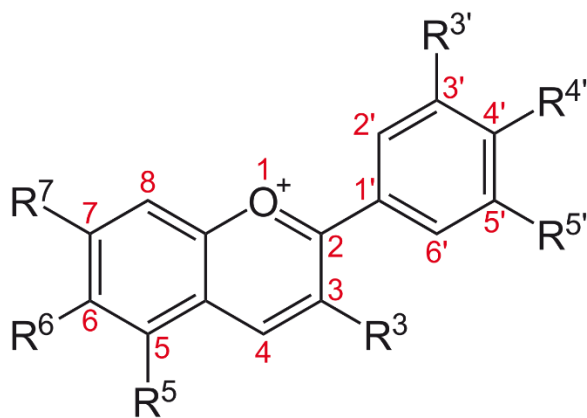
Η στυπτικότητα σύμφωνα με έρευνες που έχουν γίνει επηρεάζεται από τη συγκέντρωση, το μοριακό μέγεθος, το βαθμό εστεροποίησης των προανθοκυανιδινών με γαλλικό οξύ και τη δομή των προανθοκυανιδινών (Brossaud, Cheynier, & Noble, 2001; Chira et al., 2015; Cosme, Ricardo-Da-Silva, & Laureano, 2009; Curko et al., 2014). Ο πολυμερισμός των προανθοκυανιδινών προάγει την δημιουργία μορίων με μεγαλύτερη ικανότητα δέσμευσης από τις πρωτεΐνες και έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του στυπτικού τους χαρακτήρα (Chira et al., 2009). Η ένταση της στυπτικότητας αυξάνεται με το μοριακό μέγεθος τουλάχιστον έως ένα βαθμό (DP = 6) και στη συνέχεια μειώνεται (Brossaud et al., 2001; Chira et al., 2009; Sun et al., 2013). Η μείωση αυτή μπορεί να οφείλεται είτε στη μείωση της διαλυτότητας των μορίων, είτε στη αδυναμία δέσμευσης τους από τις πρωτεΐνες λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης, μετά την υπερβολική αύξηση του όγκου τους (Ribereau-Gayon, et al., 2006; Sun et al., 2013). Επιπλέον, η εστεροποίηση των προανθοκυανιδινών έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει τις αλληλεπιδράσεις τους με διάφορες πρωτεΐνες, γεγονός που δύναται να αυξήσει την αίσθηση της στυπτικότητας (Ricardo-da-silva, Cheynier, et al., 1991). Τέλος, η δομή τους και τα ποσοστά συμμετοχής των τερματικών και επεκτατικών υπομονάδων των προανθοκυανιδινών, είναι σημαντικά καθώς επηρεάζουν τη σύνδεση μεταξύ των πρωτεϊνών και των δραστικών θέσεων τους (Rinaldi, et al., 2014).

Αντιθέτως, οι οργανοληπτικές ιδιότητες των ταννινών φαίνεται να είναι ανεξάρτητες της προέλευσής τους από τα διάφορα μέρη της ράγας. Οι προανθοκυανιδίνες των γιγάρτων και των φλοιών βρέθηκαν να είναι εξίσου στυπτικές όταν δοκιμάστηκαν στην ίδια συγκέντρωση σε οίνο ή ρυθμιστικό μέσο, παρά τις μεγάλες διαφορές στη δομή τους, συμπεραίνοντας ότι οι μικρού μοριακού βάρους ταννίνες των γιγάρτων ήταν το ίδιο στυπτικές με τις πολυμερείς ταννίνες των φλοιών. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στον αυξημένο βαθμό εστεροποίησης με γαλλικό οξύ των ταννινών των γιγάρτων ο οποίος αυξάνει την στυπτικότητα όπως εξάλλου και ο μεγαλύτερος βαθμός πολυμερισμού των φλοιών. Ωστόσο, στην ίδια μελέτη όταν δοκιμάστηκαν σε πιο όξινο διάλυμα οι προανθοκυανιδίνες των γιγάρτων εμφάνισαν μεγαλύτερη πικράδα σε σχέση με των φλοιών. Παράλληλα, τα εκχυλίσματα οίνων τα οποία χαρακτηρίστηκαν από μέσες τιμές mDP ήταν λιγότερο στυπτικά σε σχέση με τα εκχυλίσματα γιγάρτων και φλοιών. Η στυπτικότητα και η πικράδα των προανθοκυανιδινών σχετίζεται όχι μόνο με τη χημική δομή και τη συγκέντρωσή τους, αλλά και με άλλες παραμέτρους, όπως η περιεκτικότητα σε αιθανόλη και το pH του οίνου (αύξηση της περιεκτικότητας σε αιθανόλη και του pH μειώνουν την αίσθηση της στυφής γεύσης). Επίσης, η παρουσία των ανθοκυανών φαίνεται να αυξάνει τη στυπτικότητα, αφήνοντας ανεπηρέαστη την πικρή γεύση η οποία συσχετίστηκε εντονότερα με την οξύτητα του οίνου (Brossaud et al., 2001).

1.4.3.4 Ανθοκυάνες

Οι ανθοκυάνες είναι φυσικές χρωστικές ενώσεις και ταυτόχρονα οι πιο σημαντικές χρωστικές των φυτών. Υπάρχει τεράστια ποικιλία των ανθοκυανών στη φύση καθώς συναντώνται σε 27 οικογένειες φυτών ενώ υπάρχουν αναφορές για περισσότερες από 500 διαφορετικές ανθοκυάνες και 23 ανθοκυανιδίνες (Castañeda-ovando et al., 2009).

Η βασική δομή των ανθοκυανών είναι η ανθοκυανιδίνη. Οι ανθοκυανιδίνες (ή άγλυκα) αποτελούνται από έναν αρωματικό δακτύλιο [A] συνδεδεμένο με έναν ετεροκυκλικό δακτύλιο [C] που περιέχει οξυγόνο, ο οποίος με τη σειρά του είναι συνδεδεμένος με ένα δεσμό C-C σε ένα τρίτο αρωματικό δακτύλιο [B] (Castañeda-ovando et al., 2009; Teixeira et al., 2013). Όταν οι ανθοκυανιδίνες είναι στη γλυκοσιλιωμένη μορφή (σύνδεση με ένα μόριο σακχάρου), τότε ονομάζονται ανθοκυάνες και είναι πιο σταθερές σε σχέση με τα άγλυκα μόρια.



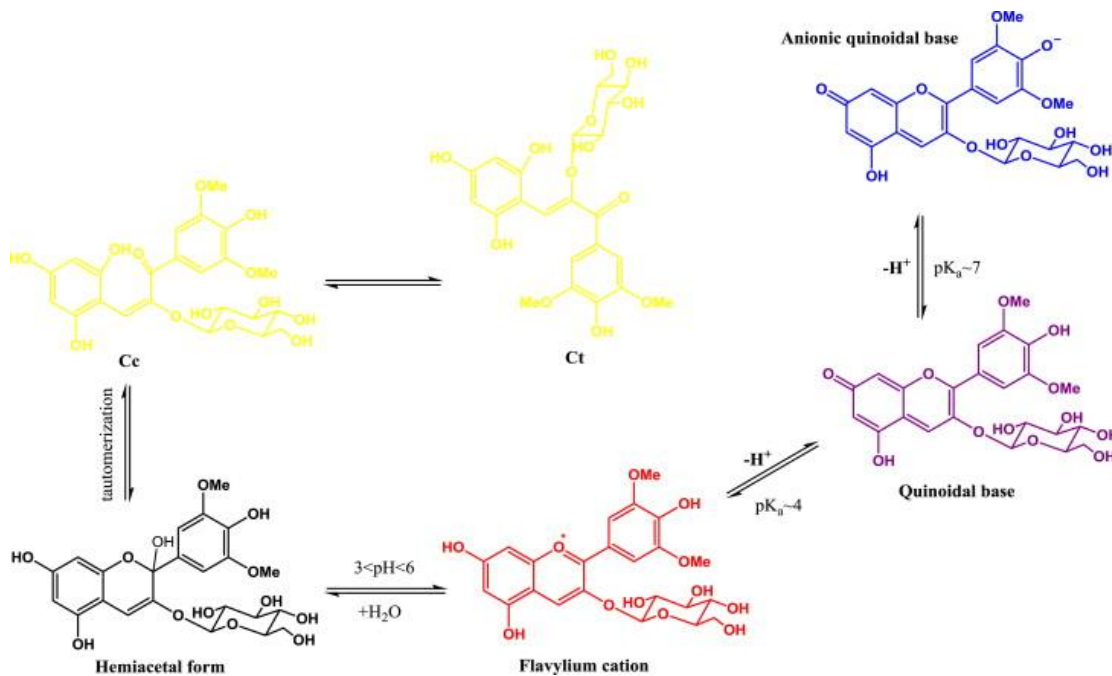
Εικόνα 10 Γενική δομή ανθοκυανών

Τα πιο κοινά παράγωγα που συναντώνται στις ποικιλίες *V. Vinifera* είναι οι μονογλυκοζίτες των ανθοκυανιδινών και συγκεκριμένα της κυανιδίνης (Cy), της δελφινιδίνης (Dlp), της πετουνιδίνης (Pt), της παιονιδίνης (Pn) και της μαλβιδίνης (Mlv) (Castañeda-ovando et al., 2009; Stamatina Kallithraka, Mohdaly, Makris, & Kefalas, 2005), με το προφίλ των ανθοκυανών στα σταφύλια να είναι χαρακτηριστικό της κάθε ποικιλίας (Makris, Kallithraka, & Mamalos, 2006). Οι ποικιλίες *V. Vinifera* περιέχουν μόνο τους μονογλυκοζίτες των ανθοκυανιδινών, ενώ στις ποικιλίες *V. labrusca* και *V. rotundifolia* έχουν ανιχνευτεί εκτός από μονογλυκοζίτες και διγλυκοζίτες των ανθοκυανών.

Το είδος και οι συγκεντρώσεις των διάφορων ανθοκυανών στους φλοιούς των σταφυλιών καθορίζουν το χρώμα και την ποιότητα των παραγόμενων οίνων. Στις ανθοκυάνες οφείλονται οι αποχρώσεις μπλε, μοβ, κόκκινο και ενδιάμεσα χρώματα, και υφίστανται ριζικές αλλαγές κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του οίνου. Το περιεχόμενο των ελεύθερων ανθοκυανών μειώνεται σταδιακά με την ωρίμανση του οίνου και οφείλεται στην συνένωση με άλλα μόρια που έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία πιο σταθερών χρωστικών (Castañeda-ovando et al., 2009; Teixeira et al., 2013).

Οι ανθοκυάνες μπορούν να βρεθούν σε διαφορετικές χημικές μορφές μέσα σε ένα διάλυμα που εξαρτώνται από το pH του (Castañeda-ovando et al., 2009; Kennedy & Waterhouse, 2000). Σε pH <2, το κατιόν του φλαβυλίου με ερυθρό χρώμα είναι η κυρίαρχη μορφή και συμβάλλει στις μωβ και ερυθρές αποχρώσεις του οίνου. Σε τιμές pH μεταξύ 2 και 4, η άνυδρη βάση της κινόνης με μπλε χρώμα είναι η κυρίαρχη μορφή. Σε τιμές pH μεταξύ 5 και 6 εμφανίζεται η ψευδοβάση της καρβινόλης (άχρωμη) και η χαλκόνη (ανοιχτό κίτρινο χρώμα), αντιστοίχως. Σε τιμές pH > 7, οι ανθοκυάνες αποικοδομούνται ανάλογα με τους

υποκαταστάτες του Β δακτυλίου τους. Στο pH του οίνου υπάρχει μια ισορροπία μεταξύ των διαφόρων μορφών και οι τέσσερις δομικές μορφές των ανθοκυανών συνυπάρχουν : κατιόντα του φλαβυλίου με ερυθρό χρώμα (A⁺), άνυδρες βάσεις, χρώματος ιώδους (AO), άχρωμες ψευδοβάσεις (AOH), χαλκόνες, πολύ ανοιχτού κίτρινου χρώματος (C).



Εικόνα 11 Διαφορετικές μορφές ανθοκυανών ανάλογα με το pH του διαλύματος

1.4.4 Αντιοξειδωτική Ικανότητα

Η αντιοξειδωτική δράση των ερυθρών οίνων έχει πλέον τεκμηριωθεί ότι οφείλεται στις φαινολικές ενώσεις που εμπεριέχουν, και θεωρούνται ισχυρά αντιοξειδωτικά. Μελέτες έχουν καταλήξει στη θετική συσχέτιση της περιεκτικότητας τους σε ολικά φαινολικά και της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας (Leeuw, et al., 2014).

Ο φυσιολογικός ρόλος των αντιοξειδωτικών, είναι η αποφυγή της βλάβης των κυτταρικών συστατικών. Τα αντιοξειδωτικά είναι ενώσεις που μπορούν να καθυστερήσουν ή να αναστείλουν την οξείδωση των λιπιδίων ή άλλων μορίων με αναστολή της έναρξης ή εξάπλωσης αλυσιδωτών οξειδωτικών αντιδράσεων.

Η αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών ενώσεων οφείλεται κυρίως στις οξειδοαναγωγικές ιδιότητές τους και μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην δέσμευση και εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών. Η αντιοξειδωτική δράση των φλαβονοειδών οφείλεται περισσότερο στο είδος και τον αριθμό των υποκατάστατων τους

παρά στο βασικό σκελετό τους. Η πιο σημαντική παράμετρος αντιοξειδωτικής δράσης είναι ο αριθμός των ελεύθερων υδροξυλίων. Ειδικά τα υδροξύλια του Β δακτυλίου είναι αυτά που συμμετέχουν κυρίως στη δράση των φλαβονοειδών (Pannala, et. al., 2001; Rice-Evans, Miller, & Paganga, 1996) γιατί μπορούν να λειτουργήσουν ως δότες ριζών υδρογόνου σε ελεύθερες ρίζες. Ο Α δακτύλιος δεν παίζει σημαντικό ρόλο στη συνολική αντιοξειδωτική δράση. Όσον αφορά το δακτύλιο C, η ύπαρξη διπλού δεσμού και υδροξυλίου στην 3-θέση αυξάνουν σημαντικά την αντιοξειδωτική δράση, ενώ μεθυλίωση ή γλυκοζυλίωση του ίδιου υδροξυλίου την αναστέλλουν. Αν ο C δακτύλιος είναι ανοικτός ή κλειστός δεν επηρεάζει τη συνολική δράση γιατί και οι χαλκόνες που έχουν ανοικτό C δακτύλιο έχουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, (Rice-Evans et al., 1996). Η δομή και ο μέσος βαθμός πολυμερισμού (mDP) επηρεάζει την αντιοξειδωτική ικανότητα των φλαβαν-3-ολών (Ricardo-da-silva, et al., 1991). Αντιοξειδωτική δράση μπορούν να παρουσιάσουν και οι ανθοκυάνες λόγω του άγλυκου μέρους του μορίου τους, χωρίς ωστόσο να θεωρούνται τα ισχυρότερα αντιοξειδωτικά (Rice-Evans et al., 1996). Επίσης, ο αριθμός των υποκατάστατων στην θέση 3 του μορίου, ο βαθμός οξείδωσης του C δακτυλίου, ο βαθμός υδροξυλίωσης και η εστεροποίηση με φαινολικά οξέα, θεωρούνται καθοριστικοί παράγοντες για την εκδήλωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των ανθοκυανών (Kahkoken & Heinonen, 2003). Ωστόσο, αναφέρεται ότι η γλυκοζυλίωση της θέσης 3 των ανθοκυανιδινών μειώνει την αντιοξειδωτική δράση του μορίου (Rice-Evans et al., 1996).

1.4.5 Μικροβιακός πληθυσμός

Η συσχέτιση μικροοργανισμών με τη ζύμωση αλκοολούχων ποτών χρονολογείται από τις βιβλικές εποχές, ενώ η μικροβιολογία του οίνου επεξηγήθηκε το 1850 από το Louis Pasteur, ο οποίος παρατήρησε τόσο τη δράση ζυμών σε μούστο, όσο και την πιθανή αλλοίωση του από συγκεκριμένα βακτήρια (G H Fleet, 1998). Οι μικροοργανισμοί που συναντώνται στην οινοποίηση, και η μεταξύ τους αλληλεπίδραση, μπορεί να επηρεάσει την ποιότητα του τελικού προϊόντος είτε θετικά είτε αρνητικά, καθορίζοντας τελικά και το οικονομικό όφελος από την παραγωγή οίνων. Οι μικροοργανισμοί που έχουν αρνητική επίδραση ονομάζονται αλλοιογόνοι και μπορούν να προσδώσουν δυσάρεστες οσμές και να προκαλέσουν χρωματικές μεταβολές. Στην κατηγορία αυτή μπορούν να ενταχθούν ακόμα και μικροοργανισμοί που είναι γενικά επιθυμητοί, όταν αναπτυχθούν σε λάθος τόπο και χρόνο.

Υπάρχουν τρία στάδια στα οποία μπορούν να εισέλθουν οι μικροοργανισμοί στη διαδικασία οινοποίησης και να επηρεάσουν την ποιότητα του τελικού προϊόντος. Το πρώτο

στάδιο αφορά την πρώτη ύλη. Τα σταφύλια βρίσκονται σε άμεση επαφή με τον εξοπλισμό του οινοποιείου, ο οποίος όταν δεν καθαρίζεται σωστά μπορεί να αποτελέσει πηγή αλλοιώσεων. Επίσης, τα σταφύλια που παραδίδονται σε ένα οινοποιείο δεν είναι όλα σε υγιή κατάσταση, γεγονός που επηρεάζει τη βιοποικιλότητα των μικροοργανισμών που υπάρχουν στο γλεύκος. Η μικροχλωρίδα εξαρτάται έμμεσα από εξωτερικές συνθήκες όπως η ποικιλία και η κατάσταση των σταφυλιών κατά τη συγκομιδή τους, η θερμοκρασία, οι βροχοπτώσεις, το έδαφος, και οι εφαρμοζόμενες αμπελουργικές πρακτικές.

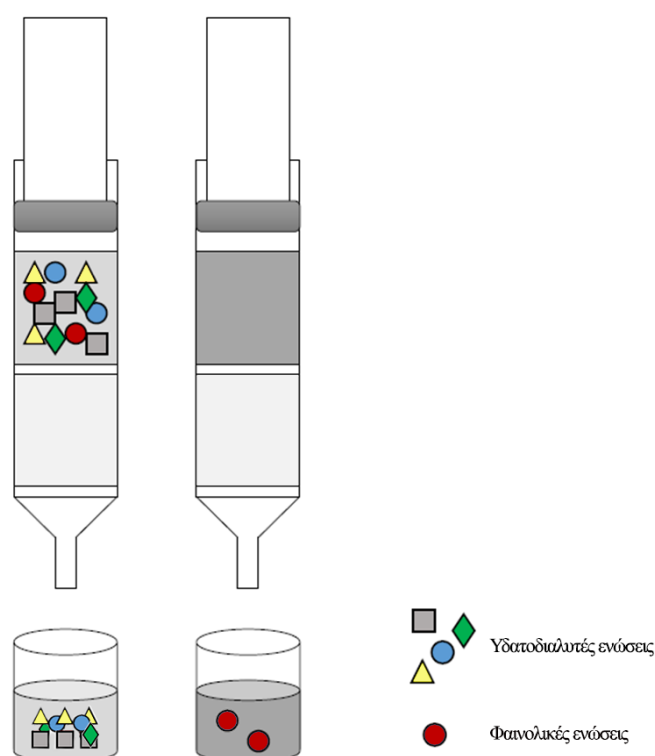
Το δεύτερο στάδιο αφορά τη αλκοολική ζύμωση. Η υψηλή περιεκτικότητα του γλεύκος σε σάκχαρα και οξέα και το χαμηλό pH, σε συνδυασμό με την προσθήκη SO₂ δρουν επιλεκτικά στην ανάπτυξη των ζυμών και των βακτηρίων κατά την αλκοολική ζύμωση. Η αύξηση των συγκεντρώσεων αιθανόλης καταστέλλει περαιτέρω την ανάπτυξη ορισμένων μυκήτων και βακτηρίων προστατεύοντας τη ζύμωση (G H Fleet, 1998). Ωστόσο, στις αυθόρμητες ζυμώσεις τα κυρίαρχα είδη ζυμών παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευαισθησία στην αιθανόλη, με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η δράση τους κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Έτσι, προκύπτουν αρνητικές μεταβολές στη σύσταση του οίνου. Αντίστοιχα αποτελέσματα μπορούν να προκύψουν όταν το pH του εν ζυμώσει οίνου είναι > 3.6. Στην περίπτωση αυτή ενισχύεται η ανάπτυξη οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB), ιδιαίτερα των *Lactobacillus*, *Leuconostoc* και *Pediococcus* spp., τα οποία στο στάδιο της AZ είναι ανεπιθύμητα (G H Fleet, 1998; Joyeux, Lafon-Ladourcade, & Ribereau-Gayon, 1984; Lafon-Ladourcade, Carre, & Ribereau-Gayon, 1983).

Τέλος, αρνητικές μεταβολές στη σύσταση των οίνων μπορούν να προκληθούν, κατά την παραμονή τους σε φιάλες ή/ και σε δρύινα βαρέλια. Σε αυτή τη φάση, η καλή εξυγίανση της κάβας, ο αποκλεισμός του οξυγόνου και η σωστή δοσολογία των αντιμικροβιακών ουσιών αποτελούν τους κρίσιμους παράγοντες για την προστασία των οίνων (Boulton, Singleton, Bisson, & Kunkel, 1996; G H Fleet, 1998). Προσβολή τους από μύκητες και είδη των *Actinomyces* και *Streptomyces* που υπάρχουν στους φελλούς ή στα δρύινα βαρέλια είναι επίσης πιθανή (Graham H Fleet, 2003).

1.5 Αναλυτικές τεχνικές

1.5.1 Εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid phase extraction, SPE)

Το ενδιάμεσο και βασικότερο στάδιο για τον προσδιορισμό του μέσου βαθμού πολυμερισμού σε δείγματα οίνου, πριν από τη χρωματογραφική ανάλυση, περιλαμβάνει την επιλεκτική απομόνωση των φαινολικών συστατικών με SPE. Η εν λόγω τεχνική μπορεί να εφαρμοστεί κατευθείαν στο ακατέργαστο οινικό δείγμα. Η SPE ουσιαστικά εκμεταλλεύεται διαφορές στην πολικότητα μεταξύ των παρεμβαλλόμενων ενώσεων και των αναλυτών-στόχων. Έτσι και στην προκειμένη περίπτωση η απομόνωση των φαινολικών επιτυγχάνεται λόγω της διαφορετικής τους πολικότητας από τις υπόλοιπες υδατοδιαλυτές ενώσεις της μήτρας. Σε πρώτο στάδιο, οι υδατοδιαλυτές ενώσεις απομακρύνονται με έκπλυση της στήλης με απεσταγμένο νερό, και τα φαινολικά ως οι λιγότερο πολικές ενώσεις, κατακρατούνται από την άπολη στατική φάση (C18) καθ' όλη τη διάρκεια της ανάλυσης με SPE. Η έκλυση των φαινολικών ενώσεων επιτυγχάνεται με διαλύτη μεθανόλη.

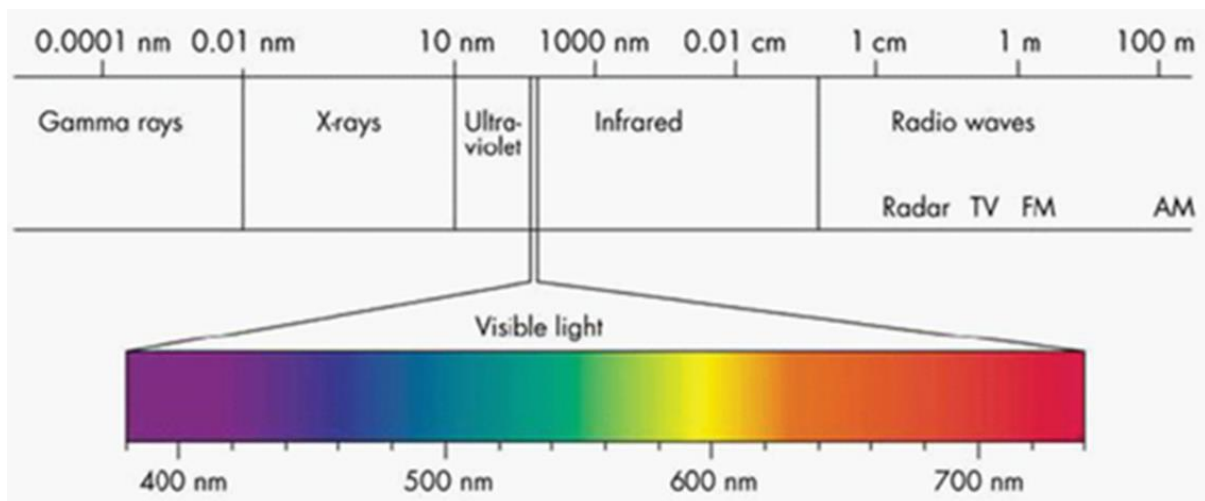


Εικόνα 12 Σχηματική απεικόνιση της πορείας διαχωρισμού των φαινολικών ενώσεων με SPE

1.5.2 Φασματοφωτομετρία Ορατού- Υπεριώδους

1.5.2.1 Θεωρητικό Υπόβαθρο

Η Φασματοφωτομετρία Ορατού- Υπεριώδους είναι μια φασματοσκοπική τεχνική που βασίζεται στην απορρόφηση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στην περιοχή του υπεριώδους- ορατού. Η περιοχή υπεριώδους- ορατού καλύπτει τα μήκη κύματος από 200-700 nm (Εικόνα 8).



Εικόνα 13 Περιοχή UV-Vis ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας

Η συγκεκριμένη τεχνική χρησιμοποιείται για ποιοτική ανάλυση όπως είναι ο προσδιορισμός λειτουργικών ομάδων και ακαθαρσιών. Επίσης αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα εργαλεία για ποσοτική ανάλυση.

