



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
Π.Μ.Σ. «ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ
ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: «ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΟΙΝΟΥ & ΑΠΟΣΤΑΓΜΑΤΩΝ»
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΙΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ ΣΤΑ ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ
ΕΡΥΘΡΟΥ ΟΙΝΟΥ

ΔΗΜΗΤΡΑ Ι. ΓΕΩΡΓΑΚΑΚΗ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ : ΚΑΛΛΙΘΡΑΚΑ ΣΤΑΜΑΤΙΝΑ

ΑΘΗΝΑ

2019

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
Π.Μ.Σ. «ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ
ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: «ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΟΙΝΟΥ & ΑΠΟΣΤΑΓΜΑΤΩΝ»

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΙΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ ΣΤΑ ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ
ΕΡΥΘΡΟΥ ΟΙΝΟΥ

EFFECT OF HIGH PRESSURE ON RED WINE QUALITY
CHARACTERISTICS

ΔΗΜΗΤΡΑ Ι. ΓΕΩΡΓΑΚΑΚΗ

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Καλλιθρακα Σταματίνα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Οινολογίας, Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (Επιβλέπουσα)

Κοτσερίδης Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγήτρια Οινολογίας, Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

Κατσαρός Γεώργιος, Ερευνητής Δ' στο Ινστιτούτο Τεχνολογίας Αγροτικών Προϊόντων του ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ

Περίληψη

Η υψηλή υδροστατική πίεση (HHP) είναι μια φυσική, μη-θερμική μέθοδος επεξεργασίας, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων ώστε να αυξηθεί η ασφάλεια και ο διάρκεια ζωής των τροφίμων, μέσω απενεργοποίησης ανεπιθύμητων μικροοργανισμών. Ο σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής είναι να μελετηθούν τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του ερυθρού οίνου που υποβάλλεται σε Υψηλή Υδροστατική Πίεση (HHP) σε χρονικό διάστημα έξι μηνών και να διερευνηθεί η πιθανότητα προσθήκης μειωμένων ποσοτήτων θειώδη ανυδρίτη όταν συνδυάζεται με την HHP και την προσθήκη γλουταθειόνης (GSH). Για το σκοπό αυτό, μια ομάδα δειγμάτων με 0, 20, 40, 60, 80 και 100ppm SO₂ υποβλήθηκαν σε υψηλή υδροστατική πίεση 400 MPa για 5 λεπτά στους 20° C. Παράλληλα δημιουργήθηκε και μια άλλη ομάδα δειγμάτων που περιείχαν τις ίδιες συγκεντρώσεις SO₂ αλλά χωρίς να υποβληθούν σε HHP, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Επίσης σε όλα τα δείγματα προστέθηκε γλουταθειόνη. Στους οίνους πραγματοποιήθηκαν οι ακόλουθες κλασικές αναλύσεις : pH, ολική και πτητική οξύτητα και αλκοολικός τίτλος. Πραγματοποιήθηκαν επίσης μετρήσεις για τον ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών ουσιών, των ανθοκυανών και των τανινών. Συγκεκριμένα, οι αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν ήταν: ένταση και απόχρωση, προσδιορισμός ελεύθερου και ολικού θειώδους, προσδιορισμός φαινολικών ουσιών, προσδιορισμός ολικών τανινών καθώς και η μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Επιπλέον, προσδιορίστηκε το προφίλ των ανθοκυανών και ο μέσος βαθμός πολυμερισμού των τανινών (mDP) των οίνων με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Τέλος, στους οίνους πραγματοποιήθηκε οργανοληπτικός έλεγχος από 11 εκπαιδευμένους γευσιγνώστες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η εφαρμογή της HHP δύναται να επιφέρει αλλαγές σε αρκετά χαρακτηριστικά του οίνου και παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ «πιεσμένων» και «απίεστων» οίνων, με εξαίρεση στην περίπτωση των δειγμάτων με 100 ppm SO₂. Επιπλέον, τα υποβληθέντα δείγματα σε HHP ανταποκρίθηκαν καλύτερα στον χρόνο όσον αφορά την πτητική τους οξύτητα. Συνεπώς θα μπορούσε η HHP να αποτελέσει μια υποσχόμενη τεχνική για την μείωση των χρησιμοποιούμενων δόσεων SO₂.

Επιστημονική περιοχή : Επιστήμη τροφίμων και διατροφής του ανθρώπου.

Λέξεις-Κλειδιά : Μούχταρο, Υψηλή Υδροστατική Πίεση (HHP), Θειώδης Ανυδρίτης (SO₂), Γλουταθειόνη (GSH), Συντήρηση οίνου, μέσος βαθμός πολυμερισμού (mDP)

Abstract

High hydrostatic pressure (HHP) is a natural, non-thermal processing 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 study the physicochemical characteristics of red wine, in which has been applied high hydrostatic pressure (HHP), during the period of six months, and to investigate the possibility of adding reduced amounts of sulfur dioxide when combined with HHP treatment and glutathione (GSH). For this purpose, a set of samples containing 0, 20, 40, 60, 80 and 100ppm SO₂ created and were subjected to high hydrostatic pressure of 400 MPa for 5 minutes at 20 ° C. Simultaneously, another set of samples created, containing the same concentrations of SO₂ but without to be subjected to HHP, which were used as controls. Also, glutathione was added to all samples. The following classical analyses were performed in wine samples : pH, total and volatile acidity and alcoholic strength. Measurements were also made to quantify the phenolic substances, anthocyanins and tannins. Specifically, the analyzes carried out were: intensity and hue, determination of free and total sulphur dioxide, determination of phenolic substances, determination of total tannins and measurement of antioxidant capacity. In addition, the anthocyanin profile and the mean degree of polymerization (mDP) of tannins were determined using high performance liquid chromatography (HPLC). Finally, a sensory analysis took place, to evaluate the wines organoleptically, in which 11 trained winetasters participated. The results showed that HHP may cause changes in several wine characteristics and statistically significant differences between "pressurised" and "unpressurised" wines samples were observed, with the exception of 100 ppm SO₂ samples. In addition, the samples that subjected to HHP responded better during their storage according to their volatile acidity levels. Therefore, HHP could be a promising technique for reducing the SO₂ doses used in wines.

Scientific field : Food science and human nutrition.

Key words: High hydrostatic pressure, sulphur dioxide (SO₂), Glutathione (GSH), Wine Preservation, mean degree of polymerization (mDP)

Ευχαριστίες

Σε αυτό το σημείο, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου στο μεταπτυχιακό του οποίου έγινα αποδεκτή και ιδιαιτέρως την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Οινολογίας Σταματίνα Καλλίθρακα, υπό την επίβλεψη της οποίας ξεκίνησε και ολοκληρώθηκε η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή. Την ευχαριστώ για την ανάθεση της συγκεκριμένης εργασίας και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στην εκπόνηση της αλλά και για τον πολύτιμο χρόνο που μου αφιέρωσε όποτε χρειαζόμουν την βοήθεια της.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θέλω να εκφράσω στην κα. Νίκη Προξενιά, για την ανεκτίμητη βοήθεια της και καθοδήγηση της μέσα στο εργαστήριο αλλά και στην Μαριάννα Ξενιά, η οποία μου προσέφερε απλόχερα τη βοήθεια της σε κάθε ανακύπτον ζήτημα. Χωρίς την προθυμία και την υπομονή τους για συνεχή προσπάθεια επίλυσης των υποκυπτόντων προβλημάτων, η παρούσα διατριβή δε θα μπορούσε να ολοκληρωθεί. Επιπλέον ένα ευχαριστώ στην φοιτήτρια Λένα Μαυρίδη, για την άριστη συνεργασία μας και για τη βοήθεια που προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων, αλλά και σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου για το θετικό κλίμα που υπήρχε.

Επίσης 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.

Επιπροσθέτως, θα ήθελα να απευθύνω τις ευχαριστίες μου προς όλους τους καθηγητές του μεταπτυχιακού προγράμματος, για τις γνώσεις και καθοδήγηση που μου παρείχαν καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω από τις θερμές μου ευχαριστίες όλους μου τους φίλους, από την Αθήνα και μη, για την ηθική και όχι μόνο στήριξη τους. Ευχαριστώ ιδιαιτέρως τους συναδέλφους Μαρίζα, Μαρία, Θάνο και Αντώνη που έκαναν αυτά τα δύο χρόνια πιο εύκολα και πιο όμορφα.

Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου και ιδιαιτέρως στον πατέρα μου, Γιάννη, για την στήριξη και την πίστη του σε μένα όλα αυτά τα χρόνια.

Πίνακας Περιεχομένων

Περίληψη	II
Abstract	III
Ευχαριστίες	IV
Συντομογραφίες	VIII
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
Συντήρηση Τροφίμων	1
Θειώδης Ανυδρίτης (SO ₂)	2
Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα του Θειώδη Ανυδρίτη	4
Τρόποι Μείωσης του Θειώδη Ανυδρίτη	5
Υποκατάστατα Θειώδους Ανυδρίτη- Εναλλακτικά Συντηρητικά	5
Αντιμικροβιακοί Παράγοντες	5
Λυσοζύμη.....	5
Σορβικό Οξύ	7
Δικαρβονικός διμεθυλεστερας (DMDC)	8
Χιτοζάνη	9
Βακτηριοσίνες.....	10
Κολλοειδές σύμπλοκο αργύρου (CSC).....	11
Αντιοξειδωτικοί Παράγοντες	12
Γλουταθειόνη	12
Ασκορβικό Οξύ.....	13
Φαινολικές Ενώσεις.....	14
Φυτικά Εκχυλίσματα	16
Τεχνικές Υποκατάστασης SO ₂	17
Παλμικά ηλεκτρικά πεδία (PEF)	17
Υπεριώδης Ακτινοβολία	18
Υπέρηχοι	19
Υψηλή Υδροστατική Πίεση (HHP)	20
Εφαρμογές Υψηλής Υδροστατικής Πίεσης (HHP).....	21
Εφαρμογές HHP στον Οίνο	21
Εφαρμογές HHP στα Τρόφιμα.....	24

Η ποικιλία Μούχταρο.....	25
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	27
Σκοπός-Πειραματικός Σχεδιασμός.....	27
Οινοποίηση Σταφυλιών.....	28
Θείωση.....	28
Εφαρμογή Υψηλής Υδροστατικής Πίεσης (HHP)	29
Αναλύσεις Οίνων	30
Κλασικές Αναλύσεις	30
Προσδιορισμός της Ενεργούς Οξύτητας-pH	30
Προσδιορισμός Ολικής ή Ογκομετρούμενης Οξύτητας.....	31
Προσδιορισμός Πτητικής Οξύτητας.....	31
Προσδιορισμός Χρωματικών Χαρακτηριστικών (Ένταση-Απόχρωση)	31
α) Ένταση χρώματος (I).....	32
β) Απόχρωση (H)	32
Προσδιορισμός Ελεύθερου και Ολικού Θειώδη Ανυδρίτη	32
Ολικά Φαινολικά Συστατικά.....	33
Δείκτης Φαινολικών Ουσιών (ΔΦΟ).....	33
Μέθοδος Folin-Ciocalteu.....	33
Μέθοδος προσδιορισμού τανινών με δέσμευση από πρωτεΐνες (BSA)	34
Προσδιορισμός Ολικών Τανινών με τη μέθοδο Ribéreau-Gayon Stonestreet (1966).....	35
Μέτρηση της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας (DPPH)	36
Προσδιορισμός Ανθοκυανών με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (HPLC).....	37
Προσδιορισμός μέσου βαθμού πολυμερισμού (mDP) τανινών με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)	38
Οργανοληπτικός έλεγχος οίνων.....	40
Στατιστική Επεξεργασία Αποτελεσμάτων.....	42
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	33
Κλασικές Αναλύσεις	33
L-Μηλικό Οξύ.....	36
L-Γαλακτικό Οξύ	39
Ελεύθερος και Ολικός Θειώδης Ανυδρίτης	42
Ελεύθερος SO ₂	42
Ολικός SO ₂	44

Χρωματικά Χαρακτηριστικά των οίνων	47
Ένταση	47
Απόχρωση	50
Ακεταλδεύδη	53
Ολικά Φαινολικά Συστατικά.....	56
Δείκτης Φαινολικών Ουσιών (ΔΦΟ).....	56
Μέθοδος Folin-Ciocalteu.....	59
Ολικές Τανίνες με τη μέθοδο Ribéreau-Gayon & Stonestreet (1966).....	61
Τανίνες με τη μέθοδο Harbertson (BSA).....	63
Αντιοξειδωτική Ικανότητα (DPPH).....	66
Ανθοκυάνες με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC).....	68
Μέσος βαθμός πολυμερισμού τανινών (mDP) με μέθοδο υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)	72
Οργανοληπτικός Έλεγχος	76
ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	78
Παράρτημα.....	81
Βιβλιογραφία	90