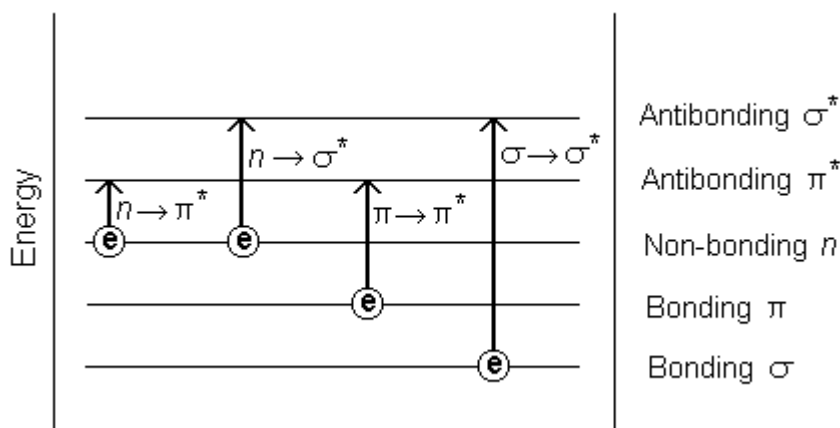
Γενικά οι φασματοφωτομετρικές μέθοδοι, χαρακτηρίζονται από χαμηλά όρια ανίχνευσης της τάξης των 10^{-4} έως 10^{-5} M, καλή ακρίβεια και μέτρια έως μεγάλη εκλεκτικότητα. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε εύρος εφαρμογών και η συλλογή των αποτελεσμάτων είναι αρκετά εύκολη.

Η φασματοσκοπία μοριακής απορρόφησης, βασίζεται στην απόσβεση ενός παλμού φωτός, όταν αυτός διέλθει από το δείγμα ή μετά από ανάκλαση του από την επιφάνεια του δείγματος. Όσο μεγαλύτερη είναι η απορρόφηση της ακτινοβολίας από το δείγμα, τόσο μεγαλύτερη είναι η απόσβεση του παλμού. Η απορρόφηση είναι ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσης του δείγματος η οποία μπορεί να υπολογιστεί με βοήθεια του νόμου του Beer-Lambert (Skoog, Holler, & Nieman, 2005).

Νόμος Beer- Lambert: $A = -\log T = \log P_0/P = \epsilon bc$

Το P_0 συμβολίζει την ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας στην επιφάνεια της κυψελίδας που περιέχει το δείγμα, ενώ το P συμβολίζει την ένταση της ακτινοβολίας που εξέρχεται από την κυψελίδα. Με ϵ συμβολίζεται ο μοριακός συντελεστής απόσβεσης, με b το μήκος της κυψελίδας και με το c η συγκέντρωση του δείγματος. Συνήθως για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του δείγματος, επιλέγεται η κορυφή σε μήκος κύματος με μέγιστη απορρόφηση (Kumar, 2006).

Τα φάσματα απορρόφησης αποτελούν τα γραφήματα απορρόφησης συναρτήσει του μήκους κύματος (σε nm). Από τα φάσματα αυτά, μπορούν να εξαχθούν πληροφορίες σχετικά με τις χαρακτηριστικές λειτουργικές ομάδες των προς ανάλυση ενώσεων. Όταν ενώσεις απορροφήσουν ακτινοβολία στην περιοχή του ορατού- υπεριώδους, διεγείρονται τα ηλεκτρόνια της εξωτερικής τους στοιβάδας. Έτσι, τα ηλεκτρόνια αυτά μεταβαίνουν από θεμελιώδη σε μια διεγερμένη κατάσταση. Η απαιτούμενη για την διέγερση ενέργεια, είναι ανάλογη της ενεργειακής διαφοράς μεταξύ των δύο καταστάσεων. Οι μεταπτώσεις που παρατηρούνται, μπορεί να οφείλονται είτε σε μεταπτώσεις μεταξύ π , σ και n ηλεκτρονίων, είτε σε μεταπτώσεις με ηλεκτρόνια μεταφοράς φορτίου (Εικόνα 9). Ωστόσο, πιθανές είναι και ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις μεταξύ d και f ηλεκτρονίων.



Εικόνα 14 Ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις μεταξύ π , σ , n και π^* ηλεκτρονίων

Με την τεχνική της UV-Vis φασματοσκοπίας, μπορούν να μελετηθούν οι μεταπτώσεις μεταξύ n ή π ηλεκτρονίων στην π^* διεγερμένη κατάσταση των οργανικών ενώσεων. Οι συγκεκριμένες μεταπτώσεις πραγματοποιούνται στη φασματική περιοχή που καλύπτει η συγκεκριμένη τεχνική, εκμηδενίζοντας έτσι τις πειραματικές δυσκολίες μέτρησης. Οι

μεταπτώσεις αυτές, απαιτούν την ύπαρξη τουλάχιστον μιας ακόρεστης χαρακτηριστικής ομάδας στο μόριο της ένωσης, που να περιέχει τα π τροχιακά. Οι ομάδες αυτές ονομάζονται χρωμοφόρες και παραδείγματα, μπορούν να αποτελέσουν οι καρβονυλικές ομάδες ($-C=O$), οι νίτρο ($-NO_2$), οι άζο ($-N=N-$) ομάδες και πολλές άλλες. Με τη σύζευξη δύο ή περισσότερων χρωμοφόρων, σχηματίζεται μια καινούρια χρωμοφόρα ομάδα. Το φάσμα απορρόφησης της ομάδας αυτής, θα χαρακτηρίζεται από μετατόπιση κορυφών σε μεγαλύτερα μήκη κύματος και με μεγαλύτερη ένταση στη ζώνη απορρόφησης της (Βαλαβανίδης, 2006).

1.5.2.2 Οργανολογία

Κάθε όργανο απορρόφησης ορατού υπεριώδους αποτελείται από πέντε βασικά τμήματα : την πηγή ακτινοβολίας, τον επιλογέα μήκους κύματος , τον υποδοχέα του δείγματος , τον ανιχνευτή και τον επεξεργαστή σήματος. Τα τμήματα αυτά θα αναλυθούν στην συνέχεια.

Πηγή ακτινοβολίας

Η βασικότερη προδιαγραφή για της πηγές ακτινοβολίας είναι η σταθερή ισχύς τους σε όλο το εύρος κύματος που εξετάζεται. Σημαντικότερες πηγές αποτελούν η λυχνία υδρογόνου και δευτερίου και η λυχνία βολφραμίου. Οι λυχνίες υδρογόνου και δευτερίου, χρησιμοποιούνται για την παραγωγή υπεριώδους ακτινοβολίας. Η ακτινοβολία με αυτή τη λυχνία, παράγεται μετά από διάσπαση ενός διεγερμένου μοριακού είδους σε δύο ατομικά και ένα φωτόνιο με μήκος κύματος 160 nm έως 375 nm. Η λυχνία βολφραμίου χρησιμοποιείται για την παραγωγή ακτινοβολίας στην περιοχή του ορατού (350 nm-2500 nm). Είναι πιθανή και η χρήση λυχνίας βολφραμίου/αλογόνου που είναι αποτελεσματικότερη και σταθερότερη από τις απλές λυχνίες βολφραμίου.

Επιλογέας μήκους κύματος (Μονοχρωμάτορας)

Μονοχρωμάτορας είναι μια διάταξη που διαχωρίζει με μηχανικό τρόπο την ακτινοβολία στα επιμέρους μήκη κύματος και επιλέγει με μεγάλη ακρίβεια το μήκος κύματος που θα περάσει από το δείγμα. Η επιλογή του κατάλληλου μήκους κύματος είναι πολύ σημαντική, αφού από την αλληλεπίδραση της ακτινοβολίας με το δείγμα εξάγονται και οι αντίστοιχες πληροφορίες. Ο τρόπος λοιπόν με τον οποίο γίνεται ο διαχωρισμός της πολυχρωματικής ακτινοβολίας πραγματοποιείται με τον πάρα κάτω τρόπο. Η πολυχρωματική ακτινοβολία που παράγεται από την πηγή ακτινοβολίας, εισέρχεται στο μονοχρωμάτορα μέσα από μια

σχισμή εισόδου. Με την βοήθεια ενός κατευθυντήριου φακού ευθυγραμμίζεται και στη συνέχεια κτυπάει ένα στοιχείο εστίασης (π.χ. πρίσμα) υπό γωνία. Έτσι, η δέσμη χωρίζεται στα μήκη κύματος που την απαρτίζουν. Ανάλογα με το επιθυμητό μήκος κύματος, τοποθετείται το πρίσμα σε σχέση με τη σχισμή εξόδου. Αποτέλεσμα είναι η έξοδος δέσμης με μόνο ένα μήκος κύματος από το μονοχρωμάτορα.

Υποδοχέας δείγματος

Τόσο το δοχείο για το δείγμα όσο και το διάλυμα αναφοράς, πρέπει να είναι διαφανές έτσι ώστε η ακτινοβολία να περάσει μέσα από αυτά. Για το λόγο αυτό, οι κυβέττες του δείγματος για το ορατό φάσμα κατασκευάζονται από γυαλί. Στην περιοχή του υπεριώδους, το γυαλί δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί γιατί οι προσμίξεις του απορροφούν στην περιοχή αυτή. Λύση αποτελεί η χρήση κυψελίδων από κρυσταλλικό πυρίτιο ή χαλαζία (Gauglitz & Dihn, 2003).

Ανιχνευτής

Ο ανιχνευτής αναγνωρίζει μια ουσία με την παραγωγή ηλεκτρικού σήματος, για αυτό πρέπει να χαρακτηρίζεται από μεγάλη ευαισθησία και υψηλό λόγο σήματος προς θόρυβο. Ο διαχωρισμός τους γίνεται με βάση την απόκριση του σε φωτόνια ή σε θερμότητα. Ως ανιχνευτές απόκρισης σε φωτόνια χρησιμοποιούνται φωτολυχνίες, φωτοπολλαπλασιαστές και φωτοδιόδοι. Οι ανιχνευτές αυτοί χρησιμοποιούν ηλεκτρικό σήμα, με απελευθέρωση ηλεκτρονίων ή με μετακίνηση μη-αγώγιμων ηλεκτρονίων σε ζώνες αγωγιμότητας. Το ηλεκτρικό ρεύμα που παράγεται είναι ανάλογο της ισχύος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας.

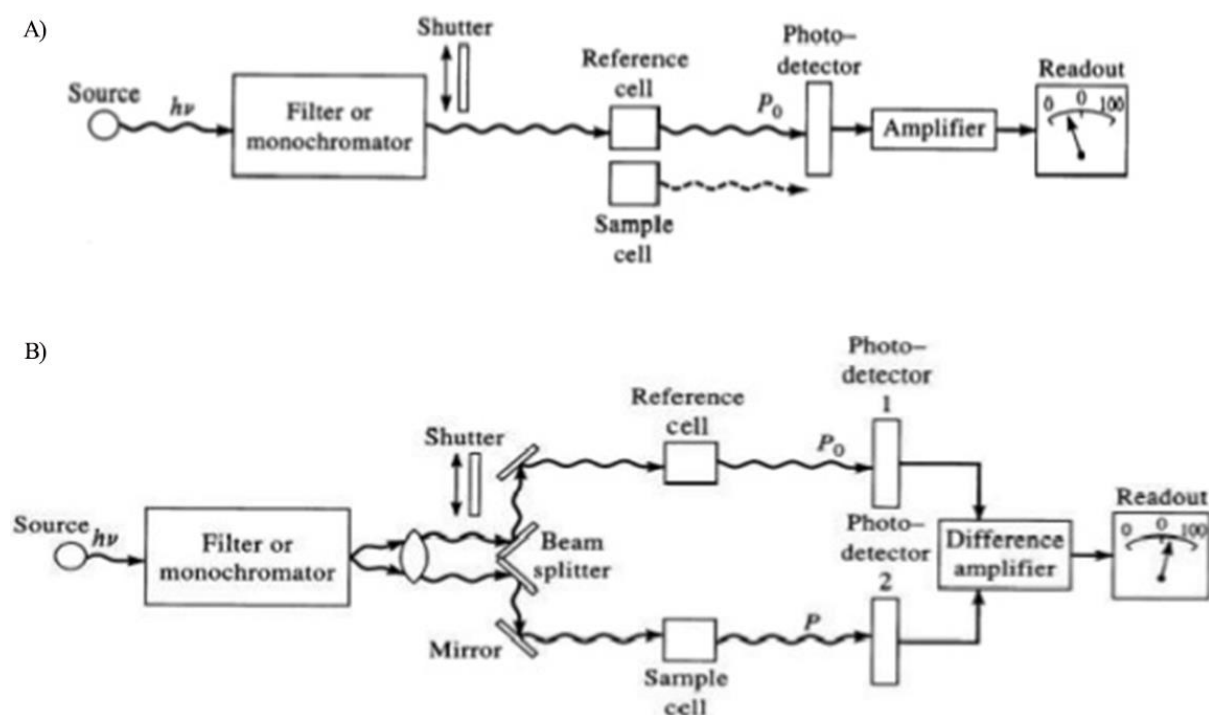
Επεξεργαστής σήματος

Οι επεξεργαστές σήματος ενισχύουν το ηλεκτρικό σήμα το οποίο παράγεται στο μεταλλάκτη. Μπορεί επίσης να εκτελέσει διάφορες μαθηματικές πράξεις στο ηλεκτρικό σήμα, όπως ολοκλήρωση και διαφόρηση.

Σε αυτή την ερευνητική μελέτη χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο UV-Vis Spectrophotometer V-530 Jasco το οποίο είναι διπλής δέσμης. Η διαφοροποίηση από τα φασματοφωτόμετρα απλής δέσμης είναι ο διαχωρισμός της ακτινοβολίας από την πηγή σε δύο δέσμες μέσω διαμοιραστή δέσμης. Η μια δέσμη διέρχεται μέσα από το δείγμα αναφοράς το οποίο περιέχει μόνο το διαλύτη του προς ανάλυση δείγματος. Η δεύτερη δέσμη διέρχεται μέσα από το δείγμα. Μερικές φορές οι δύο δέσμες επανενώνονται πριν φτάσουν στο

μονοχρώματα, ενώ σε άλλες περιπτώσεις χρησιμοποιούνται δύο μονοχρώματα (Skoog et al., 2005).

Ο ‘One analyser’ που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα ερευνητική μελέτη αποτελούσε ουσιαστικά και αυτός ένα φασματοφωτόμετρο απλής δέσμης, που χρησιμοποιεί σαν πηγή φωτός λυχνία αλογόνου και μονοχρώματα για 8 διαφορετικά μήκη κύματος (340 nm, 420 nm, 492 nm, 520 nm, 578 nm, 620 nm, 650 nm και 700 nm). Πρόσθετη ιδιότητα του είναι η ύπαρξη θέσεων για επώαση δειγμάτων (25 °C- 45 °C) μέσω στοιχείων Peltier.



Εικόνα 15 Διάταξη φασματοφωτομέτρου απλής (A) και διπλής (B) δέσμης

1.5.3 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

1.5.3.1 Θεωρητικό υπόβαθρο

Ο Ρώσος βοτανολόγος Mikhail Tswett, στις αρχές του εικοστού αιώνα, χρησιμοποίησε για πρώτη φορά τον όρο χρωματογραφία για να περιγράψει το διαχωρισμό των φυτικών χρωστικών που επιτεύχθηκε με διαβίβαση διαλύματός τους μέσω υάλινου σωλήνα, ο οποίος ήταν γεμάτος με εξαιρετικά λεπτό ανθρακικό ασβέστιο. Οι διαχωριζόμενες ουσίες εμφανίζονταν ως χρωματιστές ζώνες στη στήλη και αυτός ήταν ο λόγος για τον οποίο ο Tswett επέλεξε (από την Ελληνική γλώσσα) το χαρακτηριστικό αυτό όνομα για την τεχνική.

Η HPLC είναι μια κατάλληλη τεχνική για τον ακριβή και επαναλήψιμο προσδιορισμό ενός μεγάλου φάσματος χημικών ενώσεων. Αποτελεί παραλλαγή της κλασικής χρωματογραφίας στήλης και η ταχύτατη εδραίωση της στο χώρο της ενόργανης ανάλυσης βασίστηκε κατά κύριο λόγο στην εξέλιξη των υλικών πλήρωσης της στήλης. Το κύριο πεδίο εφαρμογών της HPLC είναι η ανάλυση φαρμάκων, τροφίμων και περιβαλλοντικών δειγμάτων (McMurry, 2005).

Ο διαχωρισμός των συστατικών στο συγκεκριμένο χρωματογραφικό σύστημα είναι αποτέλεσμα της συνδυαστικής δράσης μιας κινητής και μιας στατικής φάσης. Σε πρώτο στάδιο, το προς ανάλυση δείγμα εισάγεται στη χρωματογραφική στήλη όπου βρίσκεται η στατική φάση. Τα συστατικά του δείγματος συμπαρασύρονται από την κινητή φάση, η οποία προωθείται στη στήλη με τη βοήθεια μιας αντλίας υψηλής πίεσης και κάτω από σωστά επιλεγμένες πειραματικές συνθήκες μετακινούνται διαμέσου της φάσης με διαφορετικές ταχύτητες και διαχωρίζονται.

Τα συστατικά, τα οποία εκλύονται από το άκρο της χρωματογραφικής στήλης, εισέρχονται στον κατάλληλο ανιχνευτή και τα σήματα καταγράφονται ως συνάρτηση του χρόνου, δίνοντας ένα διάγραμμα με μια σειρά κορυφών, το λεγόμενο χρωματογράφημα. Οι θέσεις των κορυφών ως προς τον άξονα του χρόνου εξυπηρετούν την ταυτοποίηση των συστατικών του δείγματος και το εμβαδόν κάθε κορυφής αποτελεί το ποσοτικό τους μέτρο (Skoog et al., 2005).

1.5.3.2 Οργανολογία

Η οργανολογία ενός σύγχρονου συστήματος HPLC παρουσιάζεται στην Εικόνα 12.. Αποτελείται κυρίως από το σύστημα εισαγωγής του δείγματος, την αντλία, τη χρωματογραφική στήλη, τον ανιχνευτή και το σύστημα συλλογής και καταγραφής αποτελεσμάτων.

Αντλία

Αποτελεί το βασικό τμήμα του χρωματογραφικού συστήματος και είναι υπεύθυνη για τη διέλευση του διαλύτη μέσα από την στήλη. Η αντλία απαιτείται να παρέχει με σταθερή ροή την κινητή φάση ώστε να διασφαλιστεί η αναπαραγωγιμότητα και η ακρίβεια της μεθόδου. Οι δυο εφαρμοζόμενες τεχνικές ανάλυσης είναι η ισοκρατική έκλυση (isocratic elution), στην οποία η κινητή φάση έχει σταθερή σύσταση καθ'όλη την ανάλυση, και η βαθμιδωτή

έκλυση (gradient elution), στην οποία η κινητή φάση μεταβάλλεται βαθμιαία, ή κατά τακτά χρονικά διαστήματα με βάση προγραμματισμό. Η βαθμιδωτή έκλυση εφαρμόζεται συνήθως σε πολύπλοκα δείγματα που περιέχουν πολλά συστατικά, με σκοπό την επίτευξη καλύτερου και γρηγορότερου διαχωρισμού.

Σύστημα εισαγωγής του δείγματος

Είναι υπεύθυνο για την εισαγωγή του δείγματος στο 'ρεύμα ροής' της κινητής φάσης προτού αυτή εισέλθει στη στήλη. Τα σύγχρονα συστήματα HPLC είναι εξοπλισμένα με αυτόματους δειγματολήπτες που διαθέτουν ειδικά διαμορφωμένο δισκίο, χωρητικότητας μέχρι και 100 δειγμάτων, επιτρέποντας προγραμματισμένες εγχύσεις σε διάφορους όγκους.

Στήλη

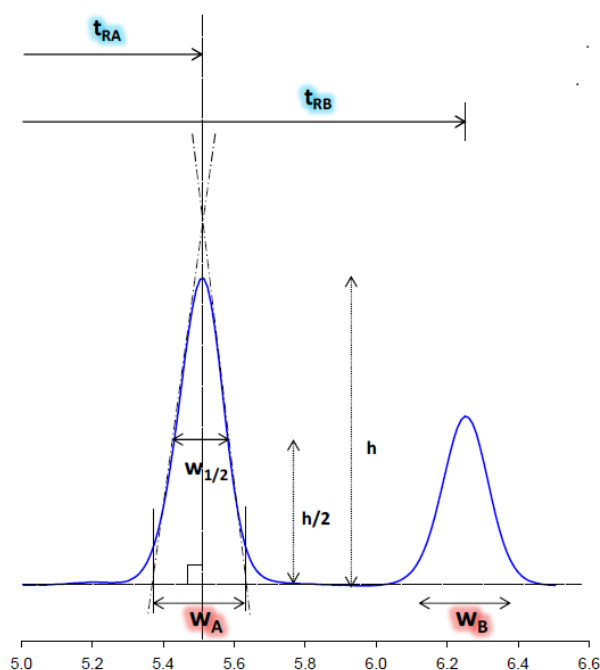
Η στήλη αποτελεί τον πυρήνα κάθε χρωματογραφικού συστήματος. Πολλές στήλες είναι εμπορικά διαθέσιμες σε διαφορετικά μήκη, μεγέθη και υλικά πλήρωσης. Η χρήση του σωστού συνδυασμού του μήκους και του υλικού πλήρωσης σε συσχέτιση με την κατάλληλη κινητή φάση μπορεί να βοηθήσει στον πιο αποτελεσματικό διαχωρισμό των ενώσεων του μείγματος. Σε γενικές γραμμές, οι στήλες LC είναι αρκετά ανθεκτικές, με μεγάλο χρόνο ζωής, εκτός εάν χρησιμοποιούνται με κάποιο τρόπο που είναι εγγενώς καταστρεπτικός, όπως για παράδειγμα, με πολύ όξινα ή βασικά εκλύσματα ή με συνεχείς ενέσεις "βρώμικων" βιολογικών ή ακατέργαστων δειγμάτων (Kurić, 2004).

Σημαντική παράμετρος για μια στήλη είναι η διαχωριστική της ικανότητα, η οποία αποτελεί ουσιαστικά ποσοτικό μέτρο της ικανότητας της να διαχωρίσει δυο αναλύτες. Για ένα μίγμα με δυο ενώσεις A και B, η διαχωριστική ικανότητα μπορεί να οριστεί από την εξίσωση:

$$R_s = (2(t_{RB} - t_{RA})) / (W_A + W_B)$$

όπου $(t_R)_A$ και $(t_R)_B$ οι χρόνοι κατακράτησης των κορυφών A και B, αντίστοιχα και W_A και W_B , το εύρος της βάσης των κορυφών. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 11., για να υπολογιστεί το W , φέρονται δύο εφαπτόμενες στα σημεία καμψής της κορυφής και προεκτείνονται, έτσι ώστε, αυτές να τέμνονται ακριβώς στο t_R . Οι δύο εφαπτόμενες με τη γραμμή βάσης (baseline) σχηματίζουν ένα τρίγωνο, το οποίο αποτελεί το εύρος της βάσης, W . Διαχωριστική ικανότητα μεγαλύτερη από 1.5 αντιστοιχεί ουσιαστικά σε πλήρη

διαχωρισμό των δύο συστατικών, ενώ σε μικρότερες τιμές παρατηρείται αλληλεπικάλυψη των κορυφών (Ho, Stuart, & Prichard, 2003).



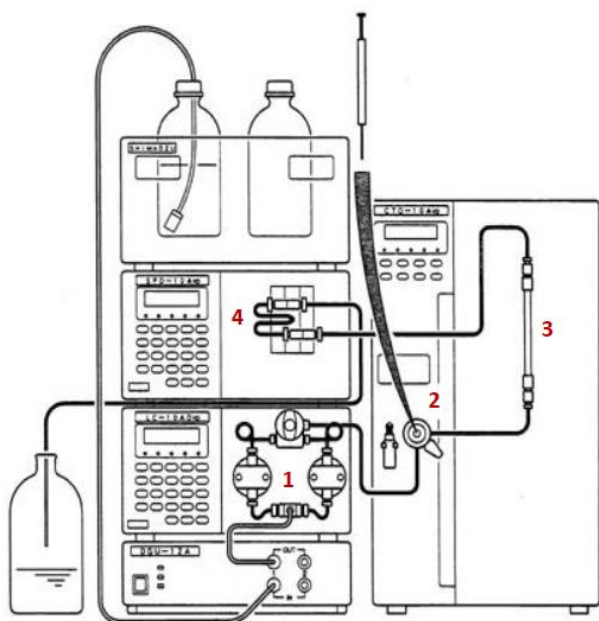
Εικόνα 16 Περιγραφή υπολογισμού των παραμέτρων της διαχωριστικής ικανότητας μιας χρωματογραφικής μεθόδου.

Ανιχνευτής

Ο ανιχνευτής χρησιμοποιείται για να ανιχνεύει την παρουσία μιας ένωσης που διέρχεται και παρέχει ένα ηλεκτρονικό σήμα σε μια συσκευή απόκτησης δεδομένων. Λεπτομέρειες για τους τύπους των ανιχνευτών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα ερευνητική εργασία δίνονται στο υποκεφάλαιο 1.5.2.2.

Μονάδα ελέγχου και επεξεργασίας δεδομένων

Στον Η/Υ είναι εγκατεστημένο κατάλληλο λογισμικό, μέσω του οποίου ρυθμίζονται όλοι οι παράμετροι των επιμέρους τμημάτων του συστήματος HPLC, όπως η θερμοκρασία της στήλης, η σύσταση και η ροή της κινητής φάσης και ο όγκος έγχυσης. Το λογισμικό είναι υπεύθυνο να συλλέγει και να επεξεργάζεται τα αποτελέσματα από τον ανιχνευτή.



Εικόνα 17 Σχηματική αναπαράσταση συστήματος HPLC. 1. Αντλία, 2. Σύστημα εισαγωγής του δείγματος, 3. Χρωματογραφική Στήλη, 4. Ανιχνευτής.

1.5.4 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων

Όλες οι μέθοδοι πραγματοποιήθηκαν με δύο επαναλήψεις. Στα αποτελέσματα που προέκυψαν, ακολούθησε στατιστική ανάλυση, με το πακέτο Statsoft Statistica 7. Ως η πιο αρμόζουσα ανάλυση επιλέχθηκε η Ανάλυση Διασποράς με έναν Παράγοντα (One Way ANOVA), με έλεγχο πολλαπλών συγκρίσεων κατά Tukey HSD test (Honesty Significant Difference).

2 Πειραματικό Μέρος

Για τους σκοπούς της παρούσας διπλωματικής εργασίας, δημιουργήθηκε μια ομάδα δειγμάτων με διαφορετικές συγκεντρώσεις SO₂ τα οποία υποβλήθηκαν σε υψηλή υδροστατική πίεση (HHP) και άλλη μια ομάδα με αντίστοιχες συγκεντρώσεις SO₂ αλλά χωρίς HHP τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις ακεταλδεύδης, οξικού οξέος, πολυφαινολών, ανθοκυανών και προκυανιδινών, όπως επίσης η ένταση και η απόχρωση για όλα τα δείγματα με την βοήθεια του ‘ONE Analyser’ από την εταιρία STEROTGLASS. Μετρήθηκαν επίσης οι ολικές πολυφαινόλες με την κλασική μέθοδο για σκοπούς σύγκρισης, η αντιοξειδωτική ικανότητα, ο μέσος βαθμός πολυμερισμού και οι επιμέρους ανθοκυάνες. Οι αναλύσεις πραγματοποιούνταν εις διπλούν, κάθε 2 μήνες για διάρκεια 6 μηνών.

2.1 Προετοιμασία δειγμάτων

2.1.1 Οινοποίηση

Για την παραγωγή του οίνου έγινε συν-οινοποίηση 23 kg σταφυλιού της ποικιλίας Syrah και 8.5 kg σταφυλιού της ποικιλίας Αγιωργίτικο. Μετά το σπάσιμο, προστέθηκαν εκτός από τις ζύμες UCLM S325 Selection Universidad Catolica de la Mancha σε δόση 30 g/hL (9g) και Sofizym col plus (ένζυμα εκχύλισης) σε δόση 4 g/hL (1108 g), ταννίνη ερυθρών οίνων σε δόση 20 g/hL (5011 g) και έγινε διόρθωση της οξύτητας με 25 g τρυγικού. Μια μέρα μετά την έναρξη της ζύμωσης προστέθηκαν 9 g (30 g/hL) Springferm για ενίσχυση της οργανικής θρέψης και 3 μέρες αργότερα 9 g (30 g/hL) DAP και 700 g ζάχαρης για ενίσχυση του ΔΑΤ.

Δύο μέρες μετά το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης, πραγματοποιήθηκε απολάσπωση και εμβολιασμός με γαλακτικά βακτήρια ‘Cine’, για παραγωγή μικρότερων συγκεντρώσεων κιτρικού οξέος και πτητικής οξύτητας. Το τελικό αποτέλεσμα ήταν ερυθρός οίνος με 12.6 % v.v αλκοολικό τίτλο, pH=3.6, ογκομετρούμενη οξύτητα 5.4 g/L και πτητική οξύτητα 0.4 g/L.

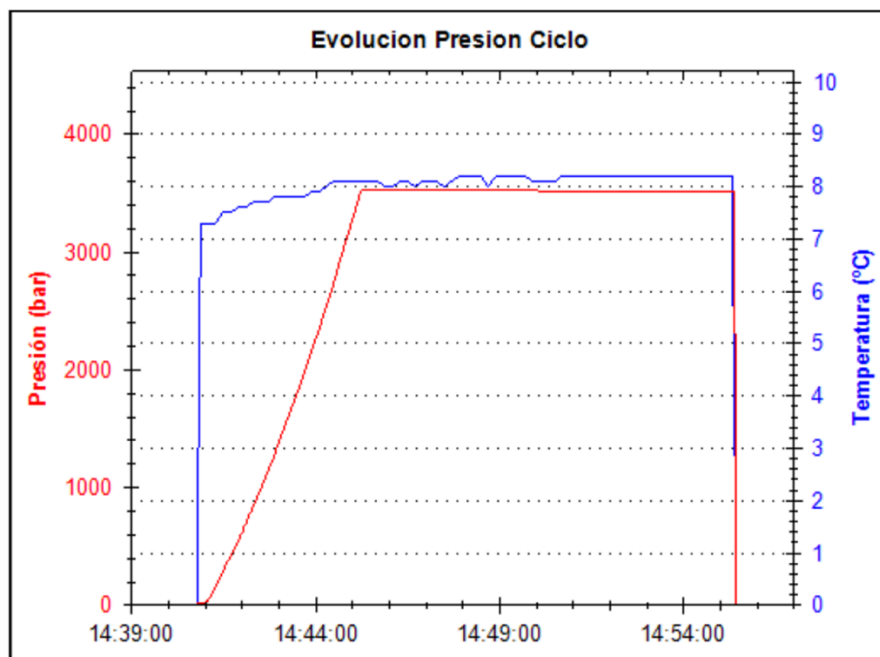
2.1.2 Θείωση

Ο όγκος του παραγόμενου οίνου χωρίστηκε ισόποσα σε 8 διαφορετικούς περιέκτες. Οι διαφορετικές θειώσεις έλαβαν χώρα ανά ζεύγη. Στο πρώτο ζεύγος δεν πραγματοποιήθηκε

θείωση (0 ppm ολικού θειώδους), ενώ στο δεύτερο, τρίτο και τέταρτο ζεύγος προστέθηκε metabisulfit ώστε ο ολικός θειώδης να βρίσκεται σε συγκεντρώσεις 30 ppm, 60 ppm και 100 ppm αντίστοιχα.

2.1.3 Εφαρμογή Υψηλής Υδροστατικής Πίεσης (HHP)

Η ποσότητα από τον ένα από τους δύο περιέκτες για κάθε ζεύγος μεταφέρθηκε σε περιέκτες πολυαιθυλενίου και μεταφέρθηκαν στο δοχείο πίεσης ενός μηχανήματος εφαρμογής υψηλής υδροστατικής πίεσης. Τα δείγματα υποβλήθηκαν σε πίεση 350 MPa για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 8 °C.



Εικόνα 18 Κύκλος πίεσης δειγμάτων

2.1.4 Κωδικοποίηση δειγμάτων

Με βάση τις παραπάνω επεμβάσεις προέκυψαν δύο ομάδες δειγμάτων, η πρώτη με τα δείγματα με 0 ppm, 30 ppm, 60 ppm και 100 ppm SO₂ τα οποία υποβλήθηκαν σε πίεση και η δεύτερη ομάδα δειγμάτων τα οποία δεν υποβλήθηκαν σε πίεση.

Πίνακας 1 Κωδικοποίηση δειγμάτων

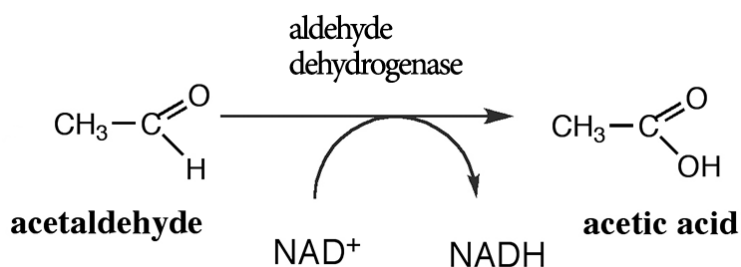
| Κωδικός | Δείγμα | |
|---------|--------|-----------------|
| | Πίεση | SO ₂ |
| 0/YM | √ | 0 ppm |
| 30/YM | √ | 30 ppm |
| 60/YM | √ | 60 ppm |
| 100/YM | √ | 100 ppm |
| X0/YM | X | 0 ppm |
| X30/YM | X | 30 ppm |
| X60/YM | X | 60 ppm |
| X100/YM | X | 100 ppm |

*Όπου YM ο μήνας δειγματοληψίας με Y= 0, 2, 4 ή 6

2.2 Μέτρηση Ακεταλδεΐδης

2.2.1 Αρχή της Μεθόδου

Ο προσδιορισμός της ακεταλδεΐδης στα δείγματα οίνου πραγματοποιήθηκε ενζυμικά. Το ένζυμο Al-DH (aldehyde dehydrogenase) καταλύει την οξείδωση της ακεταλδεΐδης σε οξικό οξύ παρουσία NAD. Το NAD μετατρέπεται σε NADH αυξάνοντας έτσι την απορρόφηση στα 340 nm. Η αύξηση αυτή είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της ακεταλδεΐδης στο δείγμα (Liu & Pilone, 2000).



Εικόνα 19: Ενζυμική μετατροπή της ακεταλδεΐδης σε οξικό οξύ από την Al-DH

2.2.2 Όργανο Μέτρησης

Για την μέτρηση της ακεταλδεΐδης για την παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε ο ‘ONE Analyser’ από την εταιρία STEROGLOSS.

2.2.3 Χημικά Αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την μέτρηση της ακεταλδεΐδης για την παρούσα διπλωματική εργασία, προήλθαν από την εταιρία STEROGLOSS και βρίσκονταν μέσα σε κιτ. Το κιτ για την ακεταλδεΐδη περιελάμβανε 4 διαλύματα. Το R1A το οποίο ήταν ρυθμιστικό διάλυμα με σταθεροποιητές και συντηρητικά, το R1B το οποίο περιείχε το ένζυμο Al-DH (aldehyde dehydrogenase), το R2 ένα δεύτερο ρυθμιστικό διάλυμα με NAD σε συγκέντρωση μεγαλύτερη των 10 mM και συντηρητικά και το BL το τελευταίο ρυθμιστικό διάλυμα.

2.2.4 Προετοιμασία Διαλυμάτων

Το διάλυμα εργασίας παρασκευάστηκε σε 2 στάδια. Αρχικά, αναμίχθηκαν 34 mL R1A με 850 μL R1B για να προκύψει το R1 διάλυμα. Ακολούθως, 850 μL R2 προστέθηκαν σε 34 mL R1 και έτσι προέκυψε το διάλυμα εργασίας.

2.2.5 Πειραματική Διαδικασία

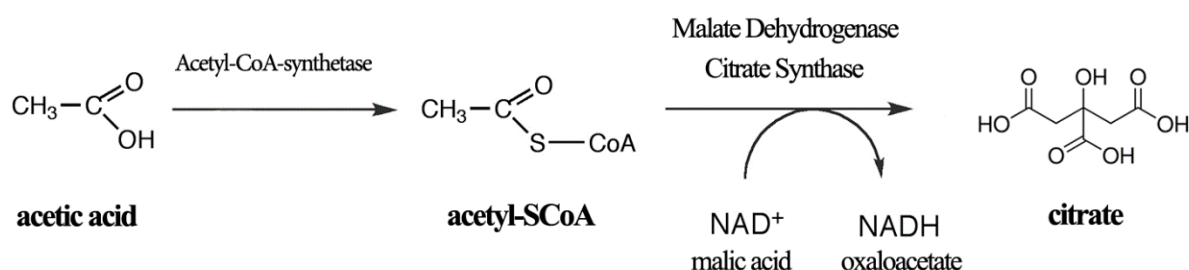
Για την μέτρηση της ακεταλδεΐδης χρησιμοποιήθηκε BT πρωτόκολλο. Ένα ζεύγος από κυβέττες χρησιμοποιήθηκε για το κάθε δείγμα και ένα επιπρόσθετο ζεύγος για την μέτρηση του τυφλού. Για το τυφλό προστέθηκαν 50 μL απεσταγμένου νερού σε κάθε κυβέττα και μετά προστέθηκαν 2 mL διαλύματος BL στην πρώτη και 2 mL διαλύματος εργασίας στην δεύτερη κυβέττα. Για τα δείγματα ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία αλλά αντί 50 μL νερού γινόταν προσθήκη 50 μL του εκάστοτε δείγματος. Μετά από προσεχτική ανάδευση, οι κυβέττες τοποθετούνταν στις θέσεις επώασης (37 °C) του αναλυτή για 10 λεπτά. Με την

πάροδο των 10 λεπτών, τοποθετούνταν στη θέση μέτρησης του αναλυτή πρώτα η κυβέττα με το νερό και το BL διάλυμα και μετά η κυβέττα με το νερό και το διάλυμα εργασίας. Ακολούθησαν τα δείγματα, διατηρώντας πάντα την ίδια σειρά, πρώτα το δείγμα με το BL διάλυμα και μετά το δείγμα με το διάλυμα εργασίας, με τον αναλυτή να εκτυπώνει το αποτέλεσμα μετά το κάθε ζεύγος κυβεττών.

2.3 Μέτρηση Οξικού Οξέος

2.3.1 Αρχή της Μεθόδου

Ο προσδιορισμός του οξικού οξέος στα δείγματα οίνου πραγματοποιήθηκε ενζυμικά. Το ένζυμο ACS (Acetyl-CoA-Synthetase) καταλύει τη μετατροπή του οξικού οξέος σε CoA (acetyl- coenzyme A). Στην συνέχεια το CoA δύναται να αντιδράσει με οξαλοξικό παρουσία της CS (Citrate Synthase) για να δώσει κιτρικό. Το οξαλοξικό που είναι απαραίτητο για την αντίδραση, μπορεί να παραχθεί από την αντίδραση του μηλικού με NAD παρουσία της MDH (Malate Dehydrogenase), με ταυτόχρονη παραγωγή NADH. Το παραγόμενο NADH αυξάνει την απορρόφηση στα 340 nm και η αύξηση αυτή είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του οξικού στο δείγμα (Bergmeyer, n.d.).



Εικόνα 20: Ενζυμική μετατροπή του οξικού οξέος σε Acetyl-CoA και στην συνέχεια σε κιτρικό οξύ

2.3.2 Όργανο Μέτρησης

Για την μέτρηση του οξικού οξέος για την παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε ο 'ONE Analyser' από την εταιρία STEROGLOSS.

2.3.3 Χημικά Αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την μέτρηση του οξικού οξέος για την παρούσα διπλωματική εργασία, προήλθαν από την εταιρία STEROGLOSS και

βρίσκονταν μέσα σε κιτ. Το κιτ για το οξικό οξύ περιελάμβανε 4 διαλύματα. Το R1A το οποίο ήταν ρυθμιστικό διάλυμα (pH= 8.5) με MgCl₂ σε συγκέντρωση μεγαλύτερη του 1 mM, το R1B ένα δεύτερο ρυθμιστικό διάλυμα (pH= 5) με ATP σε συγκέντρωση μεγαλύτερη των 2 mM, NAD σε συγκέντρωση μεγαλύτερη των 2 mM και CoA (acetyl- coenzyme A) σε συγκέντρωση μεγαλύτερη των 2 mM, το R2 ένα τρίτο ρυθμιστικό διάλυμα (pH= 7.6) με τα 3 διαφορετικά ένζυμα, την ACS (Acetyl-CoA-Synthetase), την CS (Citrate Synthase) και την MDH (Malate Dehydrogenase) και το BL το τελευταίο ρυθμιστικό διάλυμα (pH= 8.5).

2.3.4 Προετοιμασία Διαλυμάτων

Το διάλυμα εργασίας παρασκευάστηκε σε 2 στάδια. Αρχικά, αναμίχθηκαν 17 mL R1A με 17 mL R1B για να προκύψει το R1 διάλυμα. Ακολούθως, 1.7 mL R2 προστέθηκαν σε 32.3 mL R1 και έτσι προέκυψε το διάλυμα εργασίας.

2.3.5 Πειραματική Διαδικασία

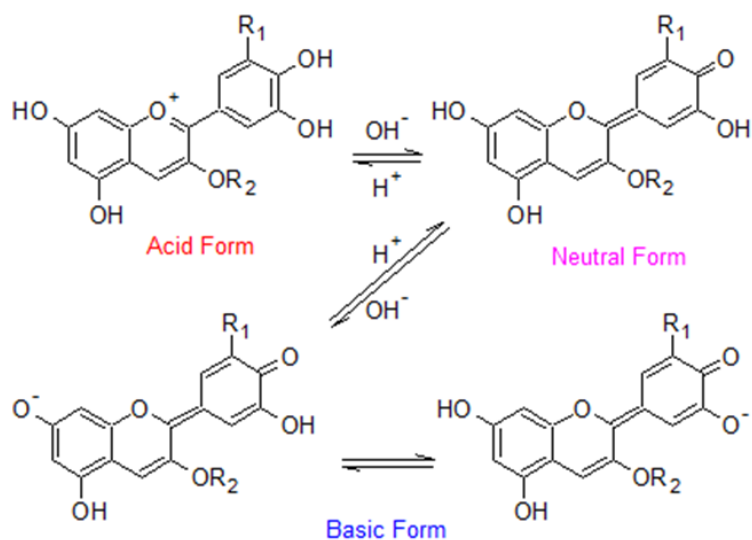
Για την μέτρηση του οξικού οξέος χρησιμοποιήθηκε BT πρωτόκολλο. Ένα ζεύγος από κυβέττες χρησιμοποιήθηκε για το κάθε δείγμα και ένα επιπρόσθετο ζεύγος για την μέτρηση του τυφλού. Για το τυφλό προστέθηκαν 50 μL απεσταγμένου νερού σε κάθε κυβέττα και μετά προστέθηκαν 2 mL διαλύματος BL στην πρώτη και 2 mL διαλύματος εργασίας στην δεύτερη κυβέττα. Για τα δείγματα ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία αλλά αντί 50 μL νερού γινόταν προσθήκη 50 μL του εκάστοτε δείγματος. Μετά από προσεχτική ανάδευση, οι κυβέττες τοποθετούνταν στις θέσεις επώασης (37 °C) του αναλυτή για 10 λεπτά. Με την πάροδο των 10 λεπτών, τοποθετούνταν στη θέση μέτρησης του αναλυτή πρώτα η κυβέττα με το νερό και το BL διάλυμα και μετά η κυβέττα με το νερό και το διάλυμα εργασίας. Ακολούθησαν τα δείγματα, διατηρώντας πάντα την ίδια σειρά, πρώτα το δείγμα με το BL διάλυμα και μετά το δείγμα με το διάλυμα εργασίας, με τον αναλυτή να εκτυπώνει το αποτέλεσμα μετά το κάθε ζεύγος κυβεττών.

2.4 Μέτρηση Ανθοκυανών

2.4.1 Αρχή της Μεθόδου

Ο προσδιορισμός των ανθοκυανών στα δείγματα οίνου πραγματοποιήθηκε χημικά και βασίζεται στην ικανότητα τους να ιονίζονται σε όξινο περιβάλλον. Με την χρήση λοιπόν ενός ρυθμιστικού διαλύματος με την κατάλληλη ιοντική ισχύ μπορούν να προσδιοριστούν

μόνο ανθοκυάνες στην ελεύθερη, ιονισμένη τους μορφή, αποκλείοντας από την μέτρηση τις δεσμευμένες με άλλα μόρια ανθοκυάνες (“Recueil des Methods Internationales d’ Analyse des Vins et des Mouts”).



Εικόνα 21 Συμπεριφορά των ανθοκυανών σε διαφορετικά pH

2.4.2 Όργανο Μέτρησης

Για την μέτρηση του οξικού οξέος για την παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε ο ‘ONE Analyser’ από την εταιρία STEROGLOSS.

2.4.3 Χημικά Αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την μέτρηση του οξικού οξέος για την παρούσα διπλωματική εργασία, προήλθαν από την εταιρία STEROGLOSS και βρίσκονταν μέσα σε κιτ. Το κιτ για τις ανθοκυάνες περιελάμβανε 1 ρυθμιστικό διάλυμα R1.

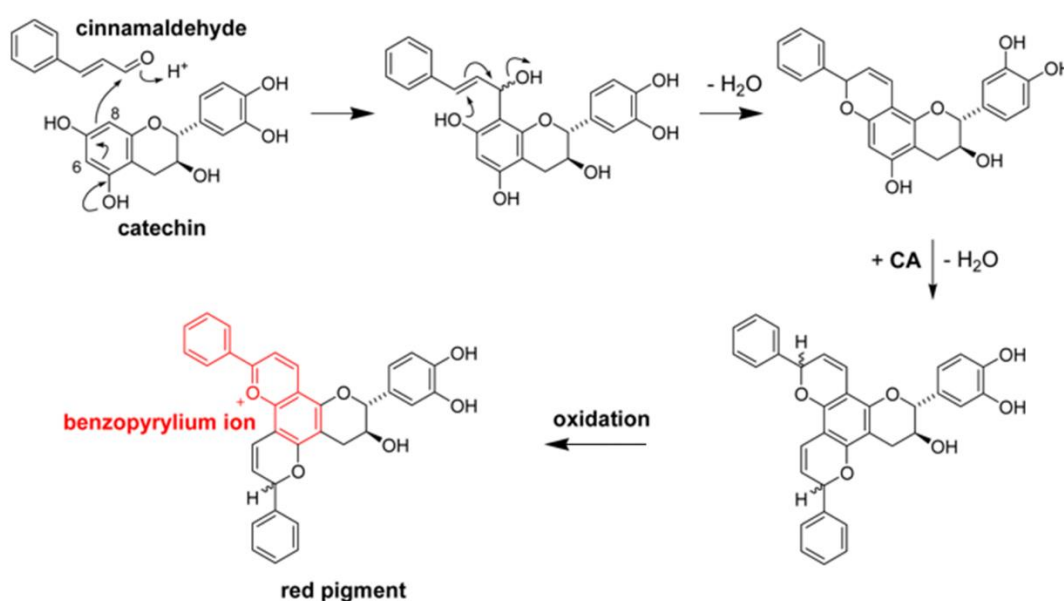
2.4.4 Πειραματική Διαδικασία

Για την μέτρηση των ανθοκυανών χρησιμοποιήθηκε το standard πρωτόκολλο. Σε κάθε κυβέττα προστίθονταν 100 μ L δείγματος και 2 mL R1. Μετά από προσεχτική ανάδευση η κυβέττα τοποθετιόταν στη θέση μέτρησης του αναλυτή και μετά από 5 λεπτά επώασης στους 37 °C ο αναλυτής τύπωνε το αποτέλεσμα.

2.5 Μέτρηση Προκυανιδινών

2.5.1 Αρχή της Μεθόδου

Ο προσδιορισμός των προκυανιδινών στα δείγματα οίνου πραγματοποιήθηκε χημικά και βασίζεται στην ικανότητα τους να σχηματίζουν χρωμοφόρο με μέγιστη απορρόφηση στα 644 nm, όταν αντιδράσουν με κυναμαλδεύδη σε μη-υδατικό μέσο. Η μέτρηση επομένως στα 644 nm είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των προκυανιδινών στο δείγμα (Nakamura, Tsuji, & Tonogai, 2003).



Εικόνα 22 Σχηματισμός χρωμοφόρου μέσω αντίδρασης των προκυανιδινών με κυναμαλδεύδη

2.5.2 Όργανο Μέτρησης

Για την μέτρηση των προκυανιδινών για την παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε ο 'ONE Analyser' από την εταιρία STEROGLOSS.

2.5.3 Χημικά Αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την μέτρηση των προκυανιδινών για την παρούσα διπλωματική εργασία, προήλθαν από την εταιρία STEROGLOSS και βρίσκονταν μέσα σε κιτ. Το κιτ για τις προκυανιδίνες περιελάμβανε 2 διαλύματα. Το R1 το οποίο ήταν διάλυμα αιθανόλης και θεικού οξέος και το R2 το οποίο ήταν διάλυμα αιθανόλης με 4-(dimethylamino)cinnamaldehyde σε συγκέντρωση μεγαλύτερη των 2 g/L.

2.5.4 Προετοιμασία Διαλυμάτων

Το διάλυμα εργασίας παρασκευάστηκε με την ανάμιξη 12 mL R1 και 4 mL R2.

2.5.5 Πειραματική Διαδικασία

Για την μέτρηση των προκυανιδινών χρησιμοποιήθηκε το standard πρωτόκολλο. Σε κάθε κυβέττα προστίθονταν 100 μ L δείγματος και 1 mL διαλύματος εργασίας. Μετά από προσεχτική ανάδευση η κυβέττα τοποθετιόταν στη θέση μέτρησης του αναλυτή και μετά από 5 λεπτά επώασης στους 37 °C ο αναλυτής τύπωνε το αποτέλεσμα.

2.6 Μέτρηση Παραμέτρων για το χρώμα

2.6.1 Αρχή της Μεθόδου

Η μέτρηση των παραμέτρων του χρώματος για τα δείγματα οίνου μπορεί να γίνει μετά από αραίωση με όξινο ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο αφήνει απαράλλακτη την αναλογία των συστατικών που επηρεάζουν το χρώμα (“Recueil des Methodes Internationales d’ Analyse des Vins et des Mouts”).

2.6.2 Όργανο Μέτρησης

Για την μέτρηση των παραμέτρων του χρώματος για την παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε ο ‘ONE Analyser’ από την εταιρία STEROGLOSS.

2.6.3 Χημικά Αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την μέτρηση των παραμέτρων του χρώματος για την παρούσα διπλωματική εργασία, προήλθαν από την εταιρία STEROGLOSS και βρίσκονταν μέσα σε κιτ. Το κιτ για τις παραμέτρους του χρώματος περιελάμβανε 1 ρυθμιστικό διάλυμα (pH=4.0) R.

2.6.4 Πειραματική Διαδικασία

Για την μέτρηση των παραμέτρων του χρώματος χρησιμοποιήθηκε το standard πρωτόκολλο. Σε κάθε κυβέττα προστίθονταν 100 μ L δείγματος και 900 μ L R. Μετά από προσεχτική ανάδευση η κυβέττα τοποθετιόταν στη θέση μέτρησης του αναλυτή και μετά από 3 δευτερόλεπτα στους 37 °C ο αναλυτής τύπωνε τις απορροφήσεις στα 420 nm, 520 nm και 620 nm για το κάθε δείγμα.

2.7 Μέτρηση Πολυφαινολών Α

2.7.1 Αρχή της Μεθόδου

Ο προσδιορισμός των πολυφαινολών στα δείγματα οίνου πραγματοποιήθηκε χημικά, και βασίζεται στην απορρόφηση των ανηγμένων προϊόντων (620 nm) από την οξείδωση των υδροξυλικών ομάδων των πολυφαινολών σε ισχυρά βασικό περιβάλλον, από οξοβολφραμικά (W_8O_{23}) και οξομολιβδενικά (Mo_8O_{23}) σύμπλοκα (Folin & Ciocalteu, 1927).