Συντομογραφίες

%G	Ποσοστό εστεροποίησης
%P	Ποσοστό προδελφινιδινών
%vol	Αλκοολικός τίτλος
AU	Absorbance Units
C	(+)-κατεχίνη
Ce	(+)-κατεχίνη ως επεκτατική μονάδα
CSC	Κολλοειδές σύμπλοκο αργύρου
Ct	(+)-κατεχίνη ως τερματική μονάδα
DMDC	Δικαρβονικός διμεθυλεστέρας
Dp	3-O-μονογλυκοζίτης της δελφινιδίνης
ECG	Γαλλικός εστέρας της (-)-επικατεχίνης
ECGe	Γαλλικός εστέρας της (-)-επικατεχίνης ως επεκτατική υπομονάδα
ECGt	Γαλλικός εστέρας της (-)-επικατεχίνης ως τερματική υπομονάδα
ECt	(-)-επικατεχίνη ως τερματική υπομονάδα
EGC	(-)-επιγαλλοκατεχίνη
EGCe	(-)-επιγαλλοκατεχίνη ως επεκτατική υπομονάδα
GSH	Γλουταθειόνη
HHP	Υψηλή Υδροστατική Πίεση
HPLC	Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης
mDP	Μέσος βαθμός πολυμερισμού
Mlv	3-O-μονογλυκοζίτης της μαλβιδίνης
MlvAc	Οξικός εστέρας του 3-O-μονογλυκοζίτη της μαλβιδίνης
MlvCoum	Κουμαρικός εστέρας του 3-O-μονογλυκοζίτη της μαλβιδίνης
PEF	Παλμικά Ηλεκτρικά Πεδία
Pn	3-O-μονογλυκοζίτης της πεονιδίνης
POD	Υπεροξειδάση
PPO	Πολυφαινολοξειδάση
Pt	3-O-μονογλυκοζίτης της πετουνιδίνης

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Συντήρηση Τροφίμων

Το πρόβλημα της αλλοίωσης των τροφίμων έχει απασχολήσει τον άνθρωπο από τα αρχαία χρόνια. Η συντήρηση των τροφίμων ξεκίνησε με σκοπό να διατηρηθούν αναλλοίωτα τα ποιοτικά χαρακτηριστικά τους όσο το δυνατόν μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Αρχικά, η συντήρηση των τροφίμων εξασφαλιζόταν αποκλειστικά με τη χρήση φυσικών προϊόντων, όπως ο υποκαπνισμός, η προσθήκη ζάχαρης, άλατος, καρυκευμάτων, χωρίς όμως να είναι γνωστός ο ακριβής μηχανισμός της προστασίας που παρείχαν στα τρόφιμα (Dziezak, 1989).

Σήμερα, το θέμα της συντήρησης των τροφίμων είναι πολύπλοκο αφού στην αγορά εμφανίζονται συνεχώς νέα προϊόντα, τα οποία οι καταναλωτές απαιτούν να είναι απολύτως ασφαλή από μικροβιολογικούς κινδύνους έχοντας παράλληλα δεχθεί όσον το δυνατόν μικρότερη επεξεργασία. Επιπλέον το ζητούμενο είναι να μην περιέχουν συντηρητικά και να είναι υψηλής διατροφικής και οργανοληπτικής αξίας.

Τα τρόφιμα αποτελούν ένα πολύπλοκο οικοσύστημά, στο οποίο η συμπεριφορά (ανάπτυξη/ επιβίωση/ θάνατος) των μικροοργανισμών είναι συνάρτηση πολλών παραγόντων. Η θερμοκρασία, η απουσία/παρουσία οξυγόνου, η υγρασία, το pH, τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά και η παρουσία τοξικών προϊόντων μικροβιακού μεταβολισμού, είναι μερικοί από τους κυρίαρχους ρυθμιστικούς παράγοντες της συμπεριφοράς των μικροοργανισμών.

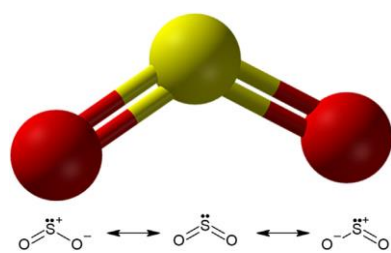
Οι μέθοδοι συντήρησης αποσκοπούν στον έλεγχο των παθογόνων και τη διατήρηση των αλλοιογόνων μικροοργανισμών στο χαμηλότερο δυνατό επίπεδο. Οι μικροοργανισμοί διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, ανάλογα με τον βαθμό επικινδυνότητας, σε: (α) παθογόνους, οι οποίοι είτε με την παρουσία τους ή/και την παραγωγή τοξινών προκαλούν τροφικές δηλητηριάσεις, και (β) αλλοιογόνους, οι οποίοι είναι συνήθως αβλαβείς για τον άνθρωπο όμως προκαλούν ανεπιθύμητες αλλαγές στα ποιοτικά χαρακτηριστικά των τροφίμων.

Ο οίνος αποτελεί ένα φυσικό προϊόν με περιεκτικότητα σε αιθανόλη και χαμηλό pH, χαρακτηριστικά συνήθως που αποτελούν ανασταλτικούς παράγοντες για την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών. Παρ' όλα αυτά, για την συντήρηση και την διατήρηση του απαιτείται ένα πρόσθετο ικανό να το προστατεύσει από την οξείδωση και από την πιθανή

ανάπτυξη μικροοργανισμών, οι οποίοι μπορούν να αναπτυχθούν στην συνθήκες του οίνου και να τον αλλοιώσουν. Παράλληλα όμως τον τελευταίο καιρό έχει ενταθεί σε μεγάλο βαθμό το ενδιαφέρον για τη χρήση "φυσικών" συντηρητικών ή τεχνικών για την αντικατάσταση των έως σήμερα χρησιμοποιούμενων πρόσθετων που κρίνονται είτε ως ύποπτα (όσον αφορά την επίδραση στον ανθρώπινο οργανισμό) ή δεν είναι πλέον αποδεκτά από τον καταναλωτή. Το αποτέλεσμα αυτού έχει δημιουργήσει την ανάγκη για εύρεση νέων τεχνολογιών ή φυσικών συντηρητικών ώστε να αποφευχθεί η χρήση των 'κλασικών' συντηρητικών.

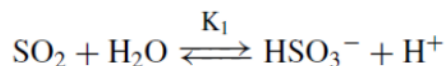
Θειώδης Ανυδρίτης (SO₂)

Ο θειώδης ανυδρίτης ή διοξείδιο του θείου (SO₂, Εικ. 1) χρησιμοποιείται ως συντηρητικό από τα τέλη του 18^{ου} αιώνα (Santos *et al.*, 2012) και εφαρμόζεται συστηματικά στην οινολογία από τον 19^ο αιώνα και μετά. Παρ' όλα αυτά, ήδη από τους προηγούμενους αιώνες, πριν από εκείνη την περίοδο πραγματοποιούνταν θειώσεις βαρελιών για την καλύτερη συντήρηση του οίνου κατά τη μεταφορά του (Giacosa *et al.*, 2019). Σήμερα αποτελεί το πιο σημαντικό και ευρέως χρησιμοποιούμενο συντηρητικό στην οينوποίηση και λόγω των πολλών ιδιοτήτων του η πλήρης αντικατάσταση του καθίσταται σχεδόν αδύνατη. Επιπλέον η ολική απουσία του SO₂ από τον οίνο σπάνια υφίσταται καθώς κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, οι ζύμες παράγουν μικρές ποσότητες SO₂ (Ribereau-Gayon *et al.*, 2006).



Εικόνα 1. Μοριακή δομή και οι δομές συντονισμού του διοξειδίου του θείου.

Ο ολικός θειώδης ανυδρίτης που έχει προστεθεί στον οίνο, αποτελείται από τον ελεύθερο και τον δεσμευμένο θειώδη ανυδρίτη. Ο ελεύθερος θειώδης ανυδρίτης σε υδατικά διαλύματα διίσταται (Σχ.1) και στο pH των οίνων (3,0 - 4,0) βρίσκεται σε τρεις μορφές: τη μοριακή (SO₂), η οποία είναι και η πιο δραστική, και τις ιοντικές, το όξινο θειώδες ανιόν (HSO₃⁻) και το θειώδες ανιόν (SO₃²⁻) (Fugelsang and Edwards, 2007).



Σχήμα 1. Αμφίδρομη αντίδραση του θειώδη ανυδρίτη.

Η παραπάνω διάσταση (Σχ.1) εξαρτάται από το pH και τη θερμοκρασία. Όσο υψηλότερο είναι το pH τόσο λιγότερος ο μοριακός SO_2 , ενώ η αύξηση της θερμοκρασίας συντελεί σε θεαματική αύξηση. Το άθροισμα των τριών μορφών (μοριακού και ιοντικών) δίνει τον ελεύθερο θειώδη ανυδρίτη. Στη σχέση μοριακού ως προς ελεύθερο SO_2 σημαντικό ρόλο παίζει και η συγκέντρωση της αλκοόλης. Για το ίδιο pH και την ίδια συγκέντρωση ελεύθερου SO_2 , η συγκέντρωση του μοριακού SO_2 είναι ανάλογη του αλκοολικού τίτλου του διαλύματος. Στο pH του οίνου η δραστική μορφή του θειώδους, η μοριακή, αντιπροσωπεύει πολύ μικρό ποσοστό και όσο αυξάνει το pH τόσο μειώνεται ενώ επικρατεί η μορφή του όξινου θειώδους ανιόντος (HSO_3^-) (Fugelsang and Edwards, 2007, Ribereau-Gayon *et al.*, 2006).

Επιπλέον, ο θειώδης ανυδρίτης στον οίνο έχει την ιδιότητα να ενώνεται με ουσίες που διαθέτουν καρβονυλομάδες παράγοντας ασταθείς ή σταθερές ενώσεις. Έτσι αντιδρά με σάκχαρα, πτητικές ουσίες, πρωτεΐνες και ανθοκυάνες δίνοντας ασταθείς ενώσεις αλλά και με την ακεταλδεΐδη προς σχηματισμό σταθερών ενώσεων. Ο δεσμευμένος θειώδης ανυδρίτης ανεξαρτήτως αν σχηματίζει σταθερές ή ασταθείς ενώσεις είναι ανενεργός ως συντηρητικό (Ribereau-Gayon *et al.*, 2006).

Οι περισσότερες ιδιότητες που αποδίδονται στο θειώδη ανυδρίτη οφείλονται αποκλειστικά στον ελεύθερο θειώδη. Όσον αφορά τις αντιμικροβιακές του ιδιότητες, το πιο δραστικό τμήμα του ελεύθερου θειώδους είναι ο μοριακός SO_2 , ο οποίος επιδρά επί των ζυμών, έχοντας την ικανότητα να διέρχεται από την ημιπερατή μεμβράνη των κυττάρων τους (Stavroula Kourakou – Dragona, 1998, Θέματα Οινολογίας). Αντίθετα, ο ενωμένος SO_2 είναι ανενεργός και δεν έχει καμία από τις πολύτιμες ιδιότητες του ελεύθερου SO_2 και γι' αυτό το λόγο θεωρείται "παθητικός", ενώ παράλληλα αυξάνει τον ολικό θειώδη ανυδρίτη χωρίς να προσφέρει ουσιαστικές υπηρεσίες. Ωστόσο, οι ασταθείς ενώσεις που σχηματίζει ο θειώδης ανυδρίτης έχουν χρησιμότητα, γιατί αποθηκεύουν τον θειώδη και όταν επέρχεται μείωση του ελεύθερου SO_2 στους οίνους, υδρολύονται απελευθερώνοντας τον (Ribereau-Gayon *et al.*, 2006).

Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα του Θειώδη Ανυδρίτη

Το SO₂ δρα έναντι ενός ευρέος φάσματος μικροοργανισμών, αναστέλλει την ανάπτυξη των ζυμομυκήτων, των γαλακτικών βακτηρίων και, σε μικρότερο βαθμό, των οξικών βακτηρίων κατά την αποθήκευση του οίνου (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Επίσης, η ένωση αυτή εμποδίζει την ανεπιθύμητη έναρξη μηλογαλακτικής ζύμωσης, αναστέλλοντας την ανάπτυξη *Brettanomyces* και μικροδερμικών ζυμών, και προφυλάσσει τους οίνους από διάφορα ελαττώματα βακτηριακής προέλευσης (Bakker *et al.*, 1998; MacHado *et al.*, 2009). Εκτός από τις αντισηπτικές του ιδιότητες, το SO₂ καταπολεμά την οξείδωση του οίνου (Karbowiak *et al.*, 2010, Li *et al.*, 2008).

Ως αντιοξειδωτικό μπορεί να δράσει άμεσα ή έμμεσα με διάφορους τρόπους. Άμεσα, διότι αντιδρά με το οξυγόνο και το υπεροξείδιο του υδρογόνου, οξειδώνεται ο ίδιος και έτσι προφυλάσσει άλλα ευοξειδωτα συστατικά του οίνου. Έμμεσα δρα απενεργοποιώντας τις οξειδάσες, ένζυμα που καταλύουν αντιδράσεις οξείδωσης (Oliveira *et al.*, 2011). Εμποδίζει την αμαύρωση (‘καφέτιασμα’), απενεργοποιώντας ένζυμα όπως η πολυφαινολοξειδάση (PPO), η υπεροξειδάση (POD) και οι πρωτεάσες, και επίσης αναστέλλοντας τις αντιδράσεις Maillard (Garde-Cerdan *et al.*, 2008).