2.7.2 Όργανο Μέτρησης

Για την μέτρηση των πολυφαινολών για την παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε ο 'ONE Analyser' από την εταιρία STEROGLOSS.

2.7.3 Χημικά Αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την μέτρηση των πολυφαινολών για την παρούσα διπλωματική εργασία, προήλθαν από την εταιρία STEROGLOSS και βρίσκονταν μέσα σε κιτ. Το κιτ για τις πολυφαινόλες περιελάμβανε 2 διαλύματα. Το R1 το οποίο αποτελούσε στο αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu και το R2 το οποίο ήταν το βασικό ρυθμιστικό με υδροξείδιο του νατρίου σε συγκέντρωση μεγαλύτερη του 0.5%.

2.7.4 Πειραματική Διαδικασία

Για την μέτρηση των πολυφαινολών χρησιμοποιήθηκε το standard πρωτόκολλο. Σε κάθε κυβέττα προστίθονταν 100 μ L δείγματος, 2 mL διαλύματος R1 και 1 mL διαλύματος R2. Μετά από προσεχτική ανάδευση η κυβέττα τοποθετιόταν στη θέση μέτρησης του αναλυτή και μετά από 5 λεπτά επώασης στους 25 °C ο αναλυτής τύπωνε το αποτέλεσμα.

2.8 Μέτρηση Πολυφαινολών Β

2.8.1 Αρχή της Μεθόδου

Ο προσδιορισμός των πολυφαινολών στα δείγματα οίνου πραγματοποιήθηκε χημικά, και βασίζεται στην απορρόφηση των ανηγμένων προϊόντων (765 nm) από την οξείδωση των υδροξυλικών ομάδων των πολυφαινολών σε ισχυρά βασικό περιβάλλον, από οξοβολφραμικά (W_8O_{23}) και οξομολιβδενικά (Mo_8O_{23}) σύμπλοκα (Folin & Ciocalteu, 1927).

2.8.2 Όργανο Μέτρησης

Για την μέτρηση των πολυφαινολών για την παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο UV-Vis Spectrophotometer V-530 (Jasco).

2.8.3 Χημικά Αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την μέτρηση των πολυφαινολών για την παρούσα διπλωματική εργασία, αγοράστηκαν από την εταιρία Sigma-Aldrich.

2.8.4 Προετοιμασία Διαλυμάτων

Για την συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία ήταν απαραίτητα 3 διαλύματα, 1 διάλυμα Na_2CO_3 20%, 1 πρότυπο διάλυμα γαλλικού οξέος 1g/L και το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu το οποίο δεν απαιτούσε καμιά προετοιμασία. Για την παρασκευή του διαλύματος Na_2CO_3 20%, 20 g άνυδρου Na_2CO_3 διαλύθηκαν σε 70 περίπου mL H_2O και ο όγκος συμπληρώθηκε στα 100 mL. Το πρότυπο διάλυμα γαλλικού οξέος 1 g/L παρασκευάστηκε με την διάλυση 50 mg γαλλικού οξέος σε 5 mL αιθανόλης σε ογκομετρική φιάλη των 50 mL και συμπλήρωση του όγκου με H_2O . Ακολούθως, 25 mL διαλύματος γαλλικού οξέος 1 g/L μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 50 mL και ο όγκος συμπληρώθηκε με H_2O . Έτσι προέκυψε 1 νέο διάλυμα γαλλικού οξέος με συγκέντρωση 0.5 g/L. Από αυτό το διάλυμα μεταφέρθηκαν 25 mL σε νέα ογκομετρική φιάλη των 50 mL και ο όγκος συμπληρώθηκε με H_2O για να προκύψει διάλυμα με συγκέντρωση 0.25 g/L. Από το τρίτο αυτό διάλυμα 20 mL μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 50 mL και ο όγκος συμπληρώθηκε με H_2O για την παραγωγή διαλύματος γαλλικού οξέος με συγκέντρωση 0.1 g/L. Τέλος, από το τελευταίο αυτό διάλυμα μεταφέρθηκαν 25 mL σε ογκομετρική φιάλη των 50 mL και ο όγκος συμπληρώθηκε με H_2O για την παραγωγή διαλύματος γαλλικού οξέος με συγκέντρωση 0.05 g/L. Στα δείγματα οίνου πραγματοποιήθηκε αραίωση 1:10.

2.8.5 Πειραματική Διαδικασία

Σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL με περίπου 5 mL H_2O τοποθετούνταν 100 μL αραιωμένου δείγματος, 0.5 mL αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu και 1.5 mL διαλύματος Na_2CO_3 20%. Ο όγκος συμπληρώθηκε με H_2O . Για το μάρτυρα χρησιμοποιήθηκε H_2O αντί δείγμα και για την δημιουργία της πρότυπης καμπύλης τα διαλύματα γαλλικού οξέος με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις (1 g/L, 0.5 g/L, 0.25 g/L, 0.1 g/L και 0.05 g/L). Μετά από παραμονή 30 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, μετρήθηκε η απορρόφηση στα 765 nm. Ο

υπολογισμός της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών του δείγματος σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (GAE) έγινε από την ευθεία που περιγράφει την πρότυπη καμπύλη λαμβάνοντας υπόψη και την αραίωση που προηγήθηκε.

2.9 Μέτρηση Αντιοξειδωτικής ικανότητας

2.9.1 Αρχή της Μεθόδου

Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας στα δείγματα οίνου πραγματοποιήθηκε χημικά, και βασίζεται στην μείωση της απορρόφησης στα 515 nm μιας σταθερής ρίζας όπως η 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) λόγω αναγωγής της όταν αντιδράσει με κάποια αντιοξειδωτική ουσία (π.χ. φαινολικά) ή άλλη ρίζα (Brand-Williams, Cuvelier & Berset, 1995).

2.9.2 Όργανο Μέτρησης

Για την μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας για την παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο UV-Vis Spectrophotometer V-530 (Jasco).

2.9.3 Χημικά Αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας για την παρούσα διπλωματική εργασία, αγοράστηκαν από την εταιρία Sigma-Aldrich.

2.9.4 Προετοιμασία Διαλυμάτων

Για την συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία ήταν απαραίτητα 2 διαλύματα, ένα διάλυμα DPPH και ένα πρότυπο διάλυμα Trolox 2 mM. Για το διάλυμα DPPH ζυγίστηκαν 10 mg DPPH και διαλύθηκαν σε 20 mL μεθανόλης για την δημιουργία του stock διαλύματος. Από αυτό, με αραίωση 2:50, παρασκευάστηκε το διάλυμα μέτρησης. Για το πρότυπο διάλυμα Trolox 2mM ζυγίστηκαν 12,5 mg Trolox και διαλύθηκαν σε 25 mL 96 % EtOH. Από το πυκνό διάλυμα Trolox και με τις κατάλληλες αραιώσεις, παρασκευάστηκαν διαλύματα με συγκεντρώσεις 1.5 mM, 1.0 mM, 0.5 mM και 0.08 mM για την δημιουργία της πρότυπης καμπύλης.

2.9.5 Πειραματική Διαδικασία

Σε μικρούς γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες τοποθετήθηκαν 50 μL αραιωμένου δείγματος οίνου (η αραιώση έγινε με dH_2O 1:10 ανάλογα) και 1950 μL διαλύματος DPPH. Ακολούθησε ανάδευση σε vortex και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 515 nm με μάρτυρα dH_2O σε χρόνο $t=0$. Το δείγμα επιστρεφόταν στο σωλήνα και η απορρόφηση ξαναμετρήθηκε μετά από 30 min ($t=30$). Από τις δύο απορροφήσεις υπολογίστηκε η % διαφορά στην απορρόφηση ως εξής

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

Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τα πρότυπα διαλύματα Trolox. Αντιστοιχίζοντας τις πρότυπες συγκεντρώσεις με τις αντίστοιχες % ΔA_{515} κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη, και από την ευθεία που την περιγράφει υπολογίστηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα του δείγματος σε ισοδύναμα trolox ή TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity).

2.10 Προσδιορισμός Ανθοκυανών με HPLC

2.10.1 Όργανο Μέτρησης

Για τον προσδιορισμό των ανθοκυανών για την παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε ένα σύστημα HPLC Jasco (Tokyo, Japan), αποτελούμενο από μια αντλία PU-2089 plus, μια βαλβίδα έγχυσης Rheodyne model 7725i με ενσωματωμένο loop 20 μL και ένα ανιχνευτή diode array (DAD; Jasco MD-910). Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν Pinnacle II C18 (5 μm , 4.6x250mm) από την εταιρία Restek.

2.10.2 Χημικά Αντιδραστήρια

Τόσο η μαλβιδίνη για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης όσο και οι διαλύτες (μεθανόλη και μυρμηγκικό οξύ) που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των ανθοκυανών για την παρούσα διπλωματική εργασία, αγοράστηκαν από την εταιρία Sigma-Aldrich.

2.10.3 Προετοιμασία Διαλυμάτων

Για την παρασκευή 1.5 L διαλύματος μυρμηγκικού οξέος 10%, χρησιμοποιήθηκαν 150 mL από το πυκνό διάλυμα και ο όγκος συμπληρώθηκε με δισαπεσταγμένο νερό.

Για την δημιουργία της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα διαλύματα μαλβιδίνης με συγκεντρώσεις 40 mg/L, 20 mg/L, 15 mg/L, 10 mg/L, 5 mg/L και 2.5 mg/L

Τα δείγματα περάστηκαν από φίλτρο σύριγγας με πορότητα 0.2 μm και τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια του αυτόματου δειγματολήπτη για HPLC.

2.10.4 Πειραματική Διαδικασία

Η λήψη των χρωματογραφημάτων έγινε σε θερμοκρασία δωματίου (20 °C) και χρησιμοποιήθηκε ροή 1 mL/min, ανίχνευση στα 520 nm, όγκος έγχυσης τόσο για τα δείγματα όσο και για τα διαλύματα μαλβιδίνης 10 μL και gradient:

Πίνακας 2 Gradient διαλυτών για διαχωρισμό ανθοκυανών

| Χρόνος (min) | Διαλύτης A (10 % μυρμηγκικό οξύ σε dH ₂ O) | Διαλύτης B Μεθανόλη |
|------------------|--|------------------------|
| αρχικές συνθήκες | 90 | 10 |
| 22 | 50 | 50 |
| 32 | 5 | 95 |
| 34 | 5 | 95 |
| 35 | 90 | 10 |

Αντιστοιχίζοντας τις συγκεντρώσεις της μαλβιδίνης με το εμβαδόν των κορυφών που προέκυψαν από την HPLC κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη, και από την ευθεία που την περιγράφει υπολογίστηκε η συγκέντρωση των ανθοκυανών σε ισοδύναμα μαλβιδίνης στα δείγματα του οίνου (Kyrleou et al., 2015).

2.11 Προσδιορισμός μέσου βαθμού πολυμερισμού (mDP) τανινών σε οίνο με HPLC

2.11.1 Όργανο Μέτρησης

Για τον προσδιορισμό του mDP για την παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε ένα σύστημα HPLC Jasco (Tokyo, Japan), αποτελούμενο από μια αντλία PU-2089 plus, μια βαλβίδα έγχυσης Rheodyne model 7725i με ενσωματωμένο loop 20 μL και ένα ανιχνευτή diode array (DAD; Jasco MD-910). Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν XTerra RP18 (3.5 μm , 4.6x100mm) από την εταιρία Waters.

2.11.2 Χημικά Αντιδραστήρια

Η κατεχίνη, η επικατεχίνη, ο γαλλικός εστέρας της επικατεχίνης, η επιγαλλοκατεχίνη και ο γαλλικός εστέρας της επιγαλλοκατεχίνης για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης, οι διαλύτες έκλουσης (μεθανόλη και οξικό οξύ) και η φλορογλουσινόλη, το ασκορβικό οξύ, το υδροχλωρικό οξύ και το οξικό νάτριο που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση για τον προσδιορισμό του mDP για την παρούσα διπλωματική εργασία, αγοράστηκαν από την εταιρία Sigma-Aldrich.

2.11.3 Προετοιμασία Διαλυμάτων

Για την παρασκευή του διαλύματος της φλορογλουσινόλης σε MeOH διαλύθηκαν 1 g phloroglucinol, 0.2 g ascorbic acid και 0.17 mL 37 % HCl κι ο όγκος συμπληρώθηκε στα 20 mL με MeOH. Το διάλυμα διατηρήθηκε στην κατάψυξη για 15 μέρες καλυμμένο με αλουμινόχαρτο. Για το διάλυμα CH_3COONa 40mM διαλύθηκαν σε H_2O 0.164 g οξικό νάτριο και συμπληρώθηκε ο όγκος στα 50 mL με H_2O

Για την παρασκευή 1.5 L διαλύματος οξικού οξέος 0.1%, χρησιμοποιήθηκε 1.5 mL από το πυκνό διάλυμα και ο όγκος συμπληρώθηκε με δισαπεσταγμένο νερό.

Για την δημιουργία της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα διαλύματα κατεχίνης, επικατεχίνης, γαλλικού εστέρα της επικατεχίνης και της επιγαλλοκατεχίνης με συγκεντρώσεις 20 mg/L, 10 mg/L, 5 mg/L, 2 mg/L και 1 mg/L. Ακολουθώντας με τους κατάλληλους υπολογισμούς προέκυψαν οι πρότυπες καμπύλες για τις αντίστοιχες επεκτατικές υπομονάδες. Οι υπολογισμοί αυτοί περιλαμβάνουν την διαίρεση του εμβαδού

της κορυφής με τον κατάλληλο συντελεστή όπως αυτός προσδιορίστηκε από τους (Kennedy & Waterhouse, 2000). Οι συντελεστές αυτοί φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 3 Τιμές μοριακής απορρόφησης για την εξαγωγή πρότυπων καμπύλων για τις επεκτατικές υπομονάδες

| Τερματική υπομονάδα | Τιμές μοριακής απορρόφησης |
|-----------------------------------|----------------------------|
| Κατεχίνη | 1.06 |
| Επικατεχίνη | 1.06 |
| Γαλλικός εστέρας της επικατεχίνης | 0.1 |
| Επιγαλλοκατεχίνη | 1.02 |

2.11.4 Προετοιμασία Δείγματος

Αρχικά σε δείγμα 10 mL οίνου έγινε εξάτμιση υπό κενό (rotary evaporation), στους 40 °C, για απομάκρυνση της αιθανόλης και συμπύκνωση του δείγματος μέχρι 6-7 mL. Το υγρό υπόλειμμα μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη 20 mL και συμπληρώθηκε ο όγκος με νερό.

Ακολούθως σε συσκευή SPE τοποθετήθηκε στηλάκι C18-(5 g/25 mL) (Isolute, Biotage) και στην αποχέτευσή της πλαστικός περιέκτης 50 mL. Η συσκευή συνδέθηκε με αντλία κενού και ρυθμίστηκε η ταχύτητα ροής περίπου σε 1σταγόνα/2 sec (-20 KPa). Αρχικά έγινε η ενεργοποίηση-καθαρισμός της στήλης με 25 mL MeOH και στη συνέχεια με 25 mL H₂O. Κατόπιν από τη στήλη πέρασε το δείγμα (20 mL). Ακολούθησε έκπλυση με 50 mL H₂O για την απομάκρυνση των υδατοδιαλυτών συστατικών και μετά στέγνωμα για 15 min. Για την παραλαβή των προανθοκυανιδινών, στην αποχέτευση της στήλης μπήκε καινούριος περιέκτης 50 mL και ξανασυνδέθηκε η αντλία κενού. Από την στήλη πέρασαν 50 mL MeOH και συλλέχθηκαν. Η στήλη ξεπλύθηκε με ακόμα 25 mL MeOH τα οποία και απορρίφθηκαν.

Στο μεθανολικό εκχύλισμα προστέθηκαν 2 mL H₂O και συμπυκνώθηκαν υπό κενό (rotary evaporation). Το συμπύκνωμα μεταφέρθηκε σε προζυγισμένο γυάλινο περιέκτη (ξηρό, και με καπάκι). Ο υποδοχέας του rotary ξεπλήθηκε με την ελάχιστη δυνατή ποσότητα H₂O και τα ξεπλύματα προστέθηκαν στο συμπύκνωμα. Μετά από κατάψυξη στους -30 °C ακολούθησε

λυοφιλίωση. Αφού η ξήρανση ολοκληρώθηκε ο περιέκτης ζυγίστηκε (με το καπάκι). Η διαφορά έδωσε την ποσότητα των φαινολικών συστατικών που εκχυλίστηκαν. Το ξηρό εκχύλισμα επαναδιαλύθηκε με MeOH σε τελική συγκέντρωση 20 g/L (περίπου σε 1 mL) και διατηρήθηκε στην κατάψυξη.

Τέλος σε μικρά γυάλινα δοχεία των 4 mL προστέθηκαν 100 μ L δείγματος και 100 μ L διαλύματος phloroglucinol . Έγινε ανάδευση και το μίγμα παρέμεινε για 30 min στους 50 °C. Στο τέλος του χρόνου η αντίδραση σταμάτησε με την προσθήκη 1 mL διαλύματος οξικού νατρίου. Το δείγμα πέρασε από φίλτρο σύριγγας πορότητας 0.2 μ m και τοποθετήθηκε σε κατάλληλο περιέκτη του αυτόματου δειγματολήπτη για HPLC.

2.11.5 Πειραματική Διαδικασία

Η λήψη των χρωματογραφημάτων έγινε σε θερμοκρασία δωματίου (20 °C) και χρησιμοποιήθηκε ροή 1 mL/min, ανίχνευση στα 280 nm, όγκος έγχυσης τόσο για τα δείγματα όσο και για τα διαλύματα μαλβιδίνης 20 μ L και gradient:

Πίνακας 4 Gradient διαλυτών για προσδιορισμό του mDP

| Χρόνος (min) | Διαλύτης A (0.1% οξικό οξύ σε dH ₂ O) | Διαλύτης B MeOH |
|------------------|---|--------------------|
| αρχικές συνθήκες | 95 | 5 |
| 1 | 84 | 16 |
| 7 | 78 | 22 |
| 8 | 65 | 35 |
| 15 | 58 | 42 |
| 16 | 0 | 100 |
| 19 | 0 | 100 |
| 20 | 5 | 95 |

Αντιστοιχίζοντας τις συγκεντρώσεις των πρότυπων με το εμβαδόν των κορυφών που προέκυψαν από την HPLC κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη για τα terminals ενώ για τα extension οι καμπύλες προέκυψαν χρησιμοποιώντας την αναλογία των συντελεστών της εξίσωσης με το αντίστοιχο terminal. Από την ευθεία που την περιγράφει υπολογίστηκε η συγκέντρωση για το κάθε extension και terminal ξεχωριστά στα δείγματα του οίνου (Lorrain, Chira, & Teissedre, 2011).

2.12 Προσδιορισμός Μικροβιακού φορτίου

2.12.1 Αρχή της Μεθόδου

Ο προσδιορισμός του μικροβιακού φορτίου στα δείγματα οίνου πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο απαρίθμησης αποικιών που σχηματίζονται σε εμβολιασμένο στερεό θρεπτικό υλικό και στηρίζεται στη θεωρία ότι ένα βακτηριακό κύτταρο ή ομάδα κυττάρων δημιουργούν μια αποικία. Έτσι ο αριθμός των αποικιών που αναπτύσσεται σε ένα εμβολιασμένο θρεπτικό υλικό, αντιπροσωπεύει τον πραγματικό μικροβιακό πληθυσμό. Η απαρίθμηση των αποικιών εκφράζεται σε μονάδα σχηματιζόμενων αποικιών (colony forming units, cfu). Για την παρούσα διπλωματική εργασία, χρησιμοποιήθηκαν τόσο η τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης (για τους αερόβιους μικροοργανισμούς, ζύμες) και η τεχνική της ενσωμάτωσης (για τους μικροαερόφιλους και προαιρετικά αναερόβιους μικροοργανισμούς, οξυγαλακτικά βακτήρια).

2.12.2 Υλικά

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την μέτρηση του μικροβιακού πληθυσμού για την παρούσα διπλωματική εργασία, ήταν Ringer για τις διαδοχικές αραιώσεις, το PCA σαν γενικό υπόστρωμα, το RBC σαν εκλεκτικό υπόστρωμα για τις ζύμες και το MRS σαν εκλεκτικό υπόστρωμα για τα οξυγαλακτικά βακτήρια και προήλθαν από τη εταιρία Merck.

2.12.3 Προετοιμασία Διαλυμάτων

Σε γυάλινη φιάλη του 1L μεταφέρθηκαν 22.5g PCA, προστέθηκε 1L απεσταγμένο νερό και το άγαρ διαλύθηκε. Ακολούθησε αποστείρωση στους 121 °C για 15 λεπτά. Μετά την αποστείρωση, το άγαρ ψύχθηκε μέχρι τους 45 °C και κάτω από ασηπτικές συνθήκες

μοιράστηκε σε τρυβλία (petri dishes). Αντίστοιχη διαδικασία ακολουθήθηκε και για τα υπόλοιπα υλικά

2.12.4 Πειραματική Διαδικασία

Σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 9 mL Ringer, προστέθηκε 1 mL δείγματος υπό ασηπτικές συνθήκες ώστε να προκύψει διάλυμα με 10^{-1} αραίωση. Ακολούθως σε 2 διαφορετικά τρυβλία που περιείχαν PCA τοποθετήθηκαν στο πρώτο 100 μ L δείγματος με μηδενική αραίωση και στο δεύτερο 100 μ L δείγματος με 10^{-1} αραίωση. Μετά την επίστρωση του εμβολίου στα τρυβλία, ακολούθησε επώαση στους 25 °C για 3 ημέρες. Για κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν διπλά τρυβλία. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και σε τρυβλία με RBC.

Σε 2 καθαρά τρυβλία προστέθηκε 1mL δείγματος μηδενικής αραίωσης στο πρώτο και 1 mL 10^{-1} αραίωσης στο δεύτερο. Ακολούθησε απόχυση ποσότητας MRS στα τρυβλία με το εμβόλιο, ήπια ανάδευση, πήξη του υλικού και μετά δεύτερη απόχυση ποσότητας MRS. Τέλος, πραγματοποιήθηκε επώαση στους 30 °C για 3 ημέρες.

Μετά τις 3 μέρες επώασης, πραγματοποιήθηκε έλεγχος των τρυβλίων για την ύπαρξη αποικιών.

3 Αποτελέσματα και συζήτηση

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις που έγιναν κατά τη διάρκεια των 6 μηνών.

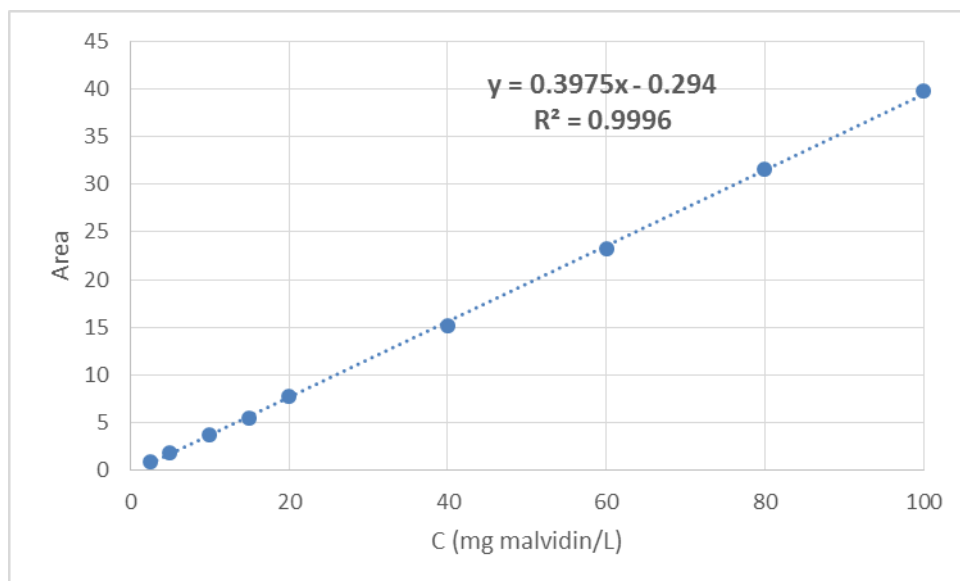
3.1 Μικροβιακός πληθυσμός

Μετά την μικροβιολογική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε με τον τρόπο που περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.12.1, δεν αναπτύχθηκε κάποια αποικία σε κανένα από τα δείγματα. Αυτό ίσως να οφείλεται στην απουσία μικροβιακού πληθυσμού λόγω φιλτραρίσματος του δείγματος με μικρής πορότητας φίλτρο ή στη μείωση των θρεπτικών μετά το τέλος τόσο της αλκοολικής, όσο και της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Επίσης, η χρήση αποστειρωμένων φιαλών καθώς και η μη χρήση φελλών, εκμηδένισαν το ενδεχόμενο επιμόλυνσης των δειγμάτων στο συγκεκριμένο στάδιο. Δεδομένου αυτού, θα μπορούσε να ειπωθεί ότι η χρήση της HHP στους οίνους είναι κατάλληλη μόνο στις περιπτώσεις επιμόλυνσης όπου καταγράφηκε μείωση του μικροβιακού φορτίου (Morata et al., 2012). Άλλες πιθανές χρήσεις της στην οινοποίηση θα μπορούσαν να ήταν στο γλεύκος, για πλήρη έλεγχο της αλκοολικής ζύμωσης με επιλεγμένες ζύμες και στο κρασί μετά την αλκοολική ζύμωση είτε για παρεμπόδιση της έναρξης της μηλογαλακτικής ζύμωσης είτε για έλεγχο της με επιλεγμένα στελέχη γαλακτικών βακτηρίων (Paul & Morita, 1971).