Το SO₂ διευκολύνει την εκχύλιση πρωτογενών αρωματικών συστατικών, χρωστικών και φαινολικών ενώσεων από τον φλοιό των σταφυλιών και βοηθάει την σταθεροποίηση του χρώματος του κρασιού κατά τη ωρίμανση του (Bakker *et al.*, 1998). Επιπλέον με την προσθήκη του θειώδους ανυδρίτη αναβαθμίζεται η οργανοληπτική ποιότητα του οίνου, καθώς δεσμεύεται με κάποια συστατικά τα οποία έχουν δυσάρεστη οσμή ή γεύση όπως το πυροσταφυλικό οξύ και η ακεταλδεϋδη (Ribereau-Gayon *et al.*, 2006). Ταυτόχρονα, αυξάνει την οξύτητα σχηματίζοντας H₂SO₃ και δρα ως διαυγαστικός παράγοντας καθώς ευνοεί τη συσσωμάτωση κolloειδών συστατικών και εν τέλει την καταβύθιση τους (Giacosa *et al.*, 2019).

Παρά τα πλεονεκτήματα του SO₂, σε μεγάλες συγκεντρώσεις μπορεί να προκαλέσει οργανοληπτικές αλλοιώσεις στον οίνο, εξουδετερώνοντας το άρωμα ή δημιουργώντας χαρακτηριστικά ελαττωματικά αρώματα, μπορεί να αυξηθεί η αίσθηση σκληρότητας στο τελικό προϊόν αλλά και να αναστείλει την έναρξη της αλκοολικής και μηλογαλακτικής ζύμωσης (Ribereau-Gayon *et al.*, 2006). Αντίθετα, μια ανεπαρκής συγκέντρωση δεν εξασφαλίζει την επαρκή σταθερότητα του οίνου, όσον αφορά τις οξειδώσεις και την μικροβιακή ανάπτυξη, γεγονός που μπορεί να υποβαθμίσει την ποιότητά του οίνου. Επιπλέον, τα θειώδη που προέρχονται από

την προσθήκη θειώδους ανυδρίτη στον οίνο σχετίζονται με διάφορα προβλήματα υγείας σε ορισμένους καταναλωτές. Η παρουσία του στον οίνο έχει συσχετιστεί με αλλεργικές αντιδράσεις ή με δυσανεξία σε ορισμένους καταναλωτές. Τα περισσότερα μη ασθματικά άτομα μπορούν να ανεχθούν έως και 5 ppm, ενώ τα ευαίσθητα άτομα αντιδρούν αρνητικά στην κατάποση των θειωδών και μπορεί να εμφανίσουν μια σειρά από συμπτώματα όπως δερματίτιδα, κνίδωση, αγγειοοίδημα, κοιλιακό άλγος, διάρροια, βρογχοσυστολή (Gastaminza *et al.*, 1995) και αναφυλαξία (Vally *et al.*, 2009, Guerrero *et al.*, 2015).

Λόγω των προβλημάτων υγείας που σχετίζονται με τη χρήση του SO₂, η Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (World Health Organization- WHO) συνέστησε να περιοριστεί όσο το δυνατόν περισσότερο ή και να καταργηθεί πλήρως η χρήση του SO₂ στην επεξεργασία τροφίμων (WHO, 2009) και ο Διεθνής Οργανισμός Αμπέλου και Οίνου (OIV) μείωσε προοδευτικά τη μέγιστη επιτρεπόμενη συγκέντρωση του στους οίνους (Garcia-Ruiz *et al.*, 2008), η οποία είναι 150 mg / L για ερυθρούς οίνους και 200 mg / L για τους λευκούς και ροζέ οίνους (Regulation (EC) No 607/2009).

Συνεπώς, εξαιτίας όλων των παραπάνω, έχει γεννηθεί η ανάγκη για την ανεύρεση εναλλακτικών συντηρητικών ή καινοτόμων τεχνικών που να αντικαθιστούν, εν μέρει εάν όχι πλήρως, τον θειώδη ανυδρίτη. Ωστόσο, η προϋπόθεση για την αντικατάστασή του είναι να παρέχεται παρόμοιο αντισηπτικό αποτέλεσμα και αντιοξειδωτική δράση, εξασφαλίζοντας ένα ποιοτικό τελικό προϊόν, αλλά χωρίς να υπάρχουν αρνητικές συνέπειες στην ανθρώπινη υγεία.

Τρόποι Μείωσης του Θειώδη Ανυδρίτη

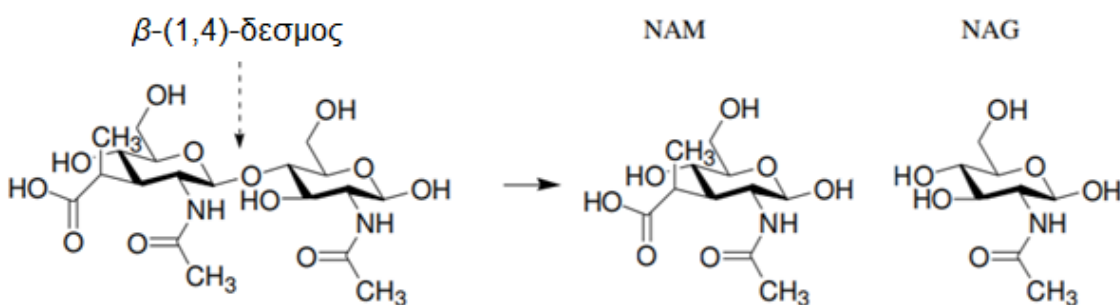
Υποκατάστατα Θειώδους Ανυδρίτη- Εναλλακτικά Συντηρητικά

Αντιμικροβιακοί Παράγοντες

Λυσοζύμη

Η λυσοζύμη, γνωστή και ως μουραμιδάση, είναι μια πρωτεΐνη (υδρολάση γλυκοζιτών) που εμφανίζεται στο λεύκωμα (ασπράδι) των αυγών και από τις αρχές τις δεκαετίας του 1990 είχε προταθεί για τον έλεγχο της μηλογαλακτικής ζύμωσης στην οινοποίηση (Sonni *et al.*, 2009). Η λυσοζύμη ως ένζυμο (EC 3.2.1.17) έχει την ικανότητα να καταστρέφει τα τοιχώματα των

βακτηριακών κυττάρων, καταλύοντας την υδρόλυση του β -1,4- δεσμού μεταξύ των *N*-ακετυλομουραμικού οξέος (NAM) και του *N*-ακέτυλο-*D*-γλυκοσαμινικού άκρου (NAG) (Σχ. 2) στην πεπτιδογλυκανή (που βρίσκεται στα κυτταρικά τοιχώματα των βακτηρίων, συγκεκριμένα στα θετικά κατά Gram βακτήρια) (Charter and Lagarde 1999; Azzolini *et al.* 2010; Guzzo *et al.* 2011).



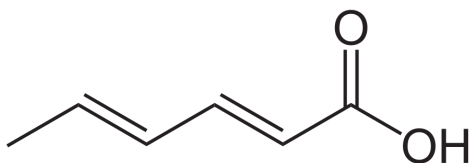
Σχήμα 2. Το ένζυμο υδρολύει τον 1-4 γλυκοσιδικό δεσμό μεταξύ εναλλασσόμενων άκρων *N*-ακετυλογλυκοσαμίνης (NAG) και *N*-ακετυλομουραμικού οξέος (NAM).

Συνεπώς, η λυσοζύμη χρησιμεύει για τον έλεγχο των γαλακτικών βακτηρίων στον οίνο (Gram θετικά βακτήρια). Βέβαια ανεξάρτητα από τη δόση στην οποία θα προστεθεί, δεν καταστρέφει όλα τα βακτήρια, με αποτέλεσμα να μην επιτυγχάνεται η τέλεια σταθεροποίηση του οίνου (Gerbaux *et al.*, 1997; Gerland *et al.*, 1999). Σε σύγκριση με το SO₂, ανάλογα με τον χρόνο που προστίθεται, η χρήση της μπορεί να βελτιώσει ελαφρώς το χρώμα των ερυθρών οίνων λόγω της απουσίας αποχρωματισμού που προκαλεί ο θειώδης ανυδρίτης. Το χρώμα, με την προσθήκη λυσοζύμης, εμφανίζεται πιο έντονο και παραμένει σταθερό (Gerland *et al.*, 1999). Ωστόσο, στον ερυθρό οίνο υπάρχουν πολλά μειονεκτήματα που σχετίζονται με τη χρήση αυτού του προσθέτου, όπως είναι η εκχύλιση και η παρουσία φαινολικών ενώσεων, ιδιαίτερα προανθοκυανιδινών χαμηλού μοριακού βάρους, που περιορίζουν τη δράση της λυσοζύμης (Guzzo *et al.*, 2011). Μέχρι τώρα, η λυσοζύμη δεν έχει βρεθεί να έχει αρνητικές επιδράσεις στο οργανοληπτικό προφίλ του οίνου και το μέγιστο όριο προσθήκης της που έχει οριστεί από τον OIV είναι τα 500 mg / L κατά την διάρκεια της ωρίμανσης του οίνου. (Ni and Zhong 2003, OIV 2009). Τέλος θα πρέπει να

τονιστεί ότι η λυσοζύμη, δεν μπορεί να αντικαταστήσει πλήρως το SO₂, διότι δεν έχει αντιοξειδωτική δράση και αυτό θα μπορούσε να προκαλέσει, κυρίως στον λευκό οίνο, οξείδωση και αμαύρωση (Pilatte *et al.*, 2000, Matito *et al.*, 2003, Pilatte 2005).

Σορβικό Οξύ

Το σορβικό οξύ (Εικ. 2) είναι ένα ακόρεστο αλειφατικό, ευθείας αλυσίδας, μονοκαρβοξυλικό λιπαρό οξύ, το 2,4-εξαδιενοϊκό οξύ. Το οξύ και τα άλατά του νατρίου, ασβεστίου και καλίου του, χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα ως συντηρητικά (Thomas and Delves-Broughton, 2014).



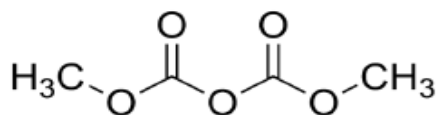
Εικόνα 2. Μοριακή δομή του 2,3-εξαδιενοϊκού οξέος (σορβικό οξύ).

Το σορβικό οξύ είναι ένας αντιμυκητιακός παράγοντας που μπορεί να προστεθεί ως σορβικό κάλιο. Το άλας καλίου χρησιμοποιείται συνήθως επειδή είναι πιο σταθερό και εύκολο να παραχθεί. Χρησιμοποιείται συνήθως σε εμφιαλωμένους οίνους που έχουν υπολειμματικά σάκχαρα και χαμηλή έως μέση περιεκτικότητα σε αλκοόλη (όπως σε προϊόντα μερικής ζύμωσης), για να αποφευχθεί ο πολλαπλασιασμός των ζυμών (κυρίως *Saccharomyces spp.*) χωρίς την ανάγκη προσθήκης υψηλών δόσεων SO₂ (Giacosa *et al.*, 2019). Ωστόσο, το σορβικό οξύ έχει επιλεκτική δράση έναντι των μικροοργανισμών του οίνου και αντιτίθεται στην ανάπτυξη των ζυμών χωρίς να εμποδίζει την ανάπτυξη βακτηρίων, παρουσιάζει δηλαδή αντίθετη δράση από το SO₂ (το οποίο ευνοεί τις ζύμες έναντι των βακτηρίων) (Ribereau-Gayon *et al.*, 2006). Επομένως, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μοναδικό αντισηπτικό πρόσθετο στον οίνο, καθώς οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται δεν είναι επαρκείς για την αναστολή της εξάπλωσης γαλακτικών βακτηρίων (Edinger and Splittstoesser, 1986). Επιπλέον, τα γαλακτικά βακτήρια μπορούν να αποικοδομήσουν το σορβικό οξύ και να οδηγήσουν στην παραγωγή 2-αιθοξυ-3,5-εξαδιενίου, μιας ισχυρά οσμής με χαρακτηριστικό άρωμα φύλλων γερανίου (Maarse, 1991). Προκειμένου να αποφευχθούν αυτά τα προβλήματα, το σορβικό οξύ χρησιμοποιείται μόνο σε

συνδυασμό με το SO₂ για να εξασφαλιστεί η μικροβιολογική σταθερότητα στους γλυκούς οίνους. Τα μέγιστα νομικά όρια είναι 200 mg / L στην Ευρωπαϊκή Ένωση και 300 mg / L στις ΗΠΑ (Fugelsang and Edwards, 2007). Σήμερα, η εξέλιξη των τεχνικών φιλτραρίσματος και των διαδικασιών παραγωγής έχει περιορίσει τη χρήση αυτού του πρόσθετου.

Δικαρβονικός διμεθυλεστέρας (DMDC)

Ο δικαρβονικός διμεθυλεστέρας είναι μια οργανική ένωση (Εικ. 3) που έχει εγκριθεί πρόσφατα από την Ευρωπαϊκή Ένωση ως συντηρητικό κατά την εμφιάλωση οίνων με περισσότερα από 5 g / L υπολειμματικών σακχάρων (Fugelsang and Edwards, 2007). Η μέγιστη ποσότητα που μπορεί να χρησιμοποιηθεί είναι 200 mg / L (Regulation (EC) No 643/2006).



Εικόνα 3. Μοριακή δομή του Δικαρβονικού Διμεθυλεστέρα.

Η αποτελεσματικότητά του εξαρτάται από το στέλεχος, την αρχική κυτταρική συγκέντρωση (συνιστάται να χρησιμοποιείται σε μέγιστο αριθμό 500 βιώσιμων κυττάρων / mL οίνου), τη θερμοκρασία, την περιεκτικότητα σε αιθανόλη και το pH (Daudt and Ough, 1980, Ough *et al*, 1978, 1988, Porter and Ough, 1982, Threlfall and Morris, 2002). Το DMDC δρα αναστέλλοντας τα ένζυμα που εμπλέκονται στη γλυκόλυση των ζυμών, όπως η αλκοολική-αφυδρογονάση και η αφυδρογονάση της 3-φωσφο-γλυκεραλδεύδης, αλλά και μεθοξυκαρβονυλιώνει πυρηνόφιλες ενώσεις (ιμιδαζόλια, αμίνες και θειόλες), με αποτέλεσμα την αναστολή της κυτταρικής αύξησης (Renouf *et al*. 2008).

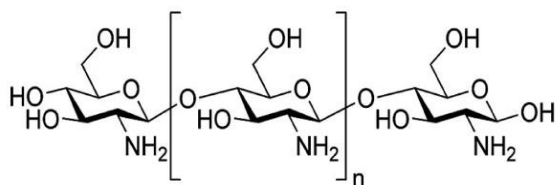
Η επίδραση του DMDC έχει αξιολογηθεί στους οίνους εναντίον ορισμένων ειδών ζύμης και βακτηρίων και φάνηκε ότι οι ζύμες διαφέρουν ως προς την ευαισθησία τους στο DMDC (Daudt and Ough, 1980), ενώ η δράση του κατά των βακτηρίων είναι περιορισμένη (Delfini *et al.*, 2002, Costa *et al.*, 2008). Τα *Saccharomyces pombe* και *Saccharomyces. cerevisiae* βρέθηκαν να είναι πιο ανθεκτικά από τα *Dekkera bruxellensis* ή *Zygosaccharomyces bailii* (Costa *et al.*, 2008). Οι Renouf *et al.* (2008) κατέδειξαν επίσης τη δραστηριότητα του DMDC κατά της ζύμης *B. bruxellensis* στον ερυθρό οίνο.

Παράλληλα, ενώ η δράση του DMDC είναι πολύ γρήγορη στους οίνους και δρα μέσα σε πέντε ώρες (ανάλογα με τη θερμοκρασία, την αιθανόλη και την παρουσία άλλων ουσιών), η υδρόλυση της οδηγεί στην παραγωγή αρκετών ενώσεων, συμπεριλαμβανομένης της μεθανόλης (Stafford and Ough, 1976; Delfini *et al.*, 2002, Ribereau-Gayon *et al.*, 2006). Η μεθανόλη είναι μια πολύ τοξική ένωση που αποτελεί κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία. Ωστόσο, τα προϊόντα αυτά βρίσκονται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις, αδυνατώντας να επηρεάσουν το οργανοληπτικό προφίλ του οίνου (Delfini *et al.*, 2002, Ribereau-Gayon *et al.*, 2006).

Συνεπώς, η αδυναμία καθολικής προστασίας από τα βακτήρια και τις ζύμες αλλά και η εφήμερη δράση του DMDC, λόγω της μετατροπής του σε μεθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα λίγες ώρες μετά την προσθήκη του στον οίνο, καθιστά την πλήρη αντικατάσταση του SO₂ αδύνατη και θα πρέπει να χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με τον θειώδη ανυδρίτη κατά την εμφιάλωση. Το DMDC έχει επίσης προταθεί για να σταματήσει τη ζύμωση γλυκών (προσβεβλημένων από Βοτρύτη) οίνων (Bertrand and Guillou, 1999), μειώνοντας έτσι την ποσότητα SO₂ που απαιτείται. Σε κάθε περίπτωση, μια ορισμένη ποσότητα ελεύθερου SO₂ είναι πάντα απαραίτητη για την προστασία του οίνου από την οξείδωση.

Χιτοζάνη

Η χιτοζάνη είναι ένα γραμμικό πολυμερές *D*-γλυκοζαμίνης συνδεδεμένο με β -1,4 δεσμούς (Εικ. 4) που λαμβάνεται συνήθως με την αποακετυλίωση της χιτίνης, ενός ομοπολυμερούς *N*-ακετυλογλυκοζαμίνης που εξάγεται από έντομα, καρκινοειδή ή μύκητες (Castro *et al.*, 2019).



Εικόνα 4. Μοριακή δομή της χιτοζάνης

Λόγω της παρουσίας αμινοομάδων και υδροξυλομάδων στο μόριο του (Εικ. 4), αυτό το μη τοξικό, βιοδιασπώμενο βιοπολυμερές έχει αξιοσημείωτη ισχύ χηλίωσης μετάλλων και λόγω της πολυκατιονικής του φύσης, η χιτοζάνη παρουσιάζει αντιμικροβιακή δράση. Αυτές οι δύο ιδιότητες έχουν προσελκύσει επιστήμονες τροφίμων εδώ και δεκαετίες (Bornet & Teissedre,

2008). Στην οινοποίηση, η χρήση της χιτοζάνης ως πρόσθετο έχει ρυθμιστεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση από το 2011 (Regulation (EC) No.53/2011) για την πρόληψη της θολερότητας, την απομάκρυνση των βαρέων μετάλλων, και για τον περιορισμό της μόλυνσης από τους *Brettanomyces spp.*. Η μέγιστη ποσότητα χιτοζάνης που μπορεί να χρησιμοποιηθεί είναι 0.1 g/L (Ferreira, 2019).

Ο Taillandier *et al.* (2015) ισχυρίστηκε ότι η χιτοζάνη αποτελεί αποτελεσματικό συντηρητικό έναντι του μικροοργανισμού *D. bruxellensis*, όμως η αποτελεσματικότητά του εξαρτάται από το αρχικό μικροβιακό φορτίο και από την επιρρέπεια του οίνου στην ανάπτυξη μικροβίων. Καθώς όμως οι ζύμες μπορεί να αναπτυχθούν μετά από μια αρχική φάση θανάτου, συνιστάται η προσθήκη διοξειδίου του θείου ως συμπληρωματική βοήθεια. Επίσης το συγκεκριμένο πρόσθετο παρουσίασε σε εργαστηριακές συνθήκες μια συγκεκριμένη δραστηριότητα έναντι ορισμένων μικροοργανισμών όπως ο *Oenococcus oeni* και ο *B. bruxellensis*, ενώ ο *S. cerevisiae* κατέδειξε ισχυρότερη αντοχή (Bağder Elmac *et al.*, 2015).

Άλλα πειράματα, που πραγματοποιήθηκαν σε ερυθρό οίνο, έδειξαν μια μείωση των πληθυσμών του *B. bruxellensis* στα δείγματα που προστέθηκε χιτοζάνη αλλά όχι την πλήρη εξάλειψη τους, είτε ο οίνος βρισκόταν σε φιάλη είτε σε βαρέλι (Petrova *et al.*, 2016). Επιπλέον δρα ως παράγοντας κατά της αμαύρωσης στους λευκούς οίνους (Spagna *et al.*, 1996), γεγονός που προκάλεσε το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας ώστε να το ερευνήσουν ως πιθανό υποκατάστατο του SO₂.

Βακτηριοσίνες

Οι βακτηριοσίνες είναι πεπτίδια με αντιμικροβιακή δράση τα οποία εκκρίνονται από μερικά βακτήρια για την αναστολή της ανάπτυξης άλλων ανταγωνιστικών μικροοργανισμών. Πιο συγκεκριμένα, οι βακτηριοσίνες δύνανται να μεταβάλουν την διαπερατότητα των κυτταρικών μεμβρανών των Gram-θετικών βακτηρίων, οδηγώντας στην λύση τους (Chung & Hancock, 2000).

Αποτελέσματα μελετών υπέδειξαν ότι η νισίνη (βακτηριοσίνη) δρα συνεργικά με το διοξειδίου του θείου στην αναστολή της ανάπτυξης των γαλακτικών βακτηρίων. Η νισίνη σε συγκεντρώσεις μόλις 0.01 mg /l για τον *O. oeni* και 0.39 mg /l για άλλα γαλακτικά βακτήρια, αύξησε την ανασταλτική δραστηριότητα του SO₂ σημαντικά (από διπλάσια έως τετραπλάσια)

έναντι του *O.oeni* και άλλων γαλακτικών στελεχών (Rojo-Bezares *et al.*, 2007b). Μία προηγούμενη μελέτη χρησιμοποίησε τη νισίνη για την πρόληψη της μηλογαλακτικής ζύμωσης στους οίνους Pinot noir (Daeschel *et al.*, 1991) και πρότεινε τη χρήση της για τον έλεγχο της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Στην περίπτωση των οξικών βακτηρίων, οι Rojo-Bezares *et al.* (2007b) απέδειξαν ότι η νισίνη δεν αποτελεί αποτελεσματικό αντιμικροβιακό παράγοντα.

Η πεδιοσίνη PD-1 (βακτηριοσίνη) που προέρχεται από τον *Pediococcus damnosus* αποδείχθηκε ότι είναι δραστική έναντι ενός στελέχους *O. oeni* (Bauer *et al.*, 2005) και δρα κατά του σχηματισμού μικροβιακών υμένων του στην επιφάνεια του γλεύκους Chardonnay (Nel *et al.* 2002). Λόγω της περιορισμένης δράσης τους, προτάθηκε η συνδυαστική χρήση βακτηριοσινών και SO₂ για τον περιορισμό της ανάπτυξης αλλοιογόνων μικροοργανισμών στον οίνο, και συνεπώς την μείωση της δόσης του SO₂ (Rojo-Bezares *et al.*, 2007). Παρόλο που η χρήση τόσο της νισίνης όσο και της πεδιοσίνης για τον έλεγχο της αύξησης των γαλακτικών βακτηρίων έχει μεγάλες δυνατότητες, η χρήση τους δεν έχει εγκριθεί ακόμα στην οινοποίηση.

Κολλοειδές σύμπλοκο αργύρου (CSC)

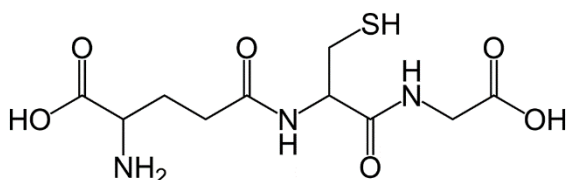
Η πειραματική χρήση του συμπλόκου κολλοειδούς αργύρου (CSC, CAgC) δοκιμάστηκε από τον Izquierdo-Cañás *et al.* (2012) για την αντικατάσταση του SO₂ στην ερυθρή οινοποίηση. Οι ερευνητές παρατήρησαν ότι το σύμπλοκο CSC δρα παρόμοια με το SO₂ έναντι των μικροοργανισμών, μειώνοντας ταυτόχρονα την περιεκτικότητα σε αιθανόλη. Επιπλέον, παρατηρήθηκε έντονη μείωση της περιεκτικότητας σε φαινόλες, ιδιαίτερα των ανθοκυανινών και των φλαβονολών, στα δείγματα που υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με CSC σε σχέση με τους οίνους που προστέθηκε SO₂. Μια άλλη μελέτη, των Garde-Cerdà *et al.* (2014), σχετικά με την παραγωγή οίνου Tempranillo επιβεβαίωσε αυτή την τάση της μείωσης των ανθοκυανινών. Ωστόσο, λόγω της μείωσης της φαινολικής περιεκτικότητας των ερυθρών οίνων που είχε προστεθεί CSC, η εφαρμογή αυτού του προσθέτου στους ερυθρούς οίνους που πρόκειται να παλαιωθούν σε δρύινα βαρέλια απαιτεί περαιτέρω μελέτες. Παράλληλα οι λευκοί οίνοι που περιείχαν CSC, εμφανίστηκαν περισσότερο οξειδωμένοι συγκριτικά με τους οίνους που περιείχαν SO₂, εμφανίζοντας λιγότερη φωτεινότητα και πιο κίτρινο χρώμα. Το σύμπλοκο CSC δεν παρουσιάζει αντιοξειδωτική δράση όπως το SO₂, επομένως η χρήση του για την παραγωγή λευκών οίνων απαιτεί περαιτέρω μελέτη περιλαμβάνοντας και τη συνδυαστική χρήση του με άλλα

αντιοξειδωτικά πρόσθετα.(Izquierdo-Cañas *et al.*, 2012). Αυτή τη στιγμή η χρήση της συγκεκριμένης ουσίας δεν επιτρέπεται στην παραγωγή οίνου.