3.2 Συγκέντρωση ανθοκυανών και παραμέτρων του χρώματος

Στο υποκεφάλαιο αυτό παρατίθενται τα αποτελέσματα από την μέτρηση της συγκέντρωσης του συνόλου των ανθοκυανών με τον ‘One analyser’, των επιμέρους ανθοκυανών με την βοήθεια της HPLC, καθώς επίσης και των παραμέτρων του χρώματος όπως η ένταση, η απόχρωση και το ποσοστό του κόκκινου (%R), του κίτρινου (%Y) και του μπλε (%B). Για την μέτρηση του συνόλου των ανθοκυανών με τη βοήθεια του ‘One analyser’ δεν χρειάστηκε η δημιουργία πρότυπης καμπύλης, εν αντιθέσει με την μέτρηση με την βοήθεια της HPLC, για την οποία δημιουργήθηκε πρότυπη καμπύλη με τον τρόπο που περιγράφεται στο υποκεφάλαιο 2.10.3. Με την βοήθεια της συγκεκριμένης πρότυπης καμπύλης υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις των επιμέρους ανθοκυανών. Η έκφραση της

συγκέντρωσης έγινε mg/l malvidin 3-glucoside. Η πρότυπη αυτή καμπύλη φαίνεται πιο κάτω.



Γράφημα 1 Πρότυπη καμπύλη για τον υπολογισμό των επιμέρους ανθοκυανών

Για τις παραμέτρους του χρώματος λήφθηκαν οι απορροφήσεις των δειγμάτων σε μήκη κύματος 420 nm, 520 nm και 620 nm. Ακολουθώντας, με τους κατάλληλους υπολογισμούς προέκυψε η ένταση, η απόχρωση και τα %R, %Y και %B για το κάθε δείγμα ξεχωριστά. Πιο κάτω φαίνονται αναλυτικά οι υπολογισμοί για την κάθε παράμετρο.

$$\text{Ένταση: } E = A_{420} + A_{520} + A_{620}$$

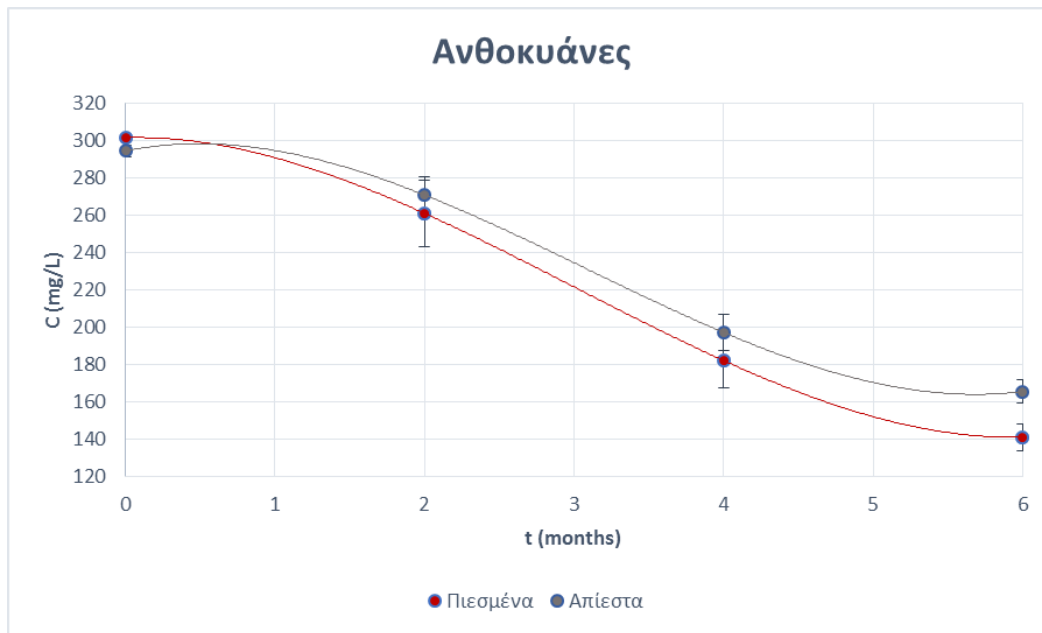
$$\text{Απόχρωση: } A = A_{420} / A_{520}$$

$$\text{Ποσοστό κόκκινου: } \%R = A_{520} / E$$

$$\text{Ποσοστό κίτρινου: } \%Y = A_{420} / E$$

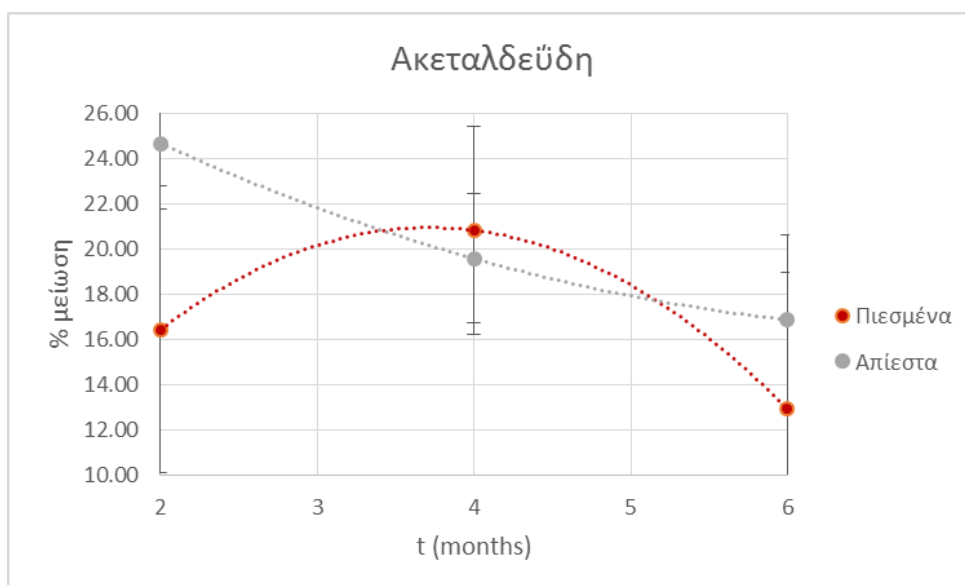
$$\text{Ποσοστό μπλε: } \%B = A_{620} / E$$

Κατά τη διάρκεια των 6 μηνών παρατηρήθηκε μείωση στη συγκέντρωση των ανθοκυανών, τόσο για τα πιεσμένα δείγματα όσο και για τα δείγματα μάρτυρες.



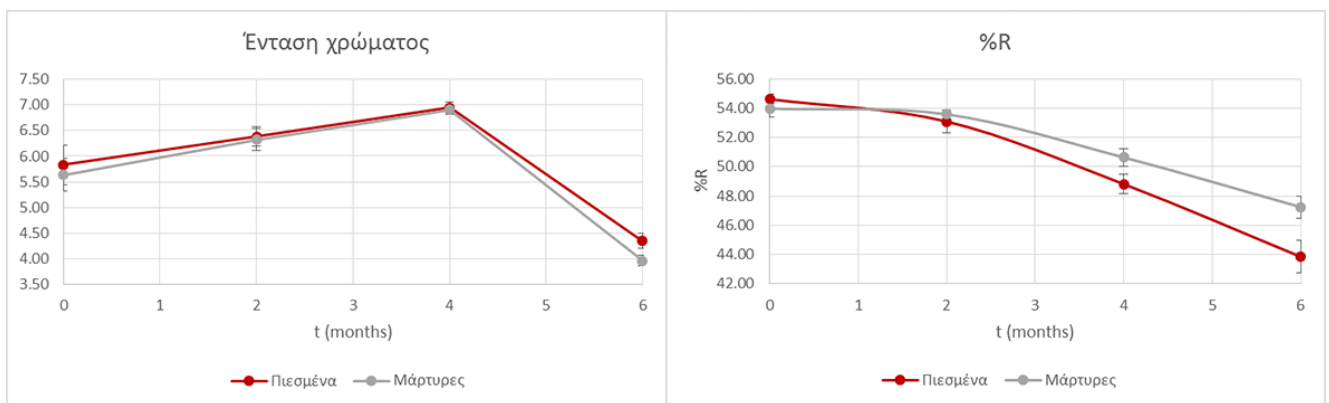
Γράφημα 2 Εξέλιξη στη συγκέντρωση των ανθοκυανών πιεσμένων και απίεστων δειγμάτων κατά τη διάρκεια 6 μηνών. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών.

Η μείωση αυτή πιθανόν να οφείλεται σε αντιδράσεις συμπύκνωσης και πολυμερισμού τους με φαινολικές ενώσεις, που οδηγούν στο σχηματισμό νέων χρωστικών (Fernández, et al., 2003). Στη διαδικασία αυτή μάλιστα, ενδεχομένως να συμμετείχε και η ακεταλδεΐδη, αφού σημειώθηκε παράλληλη μείωση στη συγκέντρωσή της (Perez-Magarino & Gonzalez-San Jose, 2004).

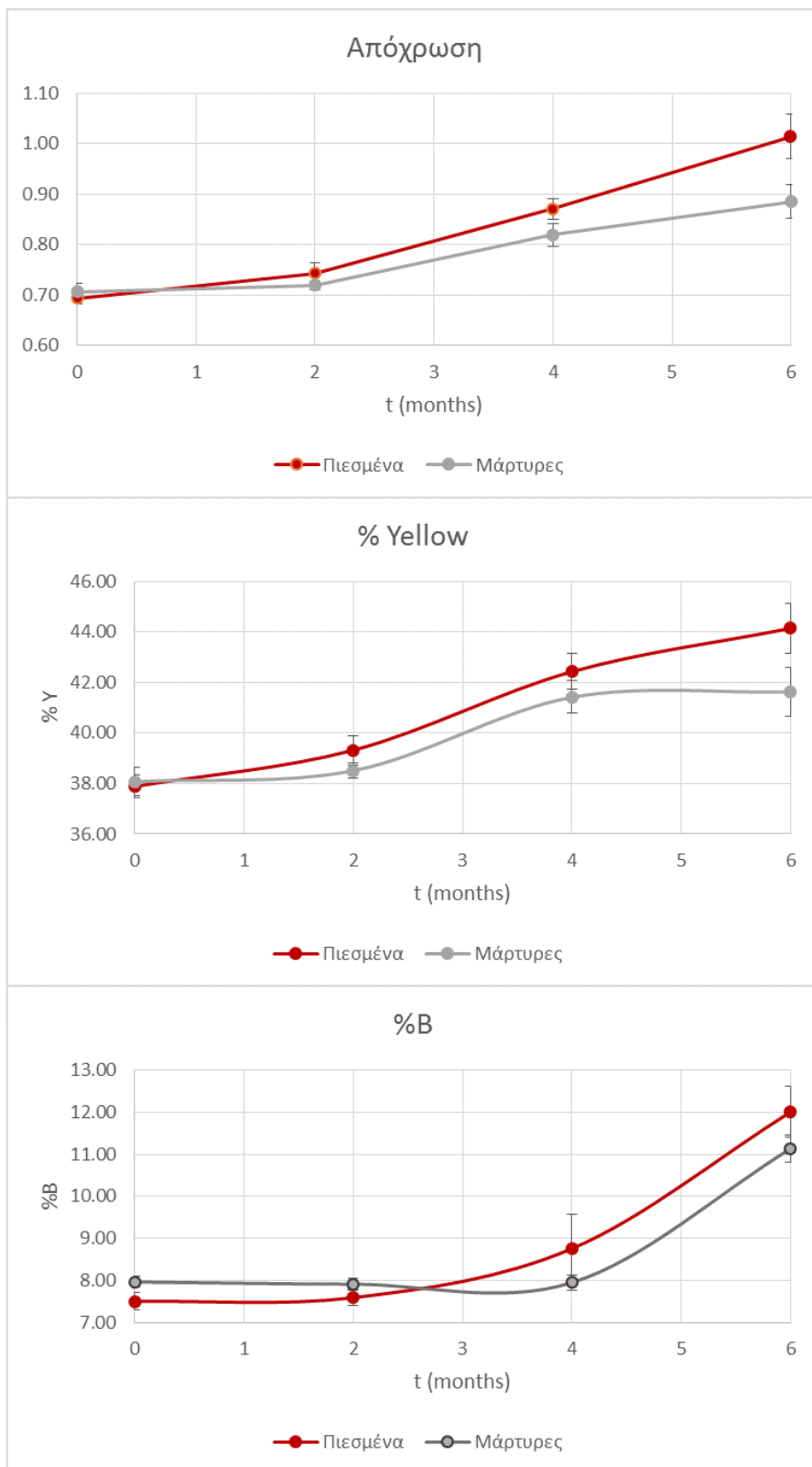


Γράφημα 3 Ποσοστιαία μείωση στη συγκέντρωση της ακεταλδεΐδης κατά τη διάρκεια των 6 μηνών. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών.

Ο σχηματισμός νέων χρωστικών που πραγματοποιείται και κατά την φυσική παλαίωση των οίνων, δύναται να μετατοπίσει το χρώμα τους από το αρχικά κυρίαρχο ερυθρό χρώμα, σε άλλες αποχρώσεις όπως κίτρινο και μπλε (Fernández et al., 2003; Perez-Magarino & Gonzalez-San Jose, 2004). Τελικό αποτέλεσμα είναι η μείωση της έντασης του χρώματος και της τιμής του ποσοστού του κόκκινου (%R), με παράλληλη αύξηση της απόχρωσης και της τιμής του ποσοστού του κίτρινου (%Y) και μπλε (%B) (Francia-Aricha, et al., 1997; Mateus, et al., 2003; Revilla & González-sanjosé, 2001; Revilla, et al., 1999). Τα πειραματικά δεδομένα βρίσκονται σε συμφωνία με την άποψη αυτή.



Γράφημα 4 Εξέλιξη της έντασης του χρώματος και της τιμής του κόκκινου πιεσμένων δειγμάτων και μαρτύρων κατά τη διάρκεια των 6 μηνών. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών.



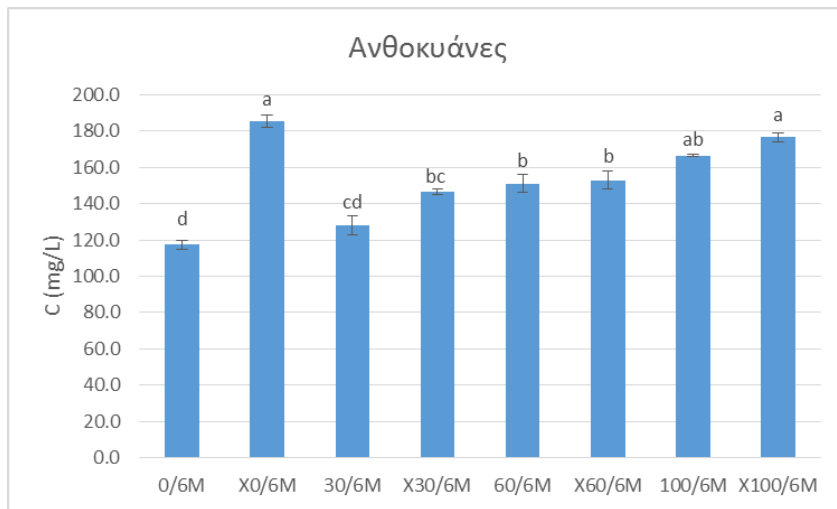
Γράφημα 5 Αύξηση της απόχρωσης και της τιμής του κίτρινου και του μπλε πιεσμένων δειγμάτων και μαρτύρων κατά τη διάρκεια των 6 μηνών. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών.

Αν και αρχικά (0 μήνες), στα πιεσμένα δείγματα καταγράφηκαν λίγο μεγαλύτερες τιμές στη συγκέντρωση των ανθοκυανών και στο %R, ακολούθως σημειώθηκε μεγαλύτερη μείωση σε σχέση με τα δείγματα μάρτυρες. Η μείωση στη συγκέντρωση ανθοκυανών μετά από 6 μήνες ήταν 53.4% για τα πιεσμένα, σε αντίθεση με τα δείγματα μάρτυρες για το οποία η πτώση αυτή ήταν 43.9%. Αντίστοιχα, αν και αρχικά τα δείγματα που υποβλήθηκαν σε HHP χαρακτηρίζονταν από μικρότερες τιμές απόχρωσης, %Y και %B, τελικά σημείωσαν μεγαλύτερη αύξηση σε σχέση με τους μάρτυρες. Η γενική αυτή συμπεριφορά αντιστοιχεί σε φαινομενικά μεγαλύτερη παλαίωση των δειγμάτων τα οποία υποβλήθηκαν σε HHP, γεγονός που ενισχύει την άποψη ότι η εφαρμογή της δύναται να επιταχύνει τις διαδικασίες παλαίωσης των οίνων (Tao et al., 2012).

Πίνακας 5 Ποσοστιαία μείωση στην συγκέντρωση ανθοκυανών

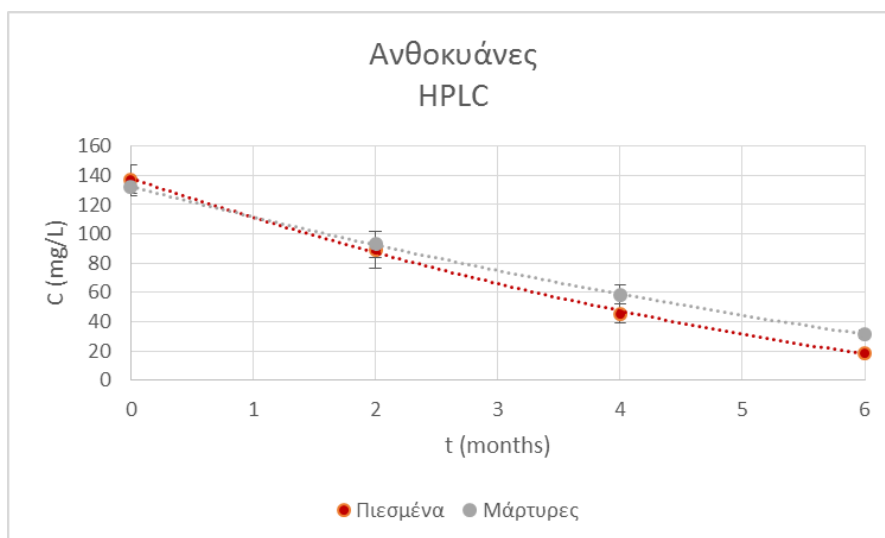
| % Μείωση | | | |
|----------|-------|--------|-------|
| | 2M | 4M | 6M |
| Πιεσμένα | 13.46 | 39.69 | 53.36 |
| Μάρτυρες | 8.02 | 33.099 | 43.87 |

Εξετάζοντας τα επιμέρους δείγματα, δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά στην συγκέντρωση ανθοκυανών μεταξύ πιεσμένων και απίεστων δειγμάτων, ούτε μετά από 6 μήνες. Μοναδική εξαίρεση, τα δείγματα με μηδενική θείωση τα οποία παρουσίασαν διαφορές από τον δεύτερο κιόλας μήνα. Πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να ήταν το γεγονός ότι η απουσία SO₂, αφήνει ελεύθερα τα ηλεκτρονιόφιλα κέντρα των ανθοκυανών διευκολύνοντας έτσι των πολυμερισμό τους, ειδικά στην περίπτωση που ο οίνος υποβάλλεται σε HHP. Παράλληλα, η HHP έχει την δυνατότητα να μεταβάλει την ισορροπία μεταξύ των διαφόρων μορφών του θειώδους ανυδρίτη στους οίνους, επηρεάζοντας τη δέσμευση του από τα ηλεκτρονιόφιλα κέντρα των ανθοκυανών (Tao et al., 2012). Ωστόσο, με βάση τα δεδομένα για το mDP που παρατίθενται πιο κάτω, πιθανότερη εξήγηση αποτελεί ο μεγαλύτερος βαθμός οξειδωσης των ανθοκυανών από υψηλής δραστηκότητας ελεύθερες ρίζες που παράγονται κατά την εφαρμογή HHP (Bolumar, Skibsted, & Orlie, 2012b; Clariana, et al., 2011)



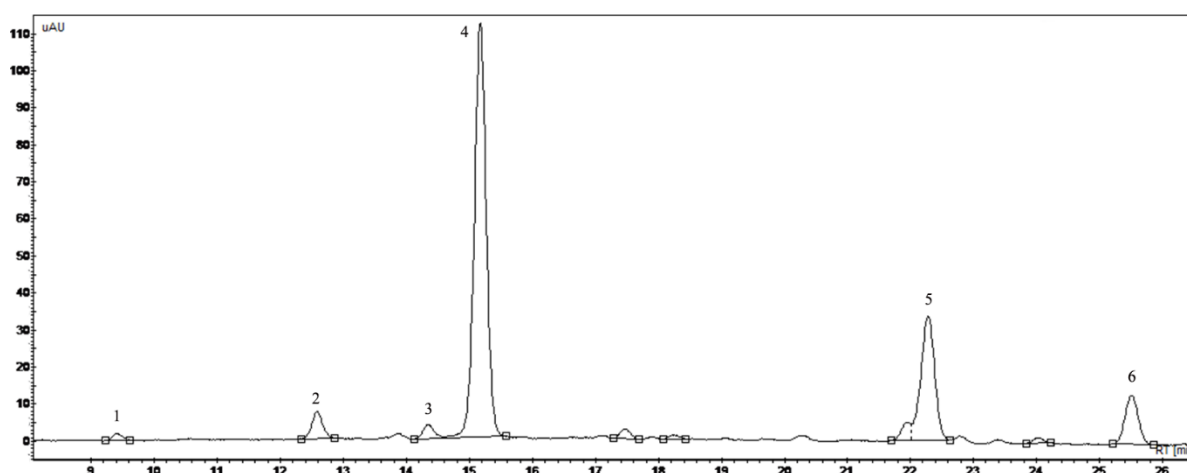
Γράφημα 6 Συγκέντρωση των ανθοκυανών για τα δείγματα με 0 ppm, 30 ppm, 60 ppm και 100 ppm SO₂ στους 6 μήνες παλαιώσης τους. Οι μπάρες δείχνουν το ± τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$)

Μέσω του προσδιορισμού των επιμέρους ανθοκυανών με HPLC, παρατηρήθηκε η ίδια πτωτική τάση στο σύνολο των ανθοκυανών. Ωστόσο, καταγράφηκαν χαμηλότερες τιμές στη συγκέντρωσή τους και αυτό ίσως να οφείλεται σε συμπλοκοποίηση με ταννίνες και άλλες ανθοκυάνες, με αποτέλεσμα τη δημιουργία πολυμερών που δεν ανιχνεύονται με HPLC (Bakker, Preston, & Timberlake, 1986).



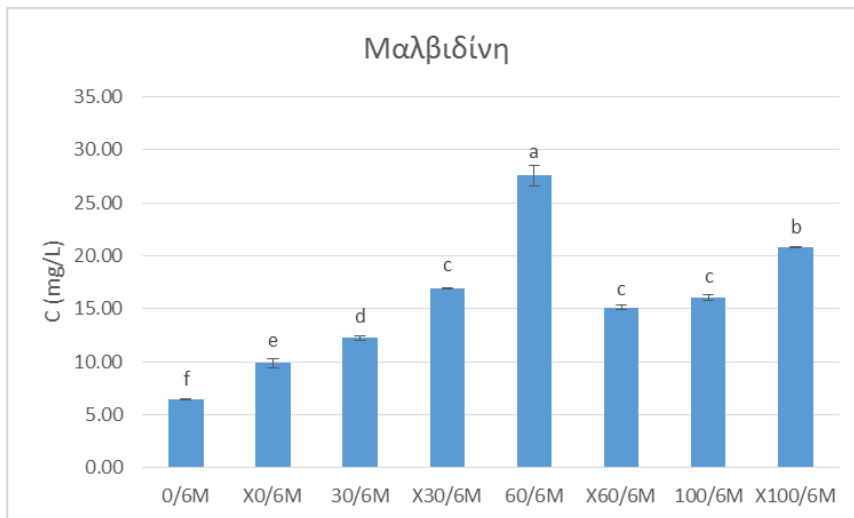
Γράφημα 7 Εξέλιξη στη συγκέντρωση των ανθοκυανών που μετρήθηκαν με την βοήθεια της HPLC, πιεσμένων και απίεστων δειγμάτων κατά τη διάρκεια 6 μηνών. Οι μπάρες δείχνουν το ± τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών.

Κυρίαρχο είδος για τα δείγματα αποτελούσε η μαλβιδίνη όπως ήταν αναμενόμενο (Castañeda-onando, et al., 2009), σε μικρότερες συγκεντρώσεις εντοπίστηκαν ο οξικός και ο κουμαρικός εστέρας της μαλβιδίνης, ενώ οι μικρότερες συγκεντρώσεις καταγράφηκαν για τη δελφινιδίνη, πετουνιδίνη και πεονιδίνη. Για όλες τις μονομερείς ανθοκυάνες, η συγκέντρωσή τους στα εξεταζόμενα δείγματα σταδιακά μειώθηκε. Το γεγονός αυτό ενισχύει την άποψη ότι η μείωση που παρατηρήθηκε στο σύνολο των ανθοκυανών, οφείλεται σε αντιδράσεις συμπύκνωσης των μονομερών, με αποτέλεσμα τη μείωση τους (Fernández et al., 2003; Romero & Bakker, 2000).



Εικόνα 23 Χρωματογράφημα που απεικονίζει τις ανθοκυάνες στα δείγματα οίνου. 1) 3-O-μονογλυκοζίτες της δελφινιδίνης (Dlp), 2) της πετουνιδίνης (Pt), 3) της παιονιδίνης (Pn), 4) της μαλβιδίνης (Mlv), 5) ο οξικός εστέρας της μαλβιδίνης (MlvAc) και 6) ο κουμαρικός εστέρας της μαλβιδίνης (MlvCoum)

Εν τέλει, πηγή της ύπαρξης ή όχι στατιστικά σημαντικών διαφορών στα επιμέρους δείγματα που σημειώθηκαν προηγουμένως, φαίνεται να είναι κατά κύριο λόγο η μαλβιδίνη που ήταν και το κυρίαρχο είδος. Στατιστικές διαφορές μεταξύ των πιεσμένων δειγμάτων με 0 ppm, 30 ppm, 60 ppm και 100 ppm θειώδους και στους αντίστοιχους μάρτυρες σημειώθηκαν στους 6 μήνες.