Αντιοξειδωτικοί Παράγοντες

Γλουταθειόνη

Ένα ελπιδοφόρο μόριο για την αντικατάσταση του SO₂, όσον αφορά την αντιοξειδωτική του δράση, είναι η γλουταθειόνη (GSH, Εικ. 5). Η γλουταθειόνη είναι ένα τριπεπτίδιο αποτελούμενο από L-γλουταμινικό οξύ, L-κυστεΐνη και γλυκίνη. Αποτελεί ένα φυσικό αντιοξειδωτικό που περιέχεται στα σταφύλια και παίζει βασικό ρόλο στην οينوποίηση. Αυτό το αντιοξειδωτικό είναι ικανό να διατηρεί τις ενώσεις του ποικιλιακού αρώματος, να περιορίζει την αμαύρωση (καφέτιασμα) και να ελέγχει την ανάπτυξη ελαττωματικών αρωμάτων κατά τη διάρκεια της παλαίωσης του οίνου (Badea and Antoce, 2015).



Εικόνα 5 Μοριακή δομή της γλουταθειόνης.

Η GSH λειτουργεί έμμεσα ως συμπάραγοντας για αρκετά αντιοξειδωτικά ένζυμα, όπως η υπεροξειδάση GSH, η αναγωγάση GSH, οι γλουταρεδοξίνες και οι GSH S-τρανσφεράσες (Grant, 2001). Και με αυτόν τον τρόπο η GSH αναστέλλει τις αντιδράσεις αμαύρωσης στον οίνο, ανάγοντας τις ορθοκινόνες σε άχρωμα πολυμερή (Singleton *et al.*, 1985, Antoce, 2007). Με την προσθήκη της GSH, τα αρωματικά χαρακτηριστικά των οίνων κατά κύριο λόγο βελτιώνονται (du Toit *et al.*, 2006), καθώς σε πρώτο στάδιο η οξείδωση επηρεάζει τις ενώσεις αρώματος, ενώ το ‘καφέτιασμα’ συμβαίνει σε μεταγενέστερο στάδιο (Singleton, 1987). Οίνοι που παράχθηκαν από οξυγονωμένα γλεύκη και στους οποίους προστέθηκε GSH, βρέθηκε να παρουσιάζουν σημαντική βελτίωση στην ποιότητα, χωρίς να εμφανίζουν τη χαρακτηριστική γεύση και άρωμα ενός οξειδωμένου οίνου (Vaimakis and Roussis, 1996).

Ωστόσο, η γλουταθειόνη ως μια πηγή θείου μπορεί να δημιουργήσει ανεπιθύμητες οσμές. Πραγματοποιήθηκαν ορισμένες μελέτες που αφορούσαν την πιθανότητα της γλουταθειόνης να

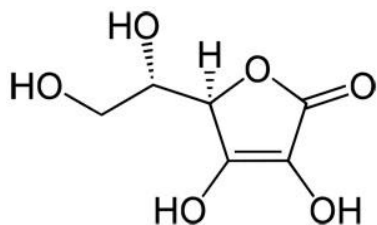
είναι πηγή υδρόθειου (H_2S). Αυτό είναι δυνατόν να συμβεί διότι η κυστεΐνη, ένα από τα αμινοξέα που την αποτελούν, μπορεί να αποικοδομηθεί από την δεσουλφουράση της κυστεΐνης και να σχηματίσει H_2S (Tokuyama *et al.*, 1973). Επιπλέον, η παρουσία γλουταθειόνης σε ερυθρό οίνο αυξάνει την αποικοδόμηση του 3-γλυκοζίτη της μαλβιδίνης όταν εμφανιστεί οξείδωση (Gambuti *et al.*, 2017), γεγονός που μπορεί να θέσει απροσδόκητα ζητήματα στην πιθανή χρήση αυτού του πρόσθετου στην παραγωγή ερυθρού οίνου (Badea and Antoce, 2015).

Ασκορβικό Οξύ

Το ασκορβικό οξύ ή αλλιώς Βιταμίνη C (Εικ.6) είναι ένα άλλο αντιοξειδωτικό που χρησιμοποιείται στην οινοποίηση. Η ικανότητά του να δεσμεύει το μοριακό οξυγόνο πριν από την οξείδωση των φαινολικών ενώσεων αποτελεί βασικό χαρακτηριστικό αυτού του πρόσθετου στους λευκούς οίνους. Όμως, λόγω της υψηλής ευαισθησίας του ασκορβικού οξέος στην οξείδωση, η αποτελεσματικότητά του είναι εγγυημένη μόνο όταν η επαφή του με τον αέρα είναι περιορισμένη. Με άλλα λόγια, προστατεύει καλά από μικρούς, σύντομους αερισμούς αλλά όχι από έντονη ή συνεχή οξείδωση. Ο ρόλος του περιορίζεται στην προστασία του οίνου μετά την εμφιάλωση, όταν η επαφή με τον αέρα είναι μικρή. Δεν είναι αποτελεσματικό για παρατεταμένη αποθήκευση σε δεξαμενές ή βαρέλια (Ribereau-Gayon *et al.*, 2006).

Παρουσία μεγάλης ποσότητας οξυγόνου, το ασκορβικό οξύ οξειδώνεται και σχηματίζεται υπεροξείδιο του υδρογόνου, ένα ισχυρό οξειδωτικό, και μερικές φορές και άλλα υπεροξείδια, τα οποία σε συνδυασμό με την παρουσία καταλυτών, μπορούν να προκαλέσουν πλήρη οξείδωση ορισμένων συστατικών του οίνου. Τα ίδια συστατικά, απουσία ασκορβικού οξέος, δεν θα είχαν οξειδωθεί από το μοριακό οξυγόνο (Ribereau-Gayon *et al.*, 2006).

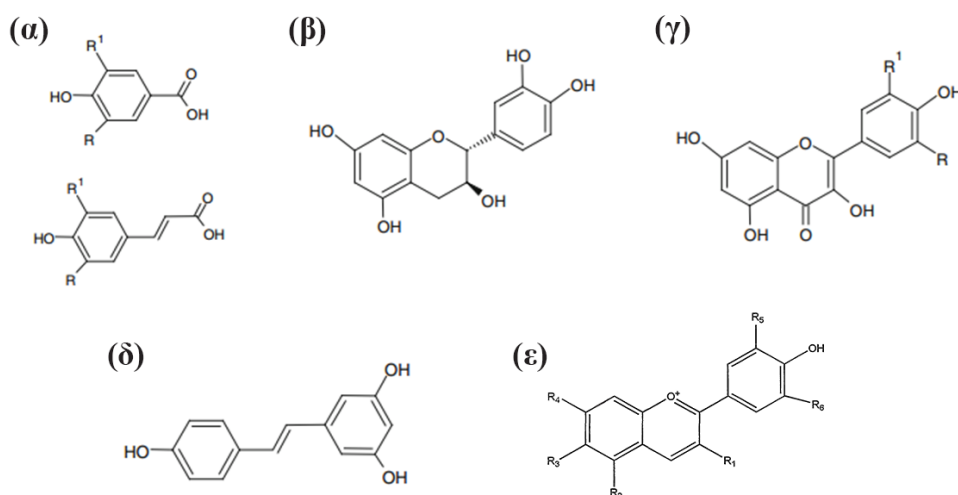
Επομένως το ασκορβικό οξύ χρησιμοποιείται μόνο σε συνδυασμό με το SO_2 για να δεσμεύσει το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) που παράγεται από την οξείδωση του ασκορβικού οξέος (Bradshaw *et al.*, 2011). Η χρήση αυτού του αντιοξειδωτικού δεν συνιστάται χωρίς την παρουσία επαρκών δόσεων ελεύθερου SO_2 . Στην ερυθρή οινοποίηση, η αφθονία των τανινών και το χαμηλότερο ελεύθερο SO_2 που υφίσταται αποτελεί σοβαρό εμπόδιο στη χρήση του ασκορβικού οξέος (Giacosa *et al.*, 2019).



Εικόνα 6. Μοριακή δομή ασκορβικού οξέος

Φαινολικές Ενώσεις

Οι κύριες φαινολικές ενώσεις (Εικ. 7) στον οίνο, δηλαδή τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή, τα στυλβένια, οι τανίνες και οι ανθοκυάνες είναι υπεύθυνες για πολλά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου, όπως για παράδειγμα το χρώμα και η στυπτικότητα. Οι χημικές τους δομές, τους επιτρέπουν να δεσμεύουν και να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες (Ribereau-Gayon, *et al.*, 2006). Οι ίδιες είναι ικανές να οξειδώνονται διαδοχικά σε ημικινόνες και κινόνες, ενώ ταυτόχρονα το οξυγόνο ανάγεται σε υδρο-υπεροξειδικές ρίζες και υπεροξείδιο του υδρογόνου. Αυτή η διαδικασία καταλύεται από τον κύκλο οξειδοαναγωγής $\text{Fe}^{3+} / \text{Fe}^{2+}$ και τα ριζικά ενδιάμεσα που δημιουργούνται μπορούν να αντιδράσουν και αυτά με το οξυγόνο και να αναχθούν (Ribereau-Gayon, *et al.*, 2006., Oliveira *et al.*, 2011., Karbowiak *et al.*, 2010). Η αντιοξειδωτική αυτή τους δράση έχει συσχετιστεί με θετικές επιδράσεις σε ασθενείς με καρδιαγγειακά και εκφυλιστικά νοσήματα που κατανάλωσαν οίνο (Oliveira *et al.*, 2011).



Εικόνα 7. 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 τανινών, μπορεί να επηρεάσει τα οξειδωτικά φαινόμενα στο γλεύκος και στον οίνο, πιθανόν μέσω ενός διπλού μηχανισμού ενζυμικής αναστολής, απεντοπισμού και σταθεροποίησης των ελευθέρων ριζών (Sonni *et al.*, 2009). Η προσθήκη τανινών παρέχει καλύτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά σε σχέση με το SO₂ (Sonni *et al.*, 2009), χωρίς να επηρεάζει την διαδικασία της ζύμωσης (Cejudo-Bastante *et al.*, 2010). Ωστόσο, οι Bautista-Ortin *et al.* (2005) έδειξαν ότι η χρήση δύο διαφορετικών οινολογικών τανινών (γαλλοταννινών και προκυανιδινών) δεν επέφερε καμία βελτίωση στα χρωματικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των ερυθρών οίνων, ενώ αντίθετα αύξησαν το κίτρινο χρώμα.

Φαινολικά εκχυλίσματα που λήφθηκαν από οινολογικά προϊόντα παρουσίασαν αντιμικροβιακή δράση έναντι των στελεχών *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* και *Candida albicans* (Bartowsky EJ., 2009, Papadopoulou *et al.*, 2005). Επίσης, τα φαινολικά οξέα και τα φλαβονοειδή δρουν αποτελεσματικά έναντι παθογόνων βακτηρίων (Garcia-Ruiz *et al.*, 2008, Bartowsky EJ., 2009, Campos *et al.*, 2009; Vaquero *et al.*, 2007, Garcia-Ruiz *et al.*, 2009, 2011., Harris *et al.*, 2010). Η αντιμικροβιακή δράση των φαινολικών ενώσεων οφείλεται στην ικανότητά τους να αυξάνουν την διαπερατότητα των κυτταροπλασματικών μεμβρανών, με αποτέλεσμα τη διαρροή συστατικών των βακτηριακών κυττάρων (Campos *et al.*, 2009).

Οι διαφορετικές επιδράσεις των φαινολικών ενώσεων έχουν σχέση με τις διαφορές στη δομή τους, τον λιπόφιλο χαρακτήρα τους και ιδιαίτερα τη συγκέντρωση στην οποία προστίθενται (Campos *et al.*, 2009; Vaquero *et al.*, 2007). Έτσι σε μια μελέτη που διεξήχθη, οι φλαβανόλες και τα στυλβένια παρουσίασαν μεγαλύτερη ικανότητα αναστολής στην ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων, τα φαινολικά οξέα και οι εστέρες αυτών μέτρια ικανότητα ενώ οι φλαβαν-3-όλες επέδειξαν την μικρότερη ικανότητα αναστολής (García-Ruiz *et al.*, 2011).

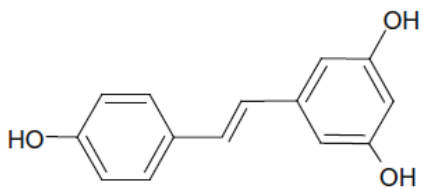
Ωστόσο, παρά τα ελπιδοφόρα αποτελέσματα, η αντιμικροβιακή δράση των φαινολικών ενώσεων υφίσταται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις από εκείνες που συνήθως απαντώνται στους οίνους. Επομένως, η εφαρμογή των φαινολικών ενώσεων ως αντιμικροβιακών παραγόντων στους οίνους εξαρτάται από τις πιθανές αλλαγές που θα μπορούσαν να προκαλέσουν οι αποτελεσματικές συγκεντρώσεις αυτών των ενώσεων στο φυσικοχημικό (ιξώδες) προφίλ και στις οργανοληπτικές

ιδιότητες (χρώμα, γεύση και στυπτικότητα) του οίνου (García-Ruiz *et al.*, 2008). Συνεπώς, μια αποτελεσματική προσέγγιση για τη συντήρηση του οίνου χωρίς την χρήση SO₂ θα ήταν η προσθήκη φαινολικών ενώσεων, λόγω της αντιοξειδωτικής τους δράσης, σε συνδυασμό με DMDC και βακτηριοσίνες για προστασία από παθογόνους μικροοργανισμούς. Βέβαια, οι ιδανικές αναλογίες των τριών δεν είναι γνωστές και η χρήση βακτηριοσινών ακόμα δεν έχει εγκριθεί.

Φυτικά Εκχυλίσματα

Φυτικά εκχυλίσματα και άλλα φυσικά προϊόντα έχουν δοκιμαστεί επίσης για την αντιοξειδωτική δράση τους, ωστόσο η διαθεσιμότητα, η τιμή και οι νομικοί κανονισμοί, ανάλογα με το προϊόν, ενδέχεται να περιορίσουν τη χρήση τους ως πιθανές αντικαταστάσεις του SO₂. Ένα σχετικά πρόσφατο παράδειγμα αυτών των πιθανών αντιοξειδωτικών είναι ένα εκχύλισμα από τους βλαστούς της αμπέλου, το οποίο δοκιμάστηκε σε δυο διαφορετικές συγκεντρώσεις σε ερυθρούς οίνους χωρίς SO₂ και μελετήθηκαν τα ποιοτικά και τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά (Raposo *et al.*, 2017). Παρατηρήθηκε ότι οι οίνοι που είχαν επεξεργαστεί με το εκχύλισμα είχαν σταθερότερο το χρώμα λόγω αύξησης των πολυμερισμού των ανθοκυανινών και εμφάνιζαν ελαφρώς υψηλότερη μείωση τανινών. Ταυτόχρονα στον οργανοληπτικό έλεγχο βαθμολογήθηκαν χαμηλότερα για την ισορροπία τους και για τη γενικότερη ποιότητα τους σε σχέση με τους οίνους με SO₂.

Οι ίδιοι μελετητές σε προηγούμενη έρευνα εξέτασαν ένα προϊόν που περιείχε 29% στιλβένια (Εικ. 8) σε σύγκριση με ένα μάρτυρα που πρόσθεσαν SO₂ (Raposo *et al.*, 2016). Οι οίνοι Syrah που παρήχθησαν με το εκχύλισμα βλαστού αμπέλου έδειξαν στο τέλος της οινοποίησης βελτιωμένη ένταση χρώματος και καλύτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά από τον μάρτυρα (SO₂). Παρ' όλα αυτά, μετά από δώδεκα μήνες στη φιάλη παρατηρήθηκε αύξηση στα αρώματα οξείδωσης σε συνδυασμό με μια μείωση της έντασης του χρώματος και υψηλότερη απόχρωση χρώματος, σε σχέση με τους οίνους με SO₂. Τέλος, απαιτείται περεταίρω έρευνα για να αξιολογηθούν και να πιστοποιηθούν αυτά τα προϊόντα ώστε να εισχωρήσουν στην οινική βιομηχανία.



Εικόνα 8. Μοριακή δομή στιλβενίου, η trans-ρεζερατρόλη.

Τεχνικές Υποκατάστασης SO₂

Παλμικά ηλεκτρικά πεδία (PEF)

Τα παλμικά ηλεκτρικά πεδία (PEF) αποτελούν μια μη θερμική εφαρμογή βραχέων παλμών υψηλής τάσης σε ένα προϊόν, μεταξύ δύο ηλεκτροδίων εντός ενός θαλάμου επεξεργασίας (Pataro *et al.*, 2011, Raso *et al.*, 1998). Το παραγόμενο ηλεκτρικό πεδίο μπορεί να ηλεκτροδιατρύει κύτταρα αυξάνοντας τη διαπερατότητά τους (Golberg & Rubinsky, 2013) με μόνιμο ή προσωρινό τρόπο (Kurata, Nomura, & Takamatsu, 2014). Αυτή η ηλεκτροδιάτρηση μπορεί να ενισχύσει την απελευθέρωση των πολυφαινολικών ενώσεων και των αρωματικών προδρόμων που συνήθως βρίσκονται στους φλοιούς των σταφυλιών (Lopez-Alfaro *et al.*, 2013, López-Giral *et al.*, 2015). Επιπλέον, ο σχηματισμός πόρων στον κυτταρικό τοίχωμα είναι θανατηφόρος για τους μικροοργανισμούς.

Στην πραγματικότητα, τα PEF έχει αποδειχθεί ότι είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για την απενεργοποίηση των μικροοργανισμών που σχετίζονται με τον οίνο (González-Arenzana *et al.*, 2015, Marsellés-Fontanet *et al.*, 2009, Puertolas *et al.*, 2010, Saldaña *et al.*, 2009). Πρόσφατα, αποδείχθηκε ότι η τεχνολογία PEF μετά από την αλκοολική ζύμωση μειώνει σημαντικά τα φορτία των ζυμομυκήτων και των οξικών βακτηρίων και σε μικρότερο βαθμό τον πληθυσμό των γαλακτικών βακτηρίων (González-Arenzana *et al.*, 2018). Σε μια άλλη μελέτη που διεξήχθη, παρατηρήθηκε μετά την εφαρμογή των PEF η ίδια τάση σε τρεις διαφορετικούς οίνους μετά την μηλογαλακτική ζύμωση. Συνοπτικά, η τεχνική PEF αποτελεί εναλλακτική λύση στη χρήση του SO₂ τόσο από την άποψη μικροβιολογικής σταθεροποίησης όσο και από την φυσικοχημική και οργανοληπτική σκοπιά χωρίς όμως να παρέχει αντιοξειδωτική προστασία. Ωστόσο, τα περισσότερα από τα πειράματα με PEF έχουν διεξαχθεί σε συγκεκριμένες συνθήκες, χωρίς να

λαμβάνονται υπόψιν οι διάφορες δυσκολίες που μπορεί να προκύψουν στα διάφορα στάδια της οινοποίησης.

Υπεριώδης Ακτινοβολία

Η υπεριώδης ακτινοβολία (UV) περιλαμβάνει τη χρήση ακτινοβολίας από το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα από 100 έως 400 nm και κατηγοριοποιείται ως UV-A (320- 400 nm), UV-B (280- 320 nm) και UV-C (200- 280 nm) (Keyser *et al.*, 2008). Την τελευταία δεκαετία, η UV ακτινοβολία χρησιμοποιείται ως μια μη θερμική μέθοδος για την απολύμανση του νερού, επιφανειών και συσκευασιών στη βιομηχανία τροφίμων (Falguera *et al.*, 2011). Με την εφαρμογή της υπεριώδους ακτινοβολίας δεν σχηματίζονται τοξικά παραπροϊόντα, καταστρέφονται οργανικοί ρύποι και απαιτείται πολύ λιγότερη ενέργεια σε σχέση με τις θερμικές διαδικασίες παστερίωσης (Keyser *et al.*, 2008). Συγκεκριμένα, η UV-C χρησιμοποιείται στην επεξεργασία τροφίμων για την απενεργοποίηση μικροοργανισμών (βακτηρίων και ζυμών) και ενζύμων (ειδικά πολυφαινολοξειδασών) σε πολλούς διαφορετικούς τύπους υγρών προϊόντων, χωρίς να αλλάζουν σημαντικά τα ποιοτικά τους χαρακτηριστικά.

Η απενεργοποίηση των ενζύμων κατά την έκθεση σε UV-C ακτινοβολία συμβαίνει ως συνέπεια της συσσωμάτωσης πρωτεϊνών (Manzocco *et al.*, 2009), ενώ η απενεργοποίηση των μικροοργανισμών οφείλεται κυρίως σε βλάβη που προκαλεί στο DNA, η οποία καταστρέφει τις αναπαραγωγικές ικανότητες και άλλες λειτουργίες του κυττάρου (Tiwari *et al.*, 2009b). Ωστόσο η αποτελεσματικότητα της UV-C ακτινοβολίας εξαρτάται από χαρακτηριστικά του προϊόντος όπως το χρώμα, η απορρόφηση, η πυκνότητα, τα αιωρούμενα σωματίδια και τα διαλυτά στερεά που μπορούν να εμποδίσουν την UV-C να φτάσει στους μικροοργανισμούς (Fredericks *et al.*, 2011, Begum *et al.*, 2009, Koutchma, 2009). Η χρήση της υπεριώδους ακτινοβολίας ως εναλλακτική τεχνολογία για τη συντήρηση του οίνου έχει αξιολογηθεί από τους Fredericks *et al.* (2011). Η τεχνική αναστέλλει αποτελεσματικά ένα ευρύ φάσμα μικροοργανισμών οίνου όπως *Brettanomyces*, *Saccharomyces*, *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* και *Oenococcus* (Santos *et al.*, 2012) και μειώνει σημαντικά τους πληθυσμούς των γαλακτικών βακτηρίων (Gailunas *et al.*, 2008).

Παρ' όλα αυτά, ο βαθμός της μικροβιακής αναστολής που επιτυγχάνεται στον ερυθρό οίνο είναι μικρότερος σε σχέση με τον λευκό, διότι οι φαινολικές ενώσεις που είναι παρούσες στον

ερυθρό απορροφούν ακτινοβολία στην περιοχή UV του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, εμποδίζοντας έτσι τη μετάδοση της ακτινοβολίας στους μικροοργανισμούς (Fredericks *et al.*, 2011). Επίσης, ακόμα και στους λευκούς οίνους, η UV ακτινοβολία θα πρέπει να χρησιμοποιείται στα τελικά στάδια της οινοποίησης τους, όπου η θολερότητα είναι πιο μικρή. Άλλοι περιορισμοί στη χρήση της είναι ο μεγάλος απαιτούμενος χρόνος έκθεσης του οίνου στην ακτινοβολία και ο μικρός όγκος στον οποίο μπορεί να εφαρμοστεί (Santos *et al.*, 2012).

Υπέρηχοι

Η χρήση υπερήχων είναι μια εναλλακτική μέθοδος έναντι της συμβατικής θερμικής τεχνικής, για παστερίωση και αποστείρωση τροφίμων (O'Donnell *et al.*, 2010). Η απενεργοποίηση παθογόνων και αλλοιογόνων μικροοργανισμών και ενζύμων μέσω της κατεργασίας με υπερήχους, λαμβάνει χώρα κυρίως μέσω φυσικών ή/και χημικών φαινομένων (O'Donnell *et al.*, 2010; Piyasena *et al.*, 2003; Tiwari *et al.*, 2009b). Πιο συγκεκριμένα, οι υπερήχοι προκαλούν παστερίωση δημιουργώντας εντοπισμένες υψηλές αυξήσεις της θερμοκρασίας (ξεπερνώντας τους 5500° C) και πιέσεις μέχρι 50 MPa χωρίς να προκαλείται σημαντική αύξηση της μακροθερμοκρασίας (Tiwari *et al.*, 2009a).

Η αποτελεσματικότητα των υπερήχων εξαρτάται από τον τύπο και τον πληθυσμό των βακτηρίων και την συχνότητα μήκους κύματος του υπερήχου. Οι Tsukamoto *et al.* (2004) έδειξαν ότι ο ρυθμός απενεργοποίησης των κυττάρων του *Saccharomyces cerevisiae* με εφαρμογή υπερήχων εξαρτάται από τη συχνότητα των κυμάτων και τον αρχικό αριθμό των κυττάρων. Το υψηλότερο αποτέλεσμα παρατηρείται σε υψηλότερες συχνότητες και χαμηλότερο αρχικό μικροβιακό πληθυσμό, όπως επιβεβαιώθηκε και από τους Borthwick *et al.* (2005).

Οι Jiraneck *et al.* (2008) αναφέρουν επίσης ότι η επεξεργασία με υπερήχους μπορεί να χρησιμοποιηθεί κατά τη διάρκεια της ζύμωσης για να μειωθούν οι αλλοιογόνοι οργανισμοί πριν από τον εμβολιασμό με ζύμες ή και κατά την έναρξη της μηλογαλακτικής. Η χρήση υπερήχων μπορεί να σταματήσει ή να καθυστερήσει την μηλογαλακτική ή, αντίθετα, μπορεί να επιταχύνει την αυτολύση ζυμών και να προωθήσει την μηλογαλακτική ζύμωση. Επίσης, οι υπερήχοι έχουν την ικανότητα να αυξάνουν την ποσότητα των φαινολικών ενώσεων στον ερυθρό οίνο και να επιταχύνουν την παλαίωση (Masuzawa *et al.* 2000), αυξάνοντας τα οικονομικά πλεονεκτήματα αυτής της τεχνολογίας στην οινοποίηση.

Υψηλή Υδροστατική Πίεση (HHP)

Μια αναδυόμενη τεχνική που παρουσιάζει ενδιαφέρον όσον αφορά την πιθανή χρήση της σαν εναλλακτική τεχνική για μείωση ή ακόμα και αντικατάσταση του SO₂ στους οίνους είναι η υψηλή υδροστατική πίεση (HHP). Η υψηλή υδροστατική πίεση (HHP) είναι μια μη θερμική τεχνική με την οποία τα προϊόντα υποβάλλονται σε πιέσεις μεταξύ 100 και 1000 MPa (Cao *et al.*, 2011) στιγμιαία και ομοιόμορφα, ανεξάρτητα από το μέγεθος και το σχήμα του προϊόντος (Cao *et al.*, 2011, Ramirez *et al.*, 2009).