Γράφημα 8 Συγκέντρωση της μαλβιδίνης για τα δείγματα με 0 ppm, 30 ppm, 60 ppm και 100 ppm SO₂ στους 6 μήνες παλαίωσης τους. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$)

3.3 Συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων, προανθοκυανιδινών και μέσος βαθμός πολυμερισμού ταννινών

Στο υποκεφάλαιο αυτό παρατίθενται τα αποτελέσματα από την μέτρηση της συγκέντρωσης του συνόλου των φαινολικών ενώσεων και των προανθοκυανιδινών με τον 'One analyser', του μέσου βαθμού πολυμερισμού των ταννινών (mDP), καθώς επίσης και του ποσοστού των προδελφινιδών (%P) και του βαθμού εστεροποίησης με γαλλικό οξύ (%G). Για την μέτρηση του συνόλου των φαινολικών ενώσεων και των προανθοκυανιδινών με τη βοήθεια του 'One analyser' δεν χρειάστηκε η δημιουργία πρότυπης καμπύλης. Αντιθέτως, ο προσδιορισμός των mDP, %P και %G που πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια της HPLC, δημιουργήθηκαν πρότυπες καμπύλες με τον τρόπο που περιγράφεται στο υποκεφάλαιο 2.11.3. Με την βοήθεια των πρότυπων υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις των επιμέρους προανθοκυανιδινών. Οι πρότυπες καμπύλες για την κατεχίνη, την επικατεχίνη, τον γαλλικό εστέρα της επικατεχίνης, την επιγαλλοκατεχίνη και τις αντίστοιχες επεκτατικές υπομονάδες τους φαίνονται πιο κάτω. Τα mDP, %P και %G υπολογίστηκαν ως εξής

Μέσος βαθμός πολυμερισμού:

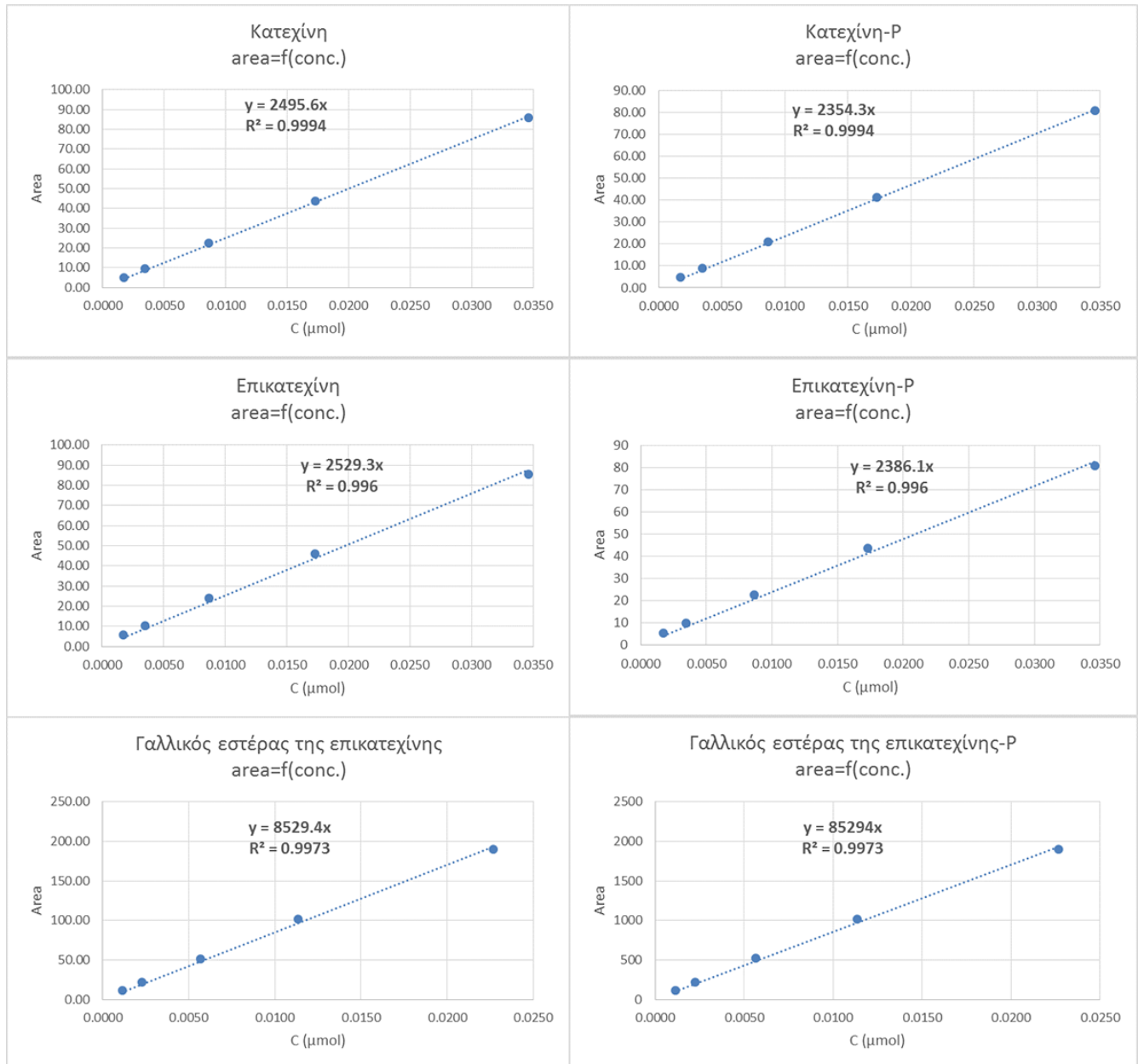
$$\text{mDP} = \frac{\Sigma (\text{επεκτατικές} + \text{τερματικές υπομονάδες})}{\Sigma (\text{τερματικές υπομονάδες})}, \text{ σε mol}$$

Βαθμός εστεροποίησης με γαλλικό οξύ:

$$\%G=100*(EGGe+EGGt)/\Sigma(\text{επεκτατικές}+\text{τερματικές υπομονάδες}), \text{ σε mol}$$

Ποσοστό προδελφινιδών:

$$\%P=100*(EGCe+EGCt)/\Sigma(\text{επεκτατικές}+\text{τερματικές υπομονάδες}), \text{ σε mol}$$



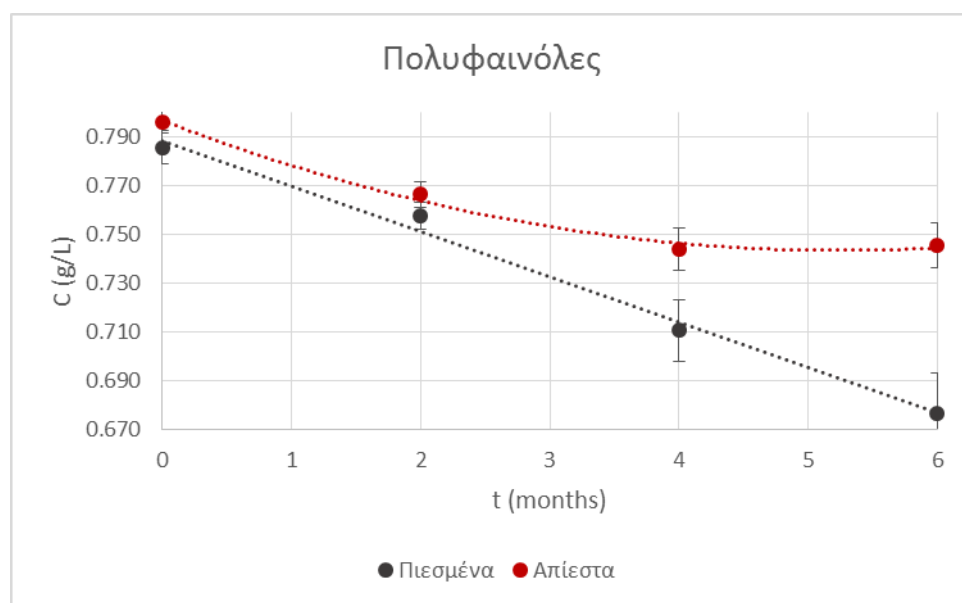
Γράφημα 9 Πρώτύτες καμπύλες για την κατεχίνη, την επικατεχίνη, το γαλλικό εστέρα της επικατεχίνης και τις αντίστοιχες επεκτατικές υπομονάδες τους που δηλώνονται με P (phloroglucinol) δίπλα από το όνομα

Φαινολικές ενώσεις

Η συγκέντρωση των πολυφαινολών παρουσίασε πτωτική πορεία. Μεγαλύτερη πτώση παρατηρήθηκε για τα δείγματα τα οποία υποβλήθηκαν σε HHP. Η μείωση της συγκέντρωσης τους μετά από 6 μήνες ήταν σχεδόν διπλάσια (13.9 % με την αντίστοιχη τιμή για τα δείγματα μάρτυρες να είναι μόλις 6.3%).

Πίνακας 6 Ποσοστιαία μείωση στην συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων

| % Μείωση | | | |
|----------|------|------|-------|
| | 2M | 4M | 6M |
| Πιεσμένα | 3.58 | 9.55 | 13.87 |
| Μάρτυρες | 3.71 | 6.53 | 6.34 |

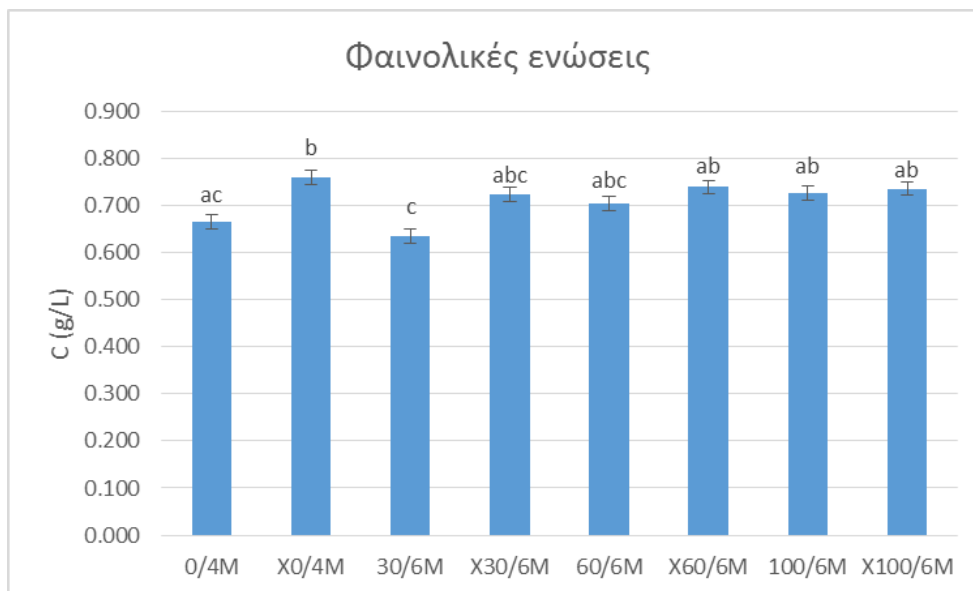


Γράφημα 10 Εξέλιξη στη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων πιεσμένων και απίεστων δειγμάτων κατά τη διάρκεια 6 μηνών. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών

Η παρατηρούμενη μείωση στη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων στην παρούσα ερευνητική εργασία είναι σύμφωνη με προηγούμενες μελέτες (Santos et al., 2016; Tao et al., 2012). Στις εργασίες αυτές, η μείωση των φαινολικών είχε αποδοθεί είτε στη δημιουργία υψηλής δραστηρότητας ελευθέρων ριζών που δρούσαν καταλυτικά στην οξείδωση τους (Bolumar, Skibsted, & Orlien, 2012; Clariana, et al., 2011), είτε σε αντιδράσεις

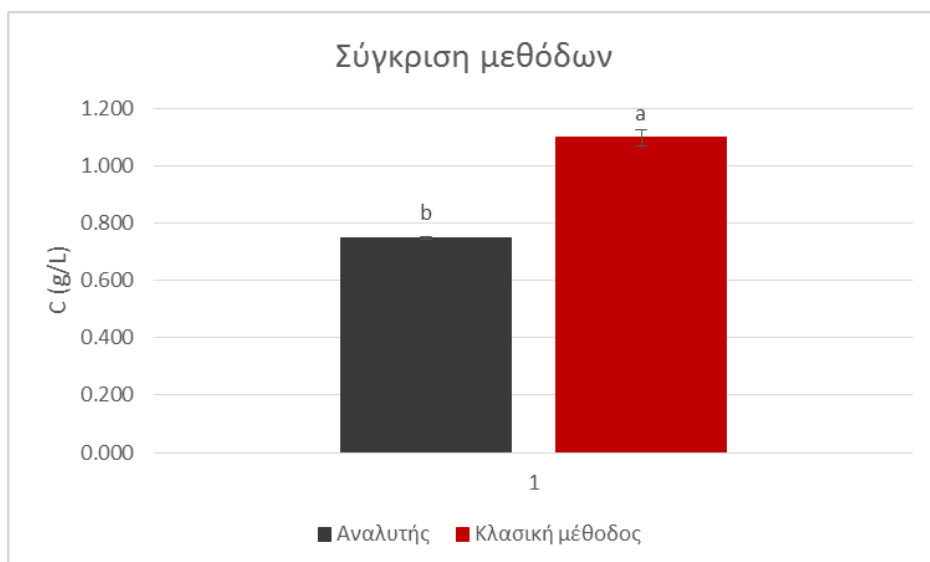
πολυμερισμού, συμπύκνωσης και καταβύθισης τους (Fernández et al., 2003). Η πτωτική αυτή τάση που παρατηρείται και κατά τη φυσική παλαίωση των οίνων (δείγματα μάρτυρες), θα μπορούσε να επιταχυνθεί με εφαρμογή HHP (πιεσμένα δείγματα).

Εξετάζοντας τα επιμέρους δείγματα δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά στην συγκέντρωση πολυφαινολών μεταξύ πιεσμένων και απίεστων δειγμάτων, ούτε μετά από 6 μήνες. Μοναδική εξαίρεση τα δείγματα με 0 ppm τα οποία παρουσίασαν διαφορές στον 4^ο μήνα και 30 ppm SO₂ τα οποία παρουσίασαν διαφορές στον 6^ο μήνα. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να ευθύνεται (όπως και στην περίπτωση των ανθοκυανών), στη διαφορετική δυνατότητα προσβολής των ηλεκτρονιοφίλων κέντρων λόγω εφαρμογής HHP ή/ και της ύπαρξης ή όχι του SO₂.



Γράφημα 11 Συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων για τα δείγματα με 0 ppm, 30 ppm, 60 ppm και 100 ppm SO₂ στους 6 μήνες παλαίωσης τους. Οι μπάρες δείχνουν το ± τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$)

Συγκρίνοντας τα δεδομένα που προέκυψαν από τον αναλυτή με αυτά από την κλασική μέθοδο, φαίνεται πως με τον αναλυτή η μέτρηση σε απόλυτη τιμή είναι χαμηλότερη αλλά υπάρχει μικρότερο τυπικό σφάλμα. Επίσης, οι δύο μέθοδοι παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές, που μάλλον οφείλονται στη μέτρηση της απορρόφησης σε διαφορετικό μήκος κύματος και στο μικρότερο χρόνο επώασης των δειγμάτων στην περίπτωση του αναλυτή.

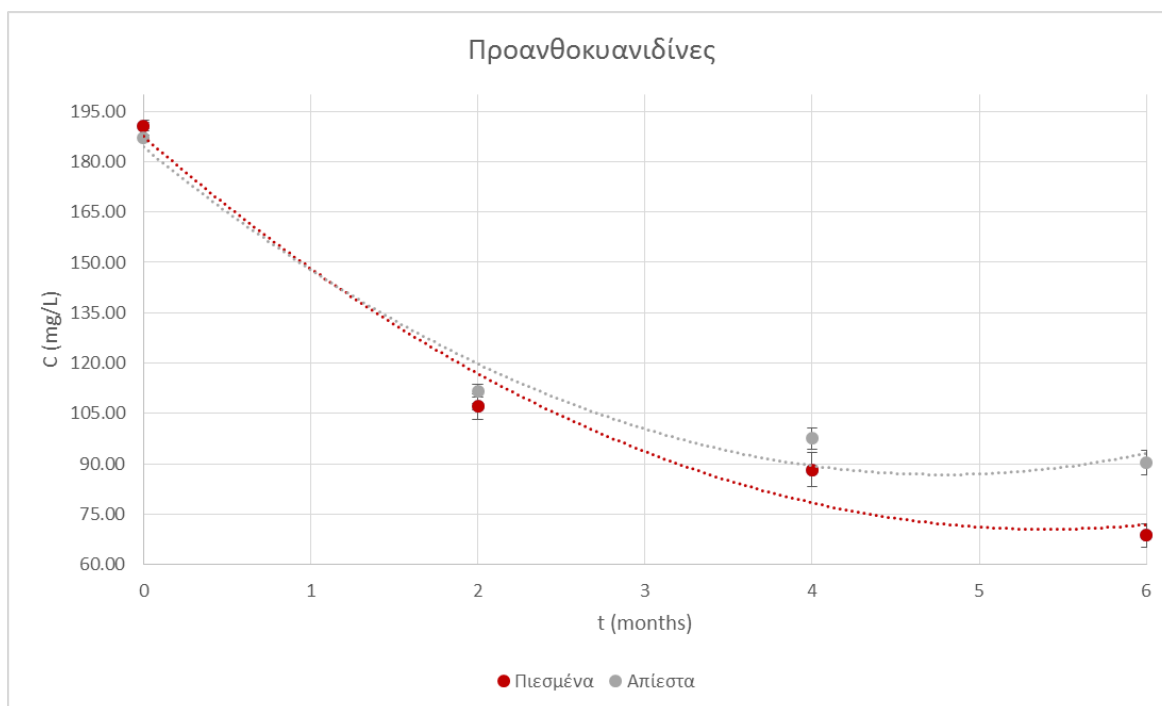


Γράφημα 12 Σύγκριση της συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων όπως μετρήθηκαν με τον 'One' και με την κλασική μέθοδο. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$)

Πρόσθετη ένδειξη που συγκλίνει στην άποψη ότι η ΗΗΡ μπορεί να επιταχύνει την παλαίωση των οίνων, ενισχύοντας τον πολυμερισμό φαινολικών ενώσεων και ανθοκυανών, αποτελεί η πτωτική πορεία που σημειώθηκε και για τις προανθοκυανιδίνες καθ' όλη την διάρκεια των 6 μηνών. Μεγαλύτερη πτώση παρατηρήθηκε για τα δείγματα τα οποία είχαν υποβληθεί σε ΗΗΡ. Η μείωση της συγκέντρωσης τους μετά από 6 μήνες ήταν 64.0 % σε αντίθεση με τα δείγματα μάρτυρες για το οποία η πτώση αυτή ήταν 51.7 %.

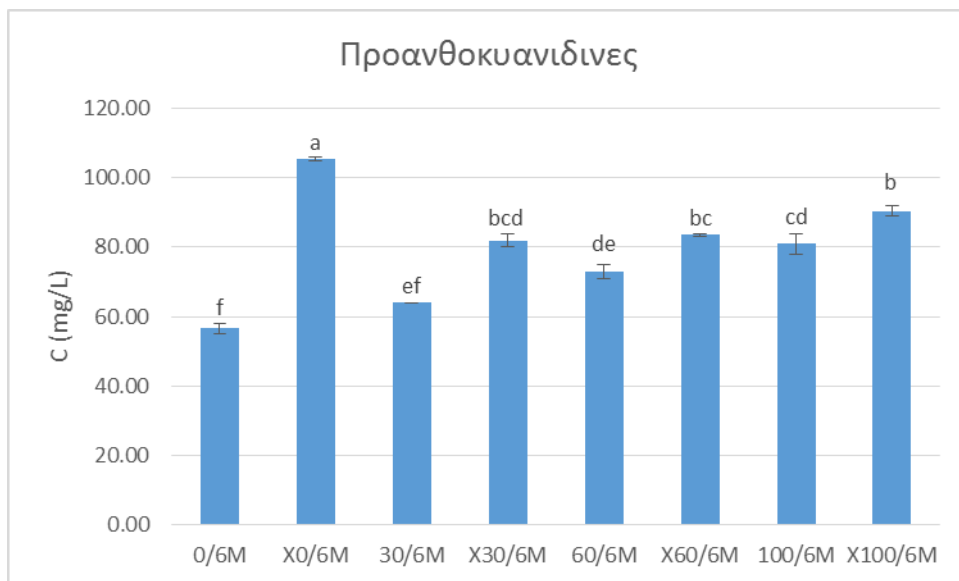
Πίνακας 7 Ποσοστιαία μείωση στη συγκέντρωση των προανθοκυανιδινών

| | % Μείωση | | |
|----------|----------|-------|-------|
| | 2M | 4M | 6M |
| Πεσμένα | 43.91 | 53.74 | 64.02 |
| Μάρτυρες | 40.24 | 47.86 | 51.67 |



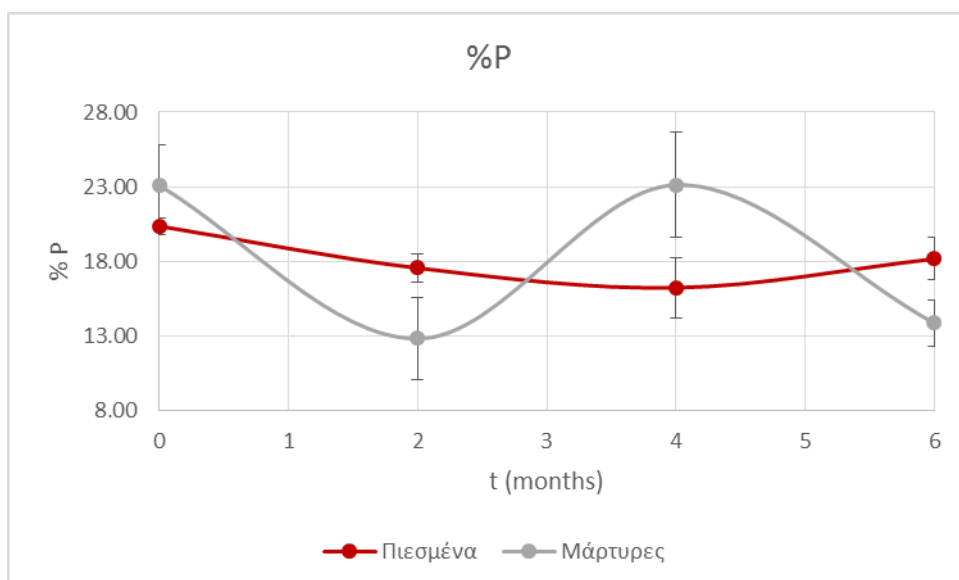
Γράφημα 13 Εξέλιξη στη συγκέντρωση των μονομερών προανθοκυανιδινών πιεσμένων και απίεστων δειγμάτων κατά τη διάρκεια 6 μηνών. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών

Εξετάζοντας τα επιμέρους δείγματα αρχικά, όπως και στη βιβλιογραφία δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές (Santos et al., 2016). Διαφορές στην συγκέντρωση των προκυανιδινών μεταξύ πιεσμένων και απίεστων δειγμάτων, παρατηρήθηκαν μετά από 2 μήνες για τα δείγματα με 0 ppm SO₂ και μετά από 6 μήνες για τα δείγματα με 30 ppm, 60 ppm και 100 ppm SO₂.



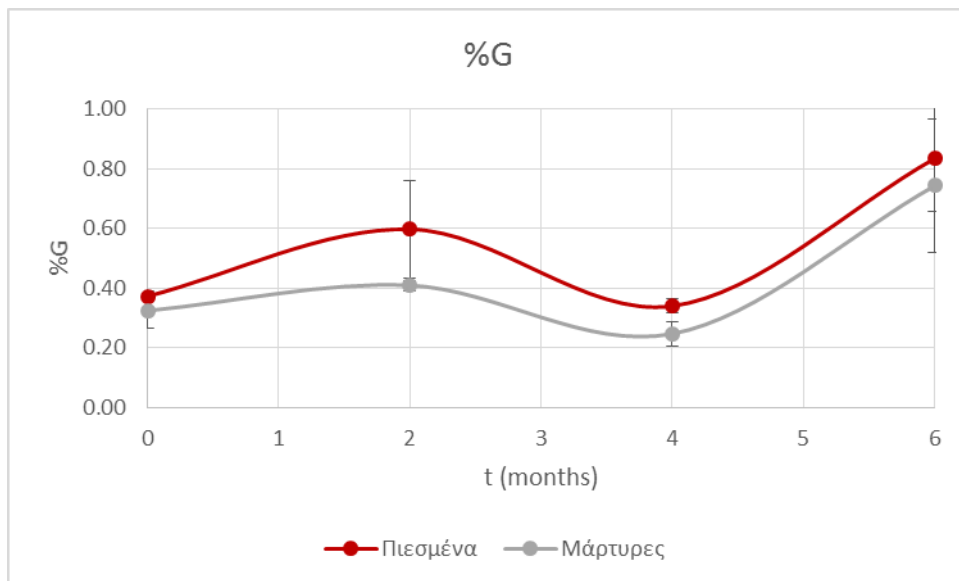
Γράφημα 14 Συγκέντρωση των προανθοκυανιδινών για τα δείγματα με 0 ppm, 30 ppm, 60 ppm και 100 ppm SO₂ στους 6 μήνες παλαίωσης τους. Οι μπάρες δείχνουν το ± τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$)

Το ποσοστό των προανθοκυανιδινών (%P) για τους μάρτυρες (σε σχέση πάντα με τα κατεργασμένα δείγματα), σημείωσε μεγαλύτερες αυξομειώσεις, χαρακτηριστικό των νεαρών οίνων στους οποίους πραγματοποιούνται συνεχείς μεταβολές στη φαινολική σύσταση.



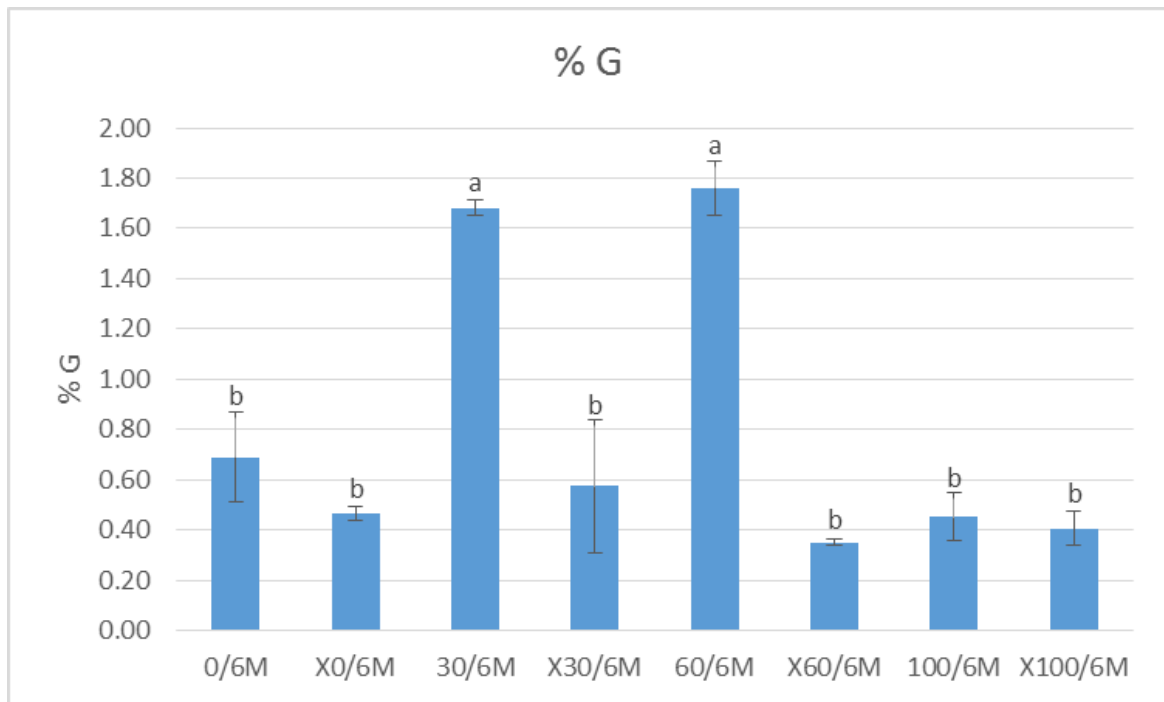
Γράφημα 15 Μεταβολή στο %P πιεσμένων και άπιεστων δειγμάτων κατά τη διάρκεια 6 μηνών. Οι μπάρες δείχνουν το ± τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών

Το ποσοστό των υπομονάδων που φέρουν εστέρες του γαλλικού οξέος σε όλα τα δείγματα, παρουσίασε συνεχείς αυξομειώσεις κατά τη διάρκεια των 6 μηνών, ενδεχομένως λόγω συνεχόμενων αντιδράσεων εστεροποίησης και υδρόλυσης που πραγματοποιούνται στους οίνους. Παρά το γεγονός ότι κατεργασμένα με ΗΗΡ δείγματα και μάρτυρες παρουσίασαν την ίδια τάση, η τελική αύξηση για τα πιεσμένα δείγματα ήταν μεγαλύτερη από τους μάρτυρες.



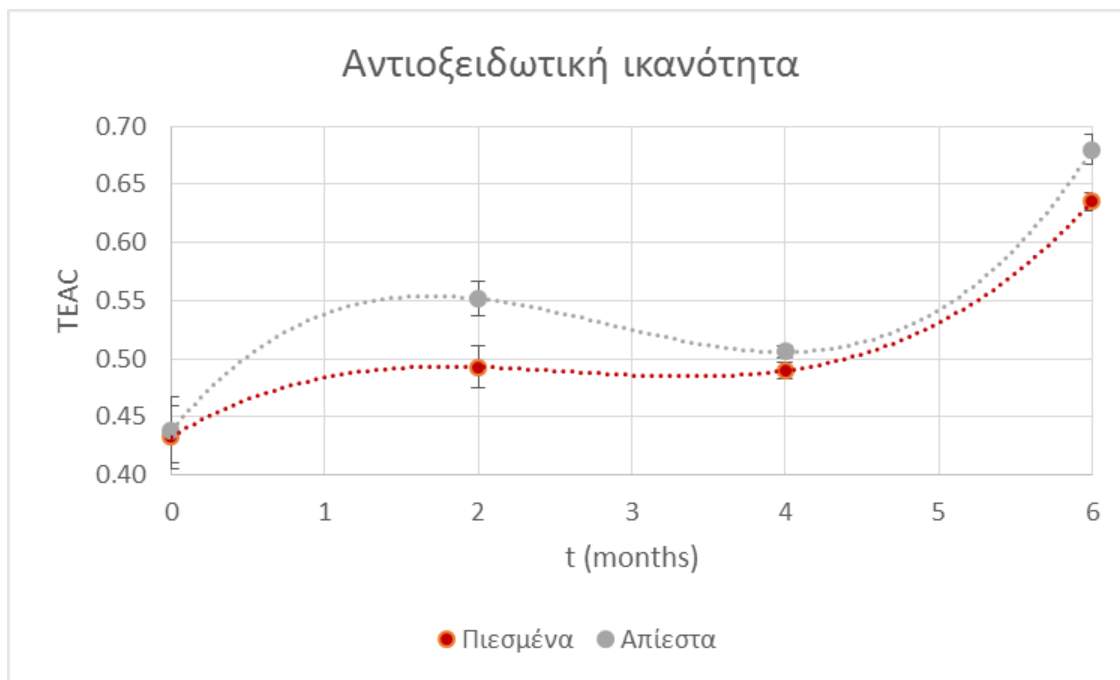
Γράφημα 16 Μεταβολή στο %G πιεσμένων και απίεστων δειγμάτων κατά τη διάρκεια 6 μηνών. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών

Στατιστικά σημαντικές διαφορές ωστόσο παρατηρήθηκαν μόνο μεταξύ πιεσμένων και απίεστων δειγμάτων με 30 και 60 ppm SO_2 . Στις περιπτώσεις αυτές τα πιεσμένα δείγματα, σημείωσαν μεγαλύτερες τιμές %G σε σχέση με τους μάρτυρες. Αυτό θα μπορούσε να αποτελεί την πρώτη ένδειξη για αύξηση της συτπτικότητας των οίνων με ενδιάμεσες τιμές SO_2 όταν υποβληθούν σε ΗΗΡ. Σε ακραίες τιμές SO_2 η απουσία στατιστικά σημαντικών διαφορών, ίσως να ωφείλεται είτε στην κατάληψη των πυρηνόφιλων κέντρων στο μεγαλύτερο ποσοστό από το γαλλικό οξύ (περίπτωση 0 ppm), είτε από το SO_2 (100 ppm).



Γράφημα 17 Ποσοστό των υπομονάδων που φέρουν εστέρες του γαλλικού οξέος σε όλα τα δείγματα μετά από 6 μήνες. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$)

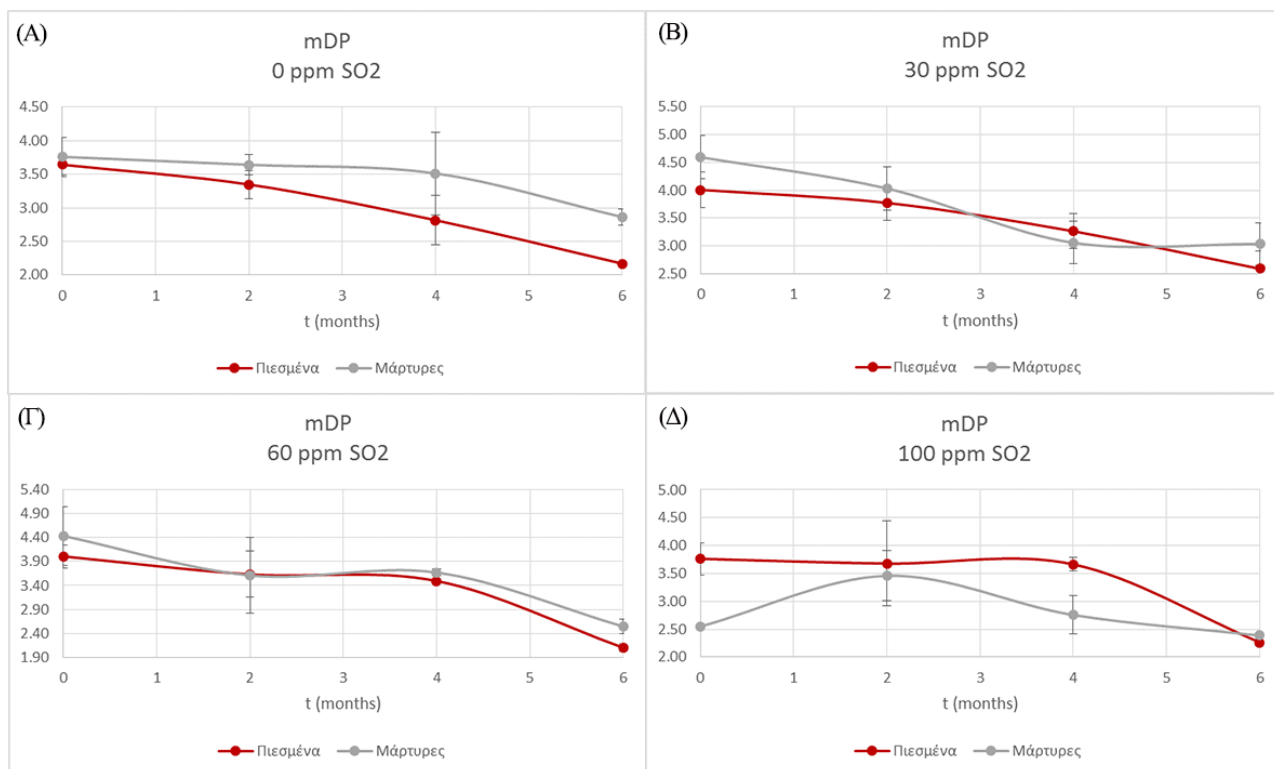
Η αύξηση του ποσοστού εστεροποίησης των δειγμάτων ίσως τελικά να ήταν και ο λόγος για την αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας (AOA) που καταγράφηκε με την πάροδο του χρόνου (Ricardo-da-silva, et al., 1991). Η αυξανόμενη αυτή τάση της AOA έρχεται σε αντίθεση με την υπάρχουσα βιβλιογραφία που υποστηρίζει την παράλληλη μείωση της με την πτώση των φαινολικών ενώσεων. Ωστόσο, συγκρίνοντας την AOA των δειγμάτων που υποβλήθηκαν σε HHP με την AOA των μαρτύρων ο παραλληλισμός αυτός φαίνεται να ισχύει, αφού στα πιεσμένα δείγματα σημειώθηκαν μικρότερες τιμές τόσο για τη συγκέντρωση φαινολικών, όσο και για την AOA (Leeuw, et al., 2014).



Γράφημα 18 Μεταβολή στην AOA πιεσμένων και απίεστων δειγμάτων κατά τη διάρκεια 6 μηνών. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών

Το εύρος των τιμών για το mDP για τους εξεταζόμενους οίνους κυμάνθηκε μεταξύ 2.10 και 4.59. Παρόμοιες τιμές έχουν καταγραφεί και σε προηγούμενες ερευνητικές εργασίες, με το εύρος να εκτείνεται από 2.10 μέχρι 9.6 (Cosme, Ricardo-da-silva, & Laureano, 2009). Τα δείγματα τα οποία υποβλήθηκαν σε HHP με 0 ppm, 30 ppm και 60 ppm SO₂ παρουσίασαν μικρότερες τιμές mDP σε σχέση με τα αντίστοιχα δείγματα μάρτυρες, σε αντίθεση με τα δείγματα με 100 ppm SO₂. Το γεγονός αυτό ενισχύει την κυριαρχούσα άποψη, για επίδραση της HHP στην ισορροπία των διαφόρων μορφών του SO₂ και τελικά στη δέσμευση του από τις φαινολικές ενώσεις του οίνου (Tao et al., 2012).

Γενικότερα, όλα τα δείγματα παρουσίασαν πτώση στο mDP με την πάροδο του χρόνου. Αυτό ίσως οφείλεται τόσο στην ευκολότερη υποβάθμιση και καταβύθιση (μετά τη συμπύκνωση τους με άλλα μόρια όπως η πρωτεΐνες) των προανθοκυανιδινών με μεγαλύτερο μοριακό βάρος (Cheynier, et al., 1997; Cosme, Ricardo-Da-Silva, & Laureano, 2009), όσο και σε αντιδράσεις αποπολυμερισμού που μπορούν να λάβουν χώρα σε όξινο περιβάλλον όπως το κρασί (Vidal, et al., 2002).



Γράφημα 19 Μεταβολή στο mDP πιεσμένων και απίεστων δειγμάτων κατά τη διάρκεια 6 μηνών. (Α) Δείγματα με 0 ppm SO₂ (Β) Δείγματα με 30 ppm SO₂ (Γ) Δείγματα με 60 ppm SO₂ (Δ) Δείγματα με 100 ppm SO₂. Οι μπάρες δείχνουν το ± τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών

Μεγαλύτερη διαφορά στη μείωση του mDP μεταξύ πιεσμένων και απίεστων δειγμάτων μετά από 6 μήνες, σημειώθηκε για τα δείγματα με 0 ppm και 100 ppm SO₂. Στη πρώτη περίπτωση (0 ppm) λόγω μεγαλύτερης διαφοράς στην τελική τιμή, μάλλον λόγω μεγαλύτερου βαθμού οξείδωσης των προανθοκυανιδινών από ελεύθερες ρίζες στην περίπτωση των κατεργασμένων με HHP δειγμάτων (Bolumar et al., 2012b). Αντίθετα, στη δεύτερη περίπτωση (100 ppm) λόγω μεγαλύτερης διαφοράς στην αρχική τιμή. Η μεγαλύτερη αρχική τιμή mDP για το πιεσμένο δείγμα, ενδεχομένως να προέκυψε από το μεγαλύτερο βαθμό διάλυσης του O₂ κατά την εφαρμογή της HHP, που προάγει τις αντιδράσεις πολυμερισμού, σε συνδυασμό με την προστασία που παρέίχε ο SO₂ (Santos et al., 2016). Μετά την κατανάλωση του SO₂ (4^{ος} μήνας), παρατηρήθηκε και η αντίστοιχη μείωση στο mDP.

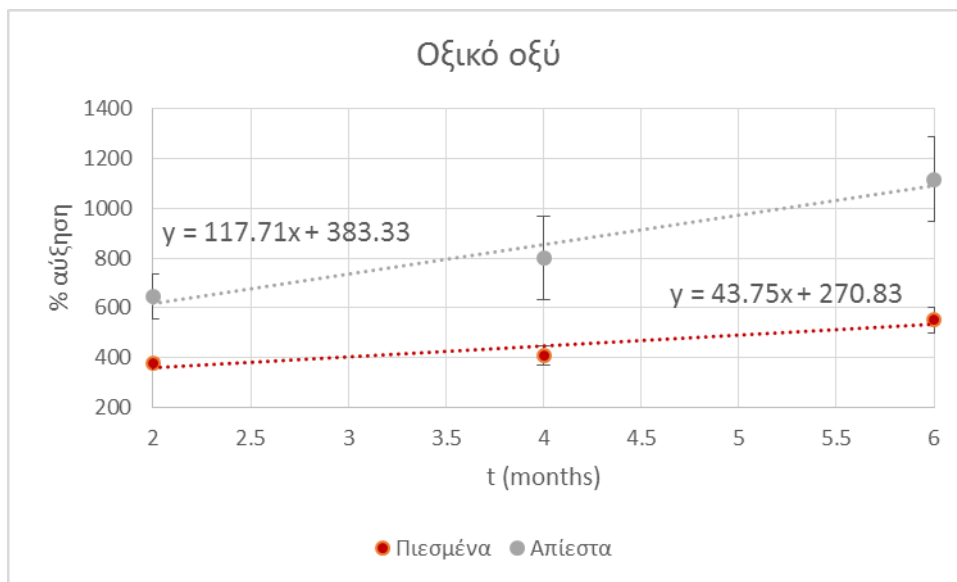
Πίνακας 8 Ποσοστιαία μείωση του mDP μετά από 6 μήνες

| % Μείωση mDP μετά από 6 μήνες | | | | |
|-------------------------------|-------|--------|--------|---------|
| SO ₂ | 0 ppm | 30 ppm | 60 ppm | 100 ppm |
| Πιεσμένα | 40.46 | 35.32 | 47.54 | 39.85 |
| Απίεστα | 23.84 | 33.88 | 42.62 | 6.35 |

Παρά τις γενικές διαφορές που παρατηρήθηκαν, δε σημειώθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές για κανένα από τα δείγματα.

3.4 Πτητική οξύτητα

Στο υποκεφάλαιο αυτό παρατίθενται τα αποτελέσματα από την μέτρηση της συγκέντρωσης του οξικού οξέος με τον ‘One analyser’. Κατά τη διάρκεια των 6 μηνών παρατηρήθηκε αύξηση στη συγκέντρωση του οξικού οξέος, τόσο για τα δείγματα που υποβλήθηκαν σε HHP όσο και για τα δείγματα μάρτυρες. Ωστόσο, ο ρυθμός αύξησης για τα πιεσμένα δείγματα ήταν μικρότερος σε σχέση με τους μάρτυρες ($\lambda_{\pi} < \lambda_{\mu}$).



Γράφημα 20 Αύξηση της συγκέντρωσης του οξικού οξέος πιεσμένων και απίεστων δειγμάτων κατά τη διάρκεια 6 μηνών. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών

Πίνακας 9 Ποσοστιαία μείωση της συγκέντρωσης του οξικού οξέος

| % αύξηση | | | |
|----------|--------|--------|---------|
| | 2M | 4M | 6M |
| Πιεσμένα | 377.08 | 408.33 | 552.08 |
| Απίεστα | 645.83 | 800.00 | 1116.67 |

Με βάση τόσο τη μικρότερη αυτή αύξηση στη συγκέντρωση του οξικού οξέος όσο και όλα τα προηγούμενα αποτελέσματα, θα μπορούσε να ειπωθεί ότι η ΗΗΡ δύναται να χρησιμοποιηθεί στην οινοποίηση για να επιταχύνει τις φυσικές διαδικασίες παλαίωσης, διατηρώντας σε χαμηλότερα επίπεδα τη πτητική οξύτητα.

4 Συμπεράσματα και μελλοντική έρευνα

4.1 Συμπεράσματα

Από την ανάλυση των πειραματικών αποτελεσμάτων προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

Από μικροβιολογική σκοπιά η υποβολή των οίνων σε υψηλές πιέσεις είναι εύλογη για τις περιπτώσεις επιμόλυνσης τους, είτε στα πρώιμα στάδια της ζύμωσης είτε στο στάδιο της παλαίωσης από τα βαρέλια και τους φελλούς. Στις περιπτώσεις όπου η αλκοολική και η μηλογαλακτική ζύμωση ολοκληρώνονται χωρίς προβλήματα και το μικροβιακό φορτίο είναι αμελητέο, σε συνδυασμό με την άμεση εμφιάλωση τους, η εφαρμογή HHP δεν μεταβάλλει το μικροβιακό προφίλ.

Από φυσικοχημική σκοπιά, η εφαρμογή HHP δύναται να επιφέρει αλλαγές που εξαρτώνται από τη συγκέντρωση SO_2 . Γενικά με την υποβολή των δειγμάτων σε υψηλές πιέσεις παρατηρείται μείωση στη συγκέντρωση των σημαντικότερων φαινολικών ενώσεων που μελετήθηκαν, όπως οι μονομερείς ανθοκυάνες και οι προανθοκυανιδίνες. Η μείωση αυτή ενδεχομένως οφείλεται σε οξείδωση τους από υψηλής δραστηριότητας ρίζες που παράγονται κατά την εφαρμογή HHP ή/και σε αντιδράσεις συμπύκνωσης και πολυμερισμού που τελικά οδηγούν στην καταβύθιση τους. Οι αντιδράσεις αυτές φαίνεται να εξαρτώνται από τη συγκέντρωση SO_2 , ο οποίος σε υψηλές συγκεντρώσεις προστατεύει από τις χημικές οξειδώσεις ευνοώντας έτσι τις αντιδράσεις πολυμερισμού, ενώ σε ενδιάμεσες τιμές ευνοεί την εστεροποίηση των προανθοκυανιδινών με το γαλλικό οξύ (ένδειξη για πιθανή αύξηση της στυπτικότητας). Περαιτέρω μελέτη μέσω οργανοληπτικής εξέτασης των δειγμάτων είναι απαραίτητη, για να προσδιοριστούν τελικά τα επίπεδα στυπτικότητας στα δείγματα τα οποία υποβλήθηκαν σε HHP και στους μάρτυρες. Επιπρόσθετα, η μεγαλύτερη αύξηση στην απόχρωση, στο %Y και στο %B, σε συνδυασμό με τη μεγαλύτερη μείωση του %R, αποτελούν πρόσθετες ενδείξεις για επιτάχυνση των διαδικασιών παλαίωσης στους ερυθρούς οίνους μετά την εφαρμογή HHP. Μάλιστα, η μικρότερη αύξηση της συγκέντρωσης του οξικού οξέος στα πιεσμένα δείγματα, αποτελεί θετική ένδειξη για την ενδεχόμενη χρήση της HHP για επιτάχυνση της παλαίωσης των οίνων.

Τέλος, για να καταλήξουμε σε ασφαλέστερα συμπεράσματα σχετικά με το επίπεδο μείωσης της συγκέντρωσης του SO₂ με τη βοήθεια της HHP, απαιτείται μελέτη για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, τόσο στο φυσικοχημικό προφίλ όσο και στο οργανοληπτικό.

4.2 Μελλοντική έρευνα

Η μελέτη για την εύρεση κατάλληλων νέων συντηρητικών και καινοτόμων τεχνολογιών για τη μείωση των χρησιμοποιούμενων συγκεντρώσεων του SO₂ στους οίνους, αποτελεί αντικείμενο έρευνας τα τελευταία χρόνια και η γνώση γύρω από αυτές είναι πολύ περιορισμένη. Ένα πλαίσιο στο οποίο υπάρχουν προοπτικές μελέτης, είναι ο προσδιορισμός της επίδρασης στο μικροβιακό, οργανοληπτικό και φυσικοχημικό προφίλ (συμπεριλαμβανομένου και της αρωματικής σύστασης) ερυθρών και λευκών οίνων, οι οποίοι παράχθηκαν μετά από εφαρμογή HHP σε διάφορα στάδια της οινοποίησης (πριν και μετά την αλκοολική ζύμωση, μετά τη μηλογαλακτική ζύμωση, μετά την παλαίωση τους σε δρύινα βαρέλια και κατά την παραμονή τους σε φιάλες). Επίσης, μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει η αναζήτηση τρόπων αύξησης του δυναμικού παλαίωσης πιεσμένων οίνων, δεδομένης της επιταχυνόμενης παλαίωσης τους που επέρχεται μετά την εφαρμογή HHP.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abee, T., Krockel, L., & Hill, C. (1995). Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *International Journal of Food Microbiology*, 28(2), 169–185.
- Bakker, J., Bridle, P., Bellworthy, S. J., Garcia-Viguera, C., Reader, H. P., & Watkins, S. J. (1998). Effect of sulphur dioxide and must extraction on colour, phenolic composition and sensory quality of red table wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 78(3), 297–307.
- Bakker, J., Preston, N. W., & Timberlake, C. . (1986). The Determination of Anthocyanins in Aging Red Wines : Comparison of HPLC and Spectral Methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 37(2), 121–126.
- Bartowsky, E. J., Costello, P. J., Villa, A., & Henschke, P. a. (2004). The chemical and sensorial effects of lysozyme addition to red and white wines over six months' cellar storage. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 10(2), 143–150.
- Bauernfeind, J. C., & Pinkert, D. M. (1970). Food processing with added ascorbic acid. *Advances in Food Research*, 18(C), 219–315.
- Bergmeyer, H. U. (n.d.). *Methods of Enzymatic Analysis* (Vol. 2). Academic Press, Inc. New York & London.
- Bolumar, T., Skibsted, L. H., & Orlie, V. (2012a). Kinetics of the formation of radicals in meat during high pressure processing. *Food Chemistry*, 134(4), 2114–2120.
- Bolumar, T., Skibsted, L. H., & Orlie, V. (2012b). Kinetics of the formation of radicals in meat during high pressure processing Kinetics of the formation of radicals in meat during high pressure processing. *Food Chemistry*, 134(4), 2114–2120.
- Boulton, R. B., Singleton, Y. L., Bisson, L. ., & Kunkee, R. E. (1996). *Principles and Practices of Winemaking*. New York: Chapman & Hall.

- Bradshaw, M. P., Prenzler, P. D., & Scollary, G. R. (2001). Ascorbic acid-induced browning of (+)-catechin in a model wine system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 934–939.
- Brand-Williams, W Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity, 30, 25–30.
- Brossaud, F., Cheynier, V., & Noble, A. N. N. C. (2001). Bitterness and astringency of grape and wine polyphenols. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 7, 33–39.
- Buckow, R., Schroeder, S., Berres, P., Baumann, P., & Knoerzer, K. (2010). Simulation and evaluation of pilot-scale pulsed electric field (PEF) processing. *Journal of Food Engineering*, 101(1), 67–77.
- Butz, P., & Tauscher, B. (2002). Emerging technologies: Chemical aspects. *Food Research International*, 35(2–3), 279–284.
- Campos, F. M., Couto, J. A., Figueiredo, A. R., Tóth, I. V., Rangel, A. O. S. S., & Hogg, T. A. (2009). Cell membrane damage induced by phenolic acids on wine lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 135(2), 144–151.
- Cao, X., Zhang, Y., Zhang, F., Wang, Y., Yi, J., & Liao, X. (2011). Effects of high hydrostatic pressure on enzymes, phenolic compounds, anthocyanins, polymeric color and color of strawberry pulps. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(5), 877–885.
- Castañeda-ovando, A., Pacheco-hernández, M. D. L., Páez-hernández, M. E., Rodríguez, J. A., & Galán-vidal, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins : A review. *Food Chemistry*, 113(4), 859–871.
- Cejudo-Bastante, M. J., Sonni, F., Chinnici, F., Versari, A., Perez-Coello, M. S., & Riponi, C. (2010). Fermentation of sulphite-free white musts with added lysozyme and oenological tannins: Nitrogen consumption and biogenic amines composition of final wines. *LWT - Food Science and Technology*, 43(10), 1501–1507.