Η χρήση της HHP, την τελευταία δεκαετία, έχει αυξηθεί σημαντικά για τη συντήρηση και την επεξεργασία των τροφίμων, καθώς και για τη δημιουργία νέων τύπων προϊόντων διατροφής. Η τεχνολογία της υψηλής υδροστατικής πίεσης αδρανοποιεί μικροοργανισμούς (Ferreira *et al.*, 2009, Smelt J., 1998) και ένζυμα (Castro *et al.*, 2011, Rastogi *et al.*, 2007) και τροποποιεί τις λειτουργικές ιδιότητες ορισμένων συστατικών των τροφίμων (Correia *et al.*, 2011, Moerman F. 2005) με ελάχιστες επιπτώσεις στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και τη θρεπτική τους αξία (Ramirez *et al.*, 2009).

Η μικροβιακή αδρανοποίηση που προκαλείται, πραγματοποιείται πιθανώς επεμβαίνοντας στις κυτταρικές λειτουργίες και τις κυτταρικές δομές (μεμβράνες, ριβοσώματα, ένζυμα) (Wuytack *et al.*, 2002), οδηγώντας σε διάρρηξη της κυτταρικής μεμβράνης. Δεδομένου ότι η HHP δρα διακόπτοντας μη ομοιοπολικούς δεσμούς, χωρίς να επηρεάζει τους ομοιοπολικούς (Moerman F. 2005), τα τρόφιμα που έχουν υποστεί επεξεργασία HHP διατηρούν την αρχική τους φρεσκάδα, γεύση, άρωμα και χρώμα. Τα μικρότερα μόρια, όπως πτητικές ενώσεις, χρωστικές, βιταμίνες και άλλες ενώσεις υπεύθυνες για οργανοληπτικά και θρεπτικά οφέλη, διατηρούνται σε μεγάλο βαθμό μετά την εφαρμογή της HHP (Cao *et al.*, 2011). Ένα άλλο πλεονέκτημα της τεχνικής είναι ότι δίνει τη δυνατότητα επεξεργασίας τροφίμων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ή και σε ακόμη χαμηλότερες θερμοκρασίες εξαλείφοντας τις βλάβες που προκαλούν οι θερμικές κατεργασίες (Nunes *et al.*, 2017). Ωστόσο, λόγω της χημικής πολυπλοκότητας των προϊόντων διατροφής, καθιστάται δύσκολο να γενικευθεί η επίδραση της HHP για όλα τα διαφορετικά τρόφιμα (Welti-Chanes *et al.*, 2002).



Εικόνα 9. Όργανο εφαρμογής της Υψηλής Υδροστατικής Πίεσης

Εφαρμογές Υψηλής Υδροστατικής Πίεσης (HHP)

Εφαρμογές HHP στον Οίνο

Στον οινολογικό τομέα, η χρήση της υψηλής υδροστατικής πίεσης έχει ήδη δοκιμαστεί για τη διατήρηση της ποιότητας του χυμού σταφυλιών, του γλένκου (Daoudi *et al.*, 2002, Delfini *et al.*, 1995, Puig *et al.*, 2008, Talcott *et al.*, 2003), καθώς και του οίνου (Buzrul, 2012, Mok *et al.*, 2006, Morata *et al.* 2012, Puig *et al.*, 2003, Santos *et al.*, 2013a, 2013b, 2016, Sun *et al.*, 2015, Tao *et al.*, 2012, 2016), επιτρέποντας την παραγωγή οίνων με χαμηλότερες ποσότητες θειώδους ανυδρίτη.

Οι μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε γλεύκη και οίνους έδειξαν ότι μικροοργανισμοί, όπως οι ζυμομύκητες (*S. cerevisiae* και *Brettanomyces bruxellensis*), τα γαλακτικά βακτήρια (*Leuconostoc oenos*, *Lactobacillus spp.* και *O. oeni*), και τα οξικά βακτήρια (*Acetobacter aceti* και *Acetobacter pasteurianus*) (*Botrytis cinerea*), αδρανοποιήθηκαν με πιέσεις της τάξεως 300-400 MPa κατά τη διάρκεια 5-30 λεπτών στους 20 °C (Buzrul, 2012, Delfini *et al.*, 1995, Mok *et al.*, 2006, Puig *et al.*, 2003). Τα αερόβια βακτήρια παρουσίασαν μεγαλύτερη ευαισθησία στην HHP από τις ζύμες και τα γαλακτικά βακτήρια (Mok *et al.*, 2006). Σε αυτές τις μελέτες παρατηρήθηκε επίσης ότι η HHP δεν επηρέασε τη δραστητικότητα της PPO, την περιεκτικότητα σε αλκοόλη, την

ολική και πτητική οξύτητα, το ελεύθερο και το ολικό SO₂, την πρωτεϊνική σταθερότητα, το μηλικό οξύ, το γαλακτικό οξύ, τα αναγωγικά σάκχαρα και το pH σε σύγκριση με τους μη «πιεσμένους» οίνους.

Ωστόσο, άλλες μελέτες που διεξήχθησαν σε χυμό σταφυλιού Muscadine έδειξαν ότι η υψηλή πίεση, ανάλογα με την πίεση και το χρόνο πίεσης, μπορεί να ενεργοποιήσει την PPO, οδηγώντας σε μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας και της περιεκτικότητας σε ανθοκυάνες (Talcott *et al.*, 2003, Del Pozo-Insfran *et al.*, 2007). Παράλληλα, οι Ludikhuyze *et al.* (2002) και οι Castellari *et al.* (1997) ανέφεραν την απενεργοποίηση της PPO σε γλεύκος, σε πιέσεις άνω των 700 MPa.

Η HHP εκτός από τη χρήση της για τη συντήρηση του οίνου, έχει δοκιμαστεί επίσης και για την δυνατότητα της να καθυστερήσει την δημιουργία θολώματος στον οίνο κατά την αποθήκευση. Οι πιέσεις της τάξεως των 450 MPa για τρία και πέντε λεπτά έδειξαν ότι μειώνουν την α -ελικοειδή δομή των πρωτεϊνών του οίνου, λόγω αύξησης των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών και άλλων μη πρωτεϊνικών ενώσεων. Αυτές οι δομικές αλλαγές βελτίωσαν την θερμική σταθερότητα των πρωτεϊνών του οίνου, καθυστερώντας τη δημιουργία θολώματος κατά την αποθήκευση (Tabilo-Munizaga *et al.*, 2014).

Πρόσφατα, η HHP προτάθηκε επίσης ως οινολογική πρακτική για την προσομοίωση της παλαίωσης του ερυθρού οίνου, δεδομένου ότι προωθεί πολλές χημικές αντιδράσεις, όπως τη φαινολική συμπύκνωση και τις αντιδράσεις Maillard. Αυτές οι αντιδράσεις δημιουργούν νέες ενώσεις, οι οποίες προσδίδουν ευχάριστα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά στον οίνο (Santos *et al.*, 2016, 2015, Sun *et al.*, 2016, Tao *et al.*, 2016). Ωστόσο, οι Tao *et al.* (2012) έδειξαν ότι λόγω της αύξησης των αντιδράσεων συμπύκνωσης φαινολικών ενώσεων σε υψηλές πιέσεις (650 MPa για 1 και 2 ώρες) παρουσιάστηκε μείωση στην ένταση του χρώματος και στην περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις. Επίσης, μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η πρακτική της υψηλής υδροστατικής πίεσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μέθοδος παλαίωσης, όσον αφορά την φαινολική σύσταση του οίνου. Η HHP βρέθηκε να προωθεί τις ίδιες αντιδράσεις με την μικροοξυγόνωση, κυρίως λόγω της υψηλής συγκέντρωσης O₂ που διαλύεται στον οίνο, προσδίδοντας στον οίνο χαρακτηριστικά παλαιωμένου οίνου όσον αφορά την φαινολική σύσταση (Santos *et al.*, 2018).

Μετά από έρευνα που διεξήχθη βρέθηκε επιπλέον ότι η HHP επιταχύνει τις αντιδράσεις Maillard, οδηγώντας σε περισσότερο καφέ χρώμα, άρωμα μαγειρεμένων φρούτων, χαμηλότερη περιεκτικότητα σε ελεύθερα αμινοξέα και υψηλότερη περιεκτικότητα σε φουράνια, χαρακτηριστικά που απαντώνται σε παλαιωμένους οίνους (Moreno *et al.*, 2003, Santos *et al.*, 2013b). Οι πτητικές ενώσεις που σχηματίστηκαν από τις αντιδράσεις Maillard μεταξύ «πιεσμένων» και «απίεστων», φάνηκε να είναι λιγότερες στους ερυθρούς οίνους σε σχέση με τους λευκούς. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην υψηλότερη περιεκτικότητα του ερυθρού οίνου σε πολυφαινόλες, οι οποίες μειώνουν τον ρυθμό των αντιδράσεων Maillard, λόγω της αντιοξειδωτικής τους δράσης (Oliveira *et al.*, 2011). Έχει επιβεβαιωθεί επίσης ότι η επεξεργασία με υψηλή πίεση επηρεάζει / επιταχύνει τις αντιδράσεις παλαίωσης του οίνου τόσο στους ερυθρούς όσο και στους λευκούς οίνους, με αποτέλεσμα την αλλοίωση του χρώματος τους κατά την αποθήκευση (López de Lerma *et al.*, 2010, Santos *et al.*, 2013a, 2013b). Οι «πιεσμένοι» λευκοί οίνοι, λόγω του υψηλού καφέ χρώματος, δεν θεωρούνται εμπορικοί.

Στους «πιεσμένους» οίνους παρατηρήθηκε επίσης μείωση της ολικής περιεκτικότητας σε μονομερείς ανθοκυάνες, γεγονός που οφειλόταν κυρίως στη χαμηλότερη περιεκτικότητα σε 3-γλυκοζίτη της μαλβιδίνης, ανθοκυανίνη η οποία βρίσκεται σε πληθώρα στους ερυθρούς οίνους (Morata *et al.*, 2012 Santos *et al.*, 2013a). Επιπροσθέτως τους ίδιους οίνους μειώθηκε η περιεκτικότητα σε φαινολικά οξέα και σε φλαβονόλες (Santos *et al.*, 2015, Sun *et al.*, 2016, Tao *et al.*, 2012). Όταν η πίεση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου επιταχύνει τις αντιδράσεις συμπύκνωσης και οξείδωσης των φαινολικών ενώσεων (ανθοκυανίνες και φλαβαν-3-όλες) ενώ ταυτόχρονα επηρεάζει τις αντιδράσεις πολυμερισμού και διάσπασης των προανθοκυανιδινών. Παράλληλα η διάρκεια και οι συνθήκες πίεσης έχουν μεγάλη επίδραση στη φαινολική σύσταση των οίνων (Chen *et al.*, 2012, Santos *et al.*, 2015, Tao *et al.*, 2012). Ο πολυμερισμός των φαινολικών ενώσεων του οίνου δημιουργεί ενώσεις με υψηλότερο βαθμό πολυμερισμού που καθίστανται αδιάλυτες στο οίνο κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης του. Ο «πιεσμένος» οίνος, μετά από εννιά μήνες αποθήκευσης παρουσίασε υψηλότερη συνολική φαινολική περιεκτικότητα, και πιο συγκεκριμένα προανθοκυανίνες (Santos *et al.*, 2013a).

Εφαρμογές HHP στα Τρόφιμα

Η χρήση υψηλής πίεσης στα τρόφιμα εφαρμόζεται σε προϊόντα κρέατος (31% όλων των βιομηχανικών εφαρμογών), σε φυτικά προϊόντα (35%), σε χυμούς και ποτά (12%), σε θαλασσινά και ψάρια (14%) σε άλλα προϊόντα (8%). Τα επίπεδα πίεσης που εφαρμόζονται για την παστερίωση των κρεάτων και των προϊόντων κρέατος, κυμαίνονται σε πιέσεις μεταξύ 400-600 MPa με μικρούς χρόνους επεξεργασίας (3-7 λεπτά) σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στις περισσότερες περιπτώσεις, αυτές οι εφαρμογές οδηγούν στην μείωση των συνηθέστερων φυτικών παθογόνων και αλλοιογόνων μικροοργανισμών (*E.coli*, *Listeria* και *Salmonella*) με αποτέλεσμα να βελτιώνεται η ασφάλεια και να παρατείνεται η διάρκεια ζωής του προϊόντος (Koutchma T., 2014).