- Cheynier, V., Prieur, C., Guyot, S., Rigaud, J., & Moutounet, M. (1997). The Structures of Tannins in Grapes and Wines and Their Interactions with Proteins. *American Chemical Society*, 661(In wine), 8–81.
- Chira, K., Schmauch, G., Saucier, C., Fabre, S., & Teissedre, P.-L. (2009). Grape Variety Effect on Proanthocyanidin Composition and Sensory Perception of Skin and Seed Tannin Extracts from Bordeaux Wine Grapes (Cabernet Sauvignon and Merlot) for Two Consecutive Vintages (2006 and 2007). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 545–553.
- Chira, K., Zeng, L., Floch, A. Le, Péchamat, L., Jourdes, M., & Teissedre, P.-L. (2015). Compositional and Sensory Characterization of Grape Proanthocyanidins and Oak wood Ellagitannin. *Tetrahedron*, 71, 2999–3006.
- Chung, W., & Hancock, R. E. W. (2000). Action of lysozyme and nisin mixtures against lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 60(1), 25–32.
- Clariana, M., Valverde, J., Wijngaard, H., Mullen, A. M., & Marcos, B. (2011). High pressure processing of swede (*Brassica napus*): Impact on quality properties. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12(2), 85–92.
- Cosme, F., Ricardo-da-silva, J. M., & Laureano, O. (2009). Tannin profiles of *Vitis vinifera* L . cv . red grapes growing in Lisbon and from their monovarietal wines. *Food Chemistry*, 112, 197–204.
- Cosme, F., Ricardo-Da-Silva, J. M., & Laureano, O. (2009). Tannin profiles of *Vitis vinifera* L . cv . red grapes growing in Lisbon and from their monovarietal wines, 112, 197–204.
- Costa, A., Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., & Loureiro, V. (2008). Evaluation of the inhibitory effect of dimethyl dicarbonate (DMDC) against wine microorganisms. *Food Microbiology*, 25(2), 422–427.
- Curko, N., Ganic, K. K., Gracin, L., Đapic, M., Jourdes, M., & Teissedre, P.-L. (2014). Characterization of seed and skin polyphenolic extracts of two red grape cultivars grown in Croatia and their sensory perception in a wine model medium, 145, 15–22.

- Delfini, C., Cersosimo, M., Del Prete, V., Strano, M., Gaetano, G., Pagliara, A., & Ambrò, S. (2004). Resistance screening essay of wine Lactic Acid Bacteria on lysozyme: Efficacy of lysozyme in unclarified grape musts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(7), 1861–1866.
- Delfini, C., Gaia, P., Schellino, R., Strano, M., Pagliara, A., & Ambrò, S. (2002). Fermentability of grape must after inhibition with dimethyl dicarbonate (DMDC). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(20), 5605–5611.
- Divol, B., Strehaiano, P., & Lonvaud-Funel, A. (2005). Effectiveness of dimethyldicarbonate to stop alcoholic fermentation in wine. *Food Microbiology*, 22(2–3), 169–178.
- Downey, M. O., Harvey, J. S., & Robinson, S. P. (2003). Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 9, 15–27.
- Fernández, B., Teresa, H., Cadahía, E., Duenas, M., & Estrella, I. (2003). Phenolic compounds in a Spanish red wine aged in barrels made of Spanish, French and American oak wood. *European Food Research and Technology*, 216, 150–156. <https://doi.org/10.1007/s00217-002-0637-4>
- Fleet, G. H. (1998). *Microbiology of Fermented Foods*. (B. J. B. Wood, Ed.). Blackie academic & professional.
- Fleet, G. H. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 11–22.
- Folin O., C. V. (1927). Tyrosine and Tryptophane in Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 73(2), 627–650.
- Francia-Aricha, E. M., Guerra, M. T., Rivas-Gonzalo, J. C., & Santos-Buelga, C. (1997). New Anthocyanin Pigments Formed after Condensation with flavanols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2262–2266.
- Fredericks, I. N., du Toit, M., & Krügel, M. (2011). Efficacy of ultraviolet radiation as an alternative technology to inactivate microorganisms in grape juices and wines. *Food Microbiology*, 28(3), 510–517.

- Gao, Y. C., Zhang, G., Krentz, S., Darius, S., Power, J., & Lagarde, G. (2002). Inhibition of spoilage lactic acid bacteria by lysozyme during wine alcoholic fermentation. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 8, 76–83.
- García-graells, C., Hauben, K. J. A., & Michiels, C. W. (1998). High-Pressure Inactivation and Sublethal Injury of Pressure- Resistant *Escherichia coli* Mutants in Fruit Juices, 64(4), 1566–1568.
- García-Ruiz, A., Bartolomé, B., Martínez-Rodríguez, A. J., Pueyo, E., Martín-Álvarez, P. J., & Moreno-Arribas, M. V. (2008). Potential of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine. *Food Control*, 19(9), 835–841.
- García-Ruiz, A., Moreno-Arribas, M. V., Martín-Álvarez, P. J., & Bartolomé, B. (2011). Comparative study of the inhibitory effects of wine polyphenols on the growth of enological lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 145(2–3), 426–431.
- Garde-Cerdan, T., Arias-Gil, M., Marselles-Fontanet, A. R., Ancin-Azpilicueta, C., & Martin-Belloso, O. (2007). Effects of thermal and non-thermal processing treatments on fatty acids and free amino acids of grape juice. *Food Control*, 18(5), 473–479.
- Garde-Cerdan, T., Marselles-Fontanet, A. R., Arias-Gil, M., Ancin-Azpilicueta, C., & Martin-Belloso, O. (2008). Influence of SO₂ on the evolution of volatile compounds through alcoholic fermentation of must stabilized by pulsed electric fields. *European Food Research and Technology*, 227(2), 401–408.
- Garde-Cerdan, T., Marselles-Fontanet, A. R., Arias-Gil, M., Martin-Belloso, O., & Ancin-Azpilicueta, C. (2007). Influence of SO₂ on the consumption of nitrogen compounds through alcoholic fermentation of must sterilized by pulsed electric fields. *Food Chemistry*, 103(3), 771–777.
- Gauglitz, G., & Dihn, T. V. (2003). *Handbook of spectroscopy*.
- Giner, J., Ortega, M., Mesegue, M., Gimeno, V., Barbosa-Canovas, G. V., & Martin, O. (2001). Inactivation of peach polyphenoloxidase by exposure to pulsed electric fields. *Journal of Food Science*, 67, 1467–1472.

- Gonzalez-Flores, D., Gamero, E., Garrido, M., Ramirez, R., Moreno, D., Delgado, J., ... Paredes, S. D. (2012). Urinary 6-sulfatoxymelatonin and total antioxidant capacity increase after the intake of a grape juice cv. Tempranillo stabilized with HHP. *Food & Function*, 3(1), 34–39.
- Gould, G. W. (1995). *New Methods of Food Preservation* Gould, G. W. Aspen Publication.
- Griffith, R., & Hammond, E. G. (1989). Generation of Swiss Cheese Flavor Components by the Reaction of Amino Acids with Carbonyl Compounds. *Journal of Dairy Science*, 604–613.
- Gris, E. F., Mattivi, F., Ferreira, E. A., Vrhovsek, U., Filho, D. W., Pedrosa, R. C., & Bordignon-luiz, M. T. (2011). Stilbenes and Tyrosol as Target Compounds in the Assessment of Antioxidant and Hypolipidemic Activity of Vitis vinifera Red Wines from Southern Brazil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 7954–7961.
- Guerrero-Beltrán, J. a, & Barbosa-Cánovas, G. V. (2006). Inactivation of Saccharomyces cerevisiae and polyphenoloxidase in mango nectar treated with UV light. *Journal of Food Protection*, 69(2), 362–368.
- Henschke, P.A. & Jiranek, V. (1993). *Yeasts – metabolism of nitrogen compounds*. In: *Wine Microbiology and Biotechnology*. (F. G.H., Ed.). Amsterdam: Harwood Academic Publishers.
- Ho, W. F., Stuart, B., & Prichard, R. E. (2003). *High Performance Liquid Chromatography*. (R. S. of Chemistry, Ed.).
- Jaenicke, R., Ludemann, H., & Schade, B. C. (1981). High Pressure Effects on the Endothermic Association of Tobacco Mosaic Virus Protein. *European Biophysics Journal*, 7, 195–203.
- Jiranek, V., Grbin, P., Yap, A., Barnes, M., & Bates, D. (2008). High power ultrasonics as a novel tool offering new opportunities for managing wine microbiology. *Biotechnology Letters*, 30(1), 1–6.

- Joyeux, A., Lafon-Ladourcade, S., & Ribereau-Gayon, P. (1984). Metabolism of acetic acid bacteria in grape must: Consequences on alcoholic and malolactic fermentation. *Science Aliment*, 4, 247–255.
- Kahkoken, M. P., & Heinonen, M. (2003). Antioxidant Activity of Anthocyanins and Their Aglycons. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 628–633.
- Kallithraka, S., Bakker, J., & Clifford, M. N. (1998). Evidence that salivary proteins are involved in astrigency. *Journal of Sensory Studies*, 13, 29–43.
- Kallithraka, S., Mohdaly, A. A., Makris, D. P., & Kefalas, P. (2005). Determination of major anthocyanin pigments in Hellenic native grape varieties (*Vitis vinifera* sp .): association with antiradical activity, 18, 375–386.
- K Suzuki, Y. T. (1972). Effect of pressure on biopolymers and model systems. *Symposia of the Society for Experimental Biol.*, 26, 103–124.
- Kennedy, J. A., & Jones, G. P. (2001). Analysis of Proanthocyanidin Cleavage Products Following Acid-Catalysis in the Presence of Excess Phloroglucinol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1740–1746.
- Kennedy, J. A., & Waterhouse, A. L. (2000). Analysis of pigmented high-molecular-mass grape phenolics using ion-pair , normal-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 866, 25–34.
- Keyser, M., Muller, I. A., Cilliers, F. P., Nel, W., & Gouws, P. A. (2008). Ultraviolet radiation as a non-thermal treatment for the inactivation of microorganisms in fruit juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9(3), 348–354.
- Kumar, S. (2006). *Organic Chemistry Spectroscopy of organic compounds*.
- Kupiec, T. (2004). Quality-Control Analytical Methods : High-Performance Liquid Chromatography, 8(3), 223–227.
- Kyrleou, M., Koundouras, S., Kallithraka, S., Theodorou, N., Proxenia, N., & Kotseridis, Y. (2015). Effect of irrigation regime on anthocyanin content and antioxidant activity of *Vitis vinifera* L . cv . Syrah grapes under semiarid conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.

- Lafon-Lafourcade, S., Carre, E., & Ribereau- Gayon, P. (1983). Occurrence of lactic acid bacteria during the different stages of vinification and conservation of wines. *Applied and Environmental Microbiology*, 46, 874–880.
- Leeuw, R. Van, Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J. O., & Dommès, J. (2014). Journal of Food Composition and Analysis Antioxidant capacity and phenolic composition of red wines from various grape varieties : Specificity of Pinot Noir. *Journal of Food Composition and Analysis*, 36(1–2), 40–50.
- Liu, S.-Q., & Pilone, G. J. (2000). An overview of formation and roles of acetaldehyde in winemaking with emphasis on microbiological implications. *International Journal of Food Science and Technology*, (35), 49–61.
- Lorrain, B., Chira, K., & Teissedre, P. L. (2011). Phenolic composition of Merlot and Cabernet-Sauvignon grapes from Bordeaux vineyard for the 2009-vintage: Comparison to 2006, 2007 and 2008 vintages. *Food Chemistry*, 126(4), 1991–1999.
- MacHado, R. M. D., Toledo, M. C. F., & Vicente, E. (2009). Sulfite content in some Brazilian wines: Analytical determination and estimate of dietary exposure. *European Food Research and Technology*, 229(3), 383–389.
- Makris, D. P., Kallithraka, S., & Mamalos, A. (2006). Differentiation of young red wines based on cultivar and geographical origin with application of chemometrics of principal polyphenolic constituents. *Talanta*, 70, 1143–1152.
- Manzocco, L., Quarta, B., & Dri, A. (2009). Polyphenoloxidase inactivation by light exposure in model systems and apple derivatives. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10(4), 506–511.
- Margalith, P. Z. (1981). *Flavor Microbiology*. (C. C. T. Publishers, Ed.). Illinois.
- Marks, A. C., & Morris, J. R. (1993). Ascorbic Acid Effects on the Post-Disgorgement Oxidative Stability of Sparkling Wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, 44(2), 227–231.
- Mataix, E., & Castro, M. D. L. De. (1999). Sequential determination of total and volatile acidity in wines based on a flow injection-pervaporation approach. *Analytica Chimica Acta*, 381, 23–28.

- Mateus, N., Silva, A. M. S., Rivas-Gonzalo, J. C., Santos-Buelga, C., & Freitas, V. (2003). A New Class of Blue Anthocyanin-Derived Pigments Isolated from Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*, 1919–1923.
- Mayen, M., Merida, J., & Medina, M. (1996). Influence of the addition of sulphur dioxide and must hyperoxidation on the phenolic fractions during vinification of Sherry wines. *Food Chemistry*, *56*(1), 7–13.
- McCloskey, L. P., & Mahaney, P. (1981). An enzymatic assay for acetaldehyde in grape juice and wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, *32*, 159 – 162.
- Miyake, T., & Shibamoto, T. (1993). Quantitative Analysis of Acetaldehyde in Foods and Beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1968–1970.
- Monagas, M., Gomez-Cordoves, C., Bartolome, B., Laureano, O., & Ricatdo da Silva, J. M. (2003). Monomeric, ligomeric and polymeric flavan-3-ol composition of Wines and Grapes from *Vitis vinifera* L . Cv . Graciano , Tempranillo , and Cabernet Sauvignon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*, 6475–6481.
- Morata, A., Benito, S., Gonzalez, M. C., Palomero, F., Tesfaye, W., & Suarez-Lepe, J. A. (2012). Cold pasteurisation of red wines with high hydrostatic pressure to control Dekkera/Brettanomyces: Effect on both aromatic and chromatic quality of wine. *European Food Research and Technology*, *235*(1), 147–154.
<https://doi.org/10.1007/s00217-012-1742-7>
- Nakamura, Y., Tsuji, S., & Tonogai, Y. (2003). Analysis of Proanthocyanidins in Grape Seed Extracts, Health Foods and Grape Seed Oils. *Journal of Health Science*, *49*(1), 45–54.
- O'Donnell, C. P., Tiwari, B. K., Bourke, P., & Cullen, P. J. (2010). Effect of ultrasonic processing on food enzymes of industrial importance. *Trends in Food Science and Technology*, *21*(7), 358–367.
- Oliveira, C. M., Ferreira, A. C. S., De Freitas, V., & Silva, A. M. S. (2011). Oxidation mechanisms occurring in wines. *Food Research International*, *44*(5), 1115–1126.
- Ough, C. S., & Amerine, M. A. (1958). Studies on aldehyde production under pressure, oxygen, and agitation. *American Journal of Enology and Viticulture*, *9*, 111 – 122.

- Oxen, P., & Knorr, D. (1993). Baroprotective effect of high solute concentrations against inactivation of *Rhodotorula rubra*, *26*(3), 220–223.
- Pannala, A. S., Chan, T. S., O'Brien, P. J., & Rice-Evans, C. A. (2001). Flavonoid B-Ring Chemistry and Antioxidant Activity : Fast Reaction Kinetics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *282*(5), 1161–1168.
- Paul, K. L., & Morita, R. Y. (1971). Effects of Hydrostatic Pressure and Temperature on the Uptake and Respiration of Amino Acids by a Facultatively Psychrophilic Marine Bacterium '. *Journal of Bacteriology*, *108*(2), 835–843.
- 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*(3), 127–135.
- Perez-Magarino, S., & Gonzalez-San Jose, M. L. (2004). Evolution of Flavanols , Anthocyanins , and Their Derivatives during the Aging of Red Wines Elaborated from Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*, 1181–1189.
- Piyasena, P., Mohareb, E., & McKellar, R. C. (2003). Inactivation of microbes using ultrasound: A review. *International Journal of Food Microbiology*, *87*(3), 207–216.
- Prieur, C., Rigaud, J., Cheynier, V., & Moutounet, M. (1994). Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry*, *36*(3), 781–784.
- Puértolas, E., López, N., Condón, S., Álvarez, I., & Raso, J. (2010). Potential applications of PEF to improve red wine quality. *Trends in Food Science and Technology*, *21*(5), 247–255.
- Puértolas, E., López, N., Condón, S., Raso, J., & Álvarez, I. (2009). Pulsed electric fields inactivation of wine spoilage yeast and bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, *130*(1), 49–55.
- Puertolas, E., Saldana, G., Condon, S., Alvarez, I., & Raso, J. (2010). Evolution of polyphenolic compounds in red wine from Cabernet Sauvignon grapes processed by pulsed electric fields during aging in bottle. *Food Chemistry*, *119*(3), 1063–1070.

- Ramey, D. D., & Ough, C. S. (1980). Volatile Ester Hydrolysis or Formation during Storage of Model Solutions and Wines. *American Chemical Society*, 28(5), 928–934.
- Ramirez, R., Saraiva, J., & Torres, J. A. (2009). Reaction Kinetics Analysis of Chemical Changes in Pressure-Assisted Thermal Processing. *Food Eng Reviews*, (1), 16–30.
- Recueil des Methodes Internationales d' Analyse des Vins et des Mouts. (n.d.). *Organisation Internationale de La Vigne et Du Vin*, 1.
- Renouf, V., Strehaiano, P., & Lonvaud-Funel, A. (2008). Effectiveness of dimethyldicarbonate to prevent *Brettanomyces bruxellensis* growth in wine. *Food Control*, 19(2), 208–216.
- Revilla, I., & González-sanjosé, M. L. (2001). Evolution During the Storage of Red Wines Treated with Pectolytic Enzymes : New Anthocyanin Pigment Formation. *Journal of Wine Research*, 12(3), 183–197.
- Revilla, I., Pérez-Magariño, S., Gonzalez-San Jose, M. L., & Beltran, S. (1999). Identification of anthocyanin derivatives in grape skin extracts and red wines by liquid chromatography with diode-array and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography*, 847, 83–90.
- Ribereau-Gayon, P Glories, Y Maujean, A Dubourdieu, D. (2006). *Handbook of Enology* (2nd ed.). John Wiley & Sons, Ltd.
- Ribereau-Gayon, Pascal Dubourdieu, Denis Doneche, Bernard Lonvaud, A. (2006). *Handbook of Enology The Microbiology of Wine and Vinifications* (2nd ed., Vol. 1). John Wiley & Sons, Ltd.
- Ribereau-Gayon, P., Paul, P., & Glories, Y. (1983). Some interpretations of colour changes in young red wines during their conservation. *Journal of Science of Food Agriculture*, 34, 505–516.
- Ricardo-da-silva, J. M., Cheynier, V., Souquet, J., Moutounet, M., Cabanis, J.-C., & Bourzeix, M. (1991). Interaction of Grape Seed Procyanidins with Various Proteins in Relation to Wine Fining, 57, 111–125.

- Ricardo-da-silva, J. M., Darmon, N., Fernandez, Y., & Mitjavilat, S. (1991). Oxygen Free Radical Scavenger Capacity in Aqueous Models of Different Procyanidins from Grape Seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *39*, 1549–1552.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, *20*(7), 933–956.
- Rinaldi, A., Jourdes, M., Teissedre, P. L., & Moio, L. (2014). A preliminary characterization of Aglianico (*Vitis vinifera* L . cv .) grape proanthocyanidins and evaluation of their reactivity towards salivary proteins. *Food Chemistry*, *164*, 142–149.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.050>
- Rojo-Bezares, B., Sáenz, Y., Zarazaga, M., Torres, C., & Ruiz-Larrea, F. (2007). Antimicrobial activity of nisin against *Oenococcus oeni* and other wine bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, *116*(1), 32–36.
- Romero, C., & Bakker, J. (2000). Anthocyanin and colour evolution during maturation of four port wines : effect of pyruvic acid addition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *81*, 252–260.
- Russell, N. J., Evans, R. I., Steeg, P. F., Hellemons, J., Verheul, A., & Abee, T. (1995). Membranes as a target for stress adaptation. *International Journal of Food Microbiology*, *28*, 255–261.
- Sale, A. J. H., Gould, G. W., & Hamilton, W. . (2017). Inactivation of Bacterial Spores by Hydrostatic Pressure. *Journal of General Microbiology*, *60*, 323–334.
- Salvador, C., Santos, M. C., & Saraiva, J. A. (2010). Effect of the ionic liquid [bmim] Cl and high pressure on the activity of cellulase. *The Royal Society of Chemistry*, (12), 632–635.
- Santos, M. C., Nunes, C., Jourdes, M., Teissedre, P. L., Rodrigues, A., Amado, O., ... Coimbra, M. A. (2016). Evaluation of the potential of high pressure technology as an enological practice for red wines. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *33*, 76–83.

- Skoog, D., Holler, F. J., & Nieman, T. A. (2005). *Αρχές ενόργανης ανάλυσης*.
- Smelt, J. P. P. M. (1998). Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Food Science and Technology*, 9, 152–158.
- Smelt, J. P. P. M., Rijke, A. G. F., & Hayhurst, A. (2006). Possible mechanism of high pressure inactivation of microorganisms. *High Pressure Research*, 12, 37–41.
- Somers, T. C. (1972). The nature of colour in wines. *Food Technology in Australia*, 24, 10–12.
- Sonni, F., Jesus, M., Bastante, C., Chinnici, F., Natali, N., & Riponi, C. (2009). Replacement of sulfur dioxide by lysozyme and oenological tannins during fermentation : influence on volatile composition of white wines, (October 2008), 688–696.
- Stanley, G. A., & Pamment, N. B. (1993). Transport and Intracellular Accumulation of Acetaldehyde in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 42, 24–29.
- Sun, B., Neves, A. C., Fernandes, T. A., Fernandes, A. L., Mateus, N., Freitas, V. De, & Spranger, M. I. (2011). Evolution of Phenolic Composition of Red Wine during Vinification and Storage and Its Contribution to Wine Sensory Properties and Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 6550–6557.
- Sun, B., Sa, M. De, Caldeira, I., Duarte, F. L., & Spranger, I. (2013). Reactivity of Polymeric Proanthocyanidins toward Salivary Proteins and their contribution to young re wine astringency. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 939–346.
- Suzuki, C., & Suzuki, K. (1962). The protein denaturation by high pressure. *Journal of Biochemistry*, 52(2), 67–71.
- Tao, Y., Sun, D.-W., Górecki, A., Błaszczak, W., Lamparski, G., Amarowicz, R., ... Jeliński, T. (2012). Effects of high hydrostatic pressure processing on the physicochemical and sensorial properties of a red wine. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 16, 409–416.
- Taoukis, P. S. ., Panagiotidids, P., Stoforos, N. G., Butxz, P., Fister, H., & Tauscher, B. (n.d.). Kinetics of vitamin C degradation under High Pressure-moderate temperature

- processing in model systems and fruit juices. *High Pressure Food Science, Bioscience and Chemistry*, 310–316.
- Teixeira, A., Eiras-Dias, J., Castellarin, S. D., & Geros, H. (2013). Berry Phenolics of Grapevine under Challenging Environments. *International Journal of Molecular Science*, 14, 18711–18739.
- Timbo, B., Koehler, K. M., Wolyniak, C., & Klontz, K. C. (2004). Sulfites--a food and drug administration review of recalls and reported adverse events. *Journal of Food Protection*, 67(8), 1806–11.
- Tiwari, B. K., O'Donnell, C. P., & Cullen, P. J. (2009). Effect of non thermal processing technologies on the anthocyanin content of fruit juices. *Trends in Food Science and Technology*, 20(3–4), 137–145.
- Tsukamoto, I., Yim, B., Stavarache, C. E., Furuta, M., Hashiba, K., & Maeda, Y. (2004). Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* by ultrasonic irradiation. *Ultrasonics Sonochemistry*, 11(2), 61–65.
- Vally, H., Misso, N. L. A., & Madan, V. (2009). Clinical effects of sulphite additives. *Clinical and Experimental Allergy*, 39(11), 1643–1651.
- Vally, H., & Thompson, P. J. (2001). Role of sulfite additives in wine induced asthma: single dose and cumulative dose studies. *Thorax*, 56(10), 763–9.
- Vally, H., Thompson, P. J., Vally, H., & Thompson, P. J. (2003). Allergic and asthmatic reactions to alcoholic drinks, (October 2002), 3–11.
- Vaquero, M. J. R., Alberto, M. R., & de Nadra, M. C. M. (2007). Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control*, 18(2), 93–101.
- Vidal, S., Cartalade, D., Souquet, J.-M., Fulcrand, H., & Cheynier, V. (2002). Changes in Proanthocyanidin Chain Length in Winelike Model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2261–2266.
- Zhang, Q., Barbosa-Cánovas, G. V., & Swanson, B. G. (1995). Engineering aspects of pulsed electric field pasteurization. *Journal of Food Engineering*, 25(2), 261–281.

Zhong, K., Wu, J., Wang, Z., Chen, F., Liao, X., Hu, X., & Zhang, Z. (2007). Inactivation kinetics and secondary structural change of PEF-treated POD and PPO. *Food Chemistry*, *100*(1), 115–123.

Zoecklein, B. W., Fugelsang, K. C., Gump, B. H., & Nury, F. S. (1995). *Wine analysis and production*. (E. Chapman & W. Hall, Eds.) (1995th ed.).

Βαλαβανίδης, Α. Π. (2006). *Φασματοσκοπία οργανικών ενώσεων*. (Ε. Τ. χημείας Π. Αθηνών, Ed.).

McMurry, J. (2005). *Οργανική Χημεία. Τόμος Ι*.

Τσακίρης, Α. (1998). *Οινολογία: από το σταφύλι στο κρασί*. Αθήνα: Εκδόσεις: ΨΥΧΑΛΟΥ.