Στα φρούτα και στα λαχανικά, η HHP απενεργοποιεί τους μικροοργανισμούς *Salmonella*, *E. Coli* και *L. monocytogenes* σε ρευστά και ημιρευστά προϊόντα φρούτων και λαχανικών. Το χρώμα των προϊόντων (π.χ. μαρμελάδες, χυμοί φρούτων) παραμένει αμετάβλητο εάν τηρηθούν κάποια όρια θερμοκρασίας ή /και pH, ενώ παράλληλα διατηρούνται οι φρέσκες γεύσεις. Για παράδειγμα, οι Cao *et al.* (2011) έδειξαν ότι οι επεξεργασίες με υψηλή πίεση από 400 έως 600 MPa σε θερμοκρασία δωματίου μπορούν να απενεργοποιήσουν την PPO, την υπεροξειδάση (POD) και τη β -γλυκοσιδάση, διατηρώντας ταυτόχρονα τις μονομερείς και πολυμερείς ανθοκυανίνες και τις μεμονωμένες φαινολικές ενώσεις σε πολτό φράουλας. Η HHP προσφέρει πλεονεκτήματα για την ασφάλεια και την επέκταση της διάρκειας ζωής στους χυμούς και άλλα ποτά, χωρίς την εφαρμογή θερμότητας ή προσθήκη συντηρητικών, εφόσον με πιέσεις μεταξύ 400 και 600 MPa από 1 έως 10 λεπτά μειώνει τους παθογόνους μικροοργανισμούς (*E. Coli* O157: H7, *Salmonella*, *Listeria* και *Cryptosporidium*) (Koutchma T., 2014).

Στη γαλακτοβιομηχανία, η τεχνολογία της HHP όχι μόνο απενεργοποιεί μικρόβια και ένζυμα στο νωπό γάλα, αλλά και βελτιώνει την ποιότητα και την απόδοση γαλακτοκομικών προϊόντων όπως το τυρί και το γιαούρτι. Η απενεργοποίηση των ζυμομυκήτων και των μυκήτων είχε ως αποτέλεσμα να διατηρείται, έως και 3 μήνες, μειωμένος ο πληθυσμός των *Lactobacillus* και να διατηρούνται κάποια βιοδραστικά συστατικά όπως η λακτοφερρίνη και οι ανοσοσφαιρίνες, χωρίς την αλλοίωση των φυσικών τους ιδιοτήτων. Επιπλέον, η HHP χρησιμοποιείται για τον επιλεκτικό έλεγχο των καλλιεργειών εκκίνησης γιαουρτιού (Koutchma T., 2014).

Τέλος, ο διαχωρισμός του κρέατος από το κέλυφος στους αστακούς, τα στρείδια, τα μύδια και άλλα φρέσκα προϊόντα επιτυγχάνεται με μετουσίωση μιας πρωτεΐνης που κρατά το κρέας στο κέλυφος. Η υψηλή υδροστατική πίεση επιτρέπει τη μέγιστη απόδοση προϊόντος χωρίς να προκαλεί μηχανική βλάβη στο προϊόν, ανεξάρτητα από το μέγεθος. Οι πιέσεις της HHP όχι μόνο καταστρέφουν πολλούς μικροοργανισμούς *Vibrio* (*parahaemolyticus*, *cholerae*, *vulnificus*) στα ακατέργαστα μύδια αλλά και απενεργοποιούν ορισμένα ένζυμα που έχουν ως αποτέλεσμα την υποβάθμιση των θαλασσινών προϊόντων (Koutchma T., 2014).

Η ποικιλία Μούχταρο

Το Μούχταρο είναι μια σπάνια ερυθρή ποικιλία, η οποία εντοπίζεται στην Βοιωτία και συγκεκριμένα στην κοιλάδα των Μουσών, στους πρόποδες του Ελικώνα. Πιθανότατα αποτελούσε πρώτη ύλη για τον Βίβλινο Οίνο της αρχαιότητας, που περιέγραφε ο Ησίοδος περίπου το 700 π.Χ. Σύμφωνα με την ισχύουσα νομοθεσία, η καλλιέργεια της συγκεκριμένης ποικιλίας επιτρέπεται στις νομαρχιακές αυτοδιοικήσεις Βοιωτίας και Φωκίδας. Το Μούχταρο πιθανολογείται ότι είναι κλώνος της ποικιλίας Μαντηλαριά (Stavtrakaki και Biniari, 2017) και σχετικά πρόσφατα αποδείχθηκε ότι σχετίζεται στενά με την ποικιλία Μαύρη Κουντούρα (Merkouropoulos *et al.*, 2015). Χαρακτηριστικό της ποικιλίας είναι οι χαμηλές αποδόσεις, με αποτέλεσμα να είχε εγκαταλειφθεί για αρκετά χρόνια από τους οινοπαραγωγούς. Τα τελευταία χρόνια όμως γίνεται σημαντική προσπάθεια, κυρίως από το Κτήμα Μουσών για την αναβίωση και την αξιοποίηση της. Οι οίνοι από Μούχταρο εμφανίζουν σχετικά υψηλή οξύτητα, μαλακές τανίνες και αρώματα μαύρων και κόκκινων φρούτων, βοτάνων και φυτικότητα. Απαντάται επίσης με τα ονόματα: Μουχτούρι, Μοχτάρι, Μαύρο Αραχωβίτικο, Μουχτάρμα και Μούχτουρο.

Αμπελογραφικά χαρακτηριστικά:

Σταφυλή : μεσαίου μεγέθους, απλή και καμιά φορά διπλή, κωνική έως και πτερυγωτή, πυκνή προς έντονα πυκνή.

Ράγα : μέσου μεγέθους, σφαιρική ή δισκοειδής, κυανοϊώδης, καλυμμένη με κηρώδες επάνθισμα, επιδερμίδα λεπτή, στυφή· σάρκα μαλακή, χυμώδης, μικρής γλυκύτητας.

Ιδιότητες:

Πρέμνο ζωνρό, μετρίως παραγωγικό που διαμορφώνεται σε κυπελλοειδές και γραμμοειδές Royat και δέχεται κλάδεμα καρποφορίας βραχύ.

Τεχνολογική ωριμότητα γύρω στο τρίτο δεκαήμερο του Σεπτεμβρίου (Σταύρακας, 2010).



Εικόνα 10. Μούχταρο, Κοιλάδα Μουσών, Βοιωτία

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Σκοπός-Πειραματικός Σχεδιασμός

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το διοξείδιο του θείου (SO_2) προστίθεται στον οίνο για να αποφευχθεί η οξείδωση αλλά και για την δράση του ως αντιμικροβιακός παράγοντας έναντι μεγάλης ποικιλίας μικροοργανισμών (Ribereau-Gayon, *et al.*, 2006). Ωστόσο, το SO_2 σχετίζεται με αλλεργικές αντιδράσεις σε διάφορους καταναλωτές (Vally *et al.*, 2009). Ως εκ τούτου, η μέγιστη συγκέντρωση SO_2 που επιτρέπεται στους οίνους μειώθηκε σταδιακά (κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 607/2009) και εκδηλώθηκε μεγάλο ενδιαφέρον για την αναζήτηση άλλων συντηρητικών ή / και καινοτόμων τεχνολογιών για την ελαχιστοποίηση της χρήσης του στην οινοποίηση.

Η χρήση Υψηλής Υδροστατικής Πίεσης (HHP) έχει ήδη δοκιμαστεί στην οινοποίηση για τη συντήρηση του κρασιού (Santos *et al.*, 2016) υποδεικνύοντας ότι θα μπορούσε να είναι μια εναλλακτική διαδικασία στην προσθήκη SO_2 . Παρά ταύτα ενώ η HHP θα μπορούσε να προστατεύσει τον οίνο από τους μικροοργανισμούς, δεν επαρκεί πιθανόν ώστε να εμποδιστεί η οξείδωση. Έτσι στην παρούσα μελέτη, επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί το φυσικό αντιοξειδωτικό γλουταθειόνη (GSH) ώστε να βρεθεί η χαμηλότερη συγκέντρωση SO_2 , που απαιτείται για τη συντήρηση του οίνου, όταν συνδυάζεται με την HHP και την GSH.

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής είναι να μελετηθούν τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του οίνου που υποβάλλεται σε Υψηλή Υδροστατική Πίεση (HHP) σε χρονικό διάστημα έξι μηνών και να διερευνηθεί η πιθανότητα προσθήκης μειωμένων ποσοτήτων θειώδη ανυδρίτη όταν συνδυάζεται με την HHP και την προσθήκη γλουταθειόνης (GSH).

Η οινοποίηση έλαβε χώρα στο οινοποιείο του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών του εργαστηρίου Οινολογίας. Έπειτα από την ολοκλήρωση της οινοποίησης του ερυθρού οίνου, δημιουργήθηκε μια ομάδα δειγμάτων στην οποία έλαβε χώρα η προσθήκη 0, 20, 40, 60, 80 και 100 mg/L SO_2 και υποβλήθηκαν σε HHP (400 MPa για πέντε λεπτά, «πιεσμένα»). Παράλληλα δημιουργήθηκε και μια άλλη ομάδα δειγμάτων που περιείχαν τις ίδιες συγκεντρώσεις SO_2 αλλά χωρίς να υποβληθούν σε HHP, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες («απίεστα»). Επίσης σε όλα τα δείγματα προστέθηκε GSH (10 mg/L).

Μετά την οινοποίηση και τη διεξαγωγή όλων των βασικών αναλύσεων οίνου ώστε να προσδιοριστούν τα βασικά χαρακτηριστικά του, ακολούθησαν στοχευμένες αναλύσεις όπως θα αναλυθούν στην συνέχεια. Οι αναλύσεις πραγματοποιούνταν ανά τρεις μήνες για έξι μήνες (0,3 και 6 μήνες) από την οινοποίηση ώστε να αξιολογηθεί η εφαρμογή της Υψηλής Υδροστατικής Πίεσης σε συνδυασμό με την γλουταθειόνη στο χρόνο. Έτσι, η πειραματική διαδικασία έλαβε χώρα κατ' ουσία σε τρία διαφορετικά στάδια.

Οινοποίηση Σταφυλιών

Τα δείγματα οίνου προήλθαν από την οινοποίηση σταφυλιών της ερυθρής ποικιλίας Μούχταρο από το Κτήμα Μουσών. Το δεύτερο δεκαήμερο του Σεπτεμβρίου μετά τη συγκομιδή των σταφυλιών μεταφέρθηκαν στο οινοποιείο του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και παρέμειναν για μια νύχτα στους 8 °C. Την επόμενη μέρα έγινε η έκθλιψη και η αποβοστρύχωση των σταφυλιών ενώ πραγματοποιήθηκε κρυοεκχύλιση στους 10 °C καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας. Μετά από σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας στους 20 °C, ακολούθησε εμβολιασμός με ζύμη Safoeno HD S135 25g/hL και τέσσερις ώρες μετά προσθήκη Springferm:DAP (1:1, 25g/hL). Η παρακολούθηση της πορείας της αλκοολικής ζύμωσης έγινε με καθημερινές μετρήσεις των βαθμών Brix^ο και της θερμοκρασίας (T) ενώ παράλληλα έγινε η απαραίτητη προσθήκη οργανικού και ανόργανου αζώτου στα μέσα περίπου της αλκοολικής ζύμωσης Springferm:DAP (1:1, 10g/hL). για την ομαλή ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης. Ο διαχωρισμός των στεμφύλων έγινε την 8^η ημέρα επαφής με τα στέμφυλα. Μετά το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης ο οίνος παραλήφθηκε με μετάγγιση και απολασπώθηκε και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μηλογαλακτική ζύμωση.

Θείωση

Στον παραγόμενο οίνο προστέθηκαν 10mg/L γλουταθειόνη ενώ στην συνέχεια ο συνολικός όγκος χωρίστηκε ισόποσα σε έξι διαφορετικούς περιέκτες των δέκα λίτρων και πραγματοποιήθηκε διαφορετική θείωση σε κάθε περιέκτη. Στον πρώτο περιέκτη δεν πραγματοποιήθηκε θείωση (0 ppm ολικού θειώδους), ενώ στους υπόλοιπους περιέκτες προστέθηκε μεταμπισουλφίτ (metabisulfite- μεταδιθειώδες νάτριο) 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 και 2g/L ώστε ο τελικός ολικός θειώδης ανυδρίτης να βρίσκεται σε συγκεντρώσεις 20, 40, 60, 80 και 100 ppm αντίστοιχα. Η κωδικοποίηση που χρησιμοποιήθηκε για τα διαφορετικά δείγματα φαίνεται

παρακάτω στον Πίνακα 1. Τα δείγματα στα οποία έχει εφαρμοστεί η HHP, θα αναφέρονται ως «πιεσμένα», ενώ τα ακατέργαστα, όσον αφορά την HHP, θα αναφέρονται ως «απίεστα».

Πίνακας 1 Κωδικοποίηση Δειγμάτων

Κωδικός Δείγματος	HHP (πίεση)	SO ₂
hhp0X	Όχι (X)	0ppm
hhp20X	Όχι (X)	20ppm
hhp40X	Όχι (X)	40ppm
hhp60X	Όχι (X)	60ppm
hhp80X	Όχι (X)	80ppm
hhp100X	Όχι (X)	100ppm
hhp0	Ναι	0ppm
hhp20	Ναι	20ppm
hhp40	Ναι	40ppm
hhp60	Ναι	60ppm
hhp80	Ναι	80ppm
hhp100	Ναι	100ppm

Εφαρμογή Υψηλής Υδροστατικής Πίεσης (HHP)

Ο μισός όγκος κάθε δεκάλιτρου περιέκτη (5L) μεταφέρθηκε σε περιέκτες πολυαιθυλενίου, οι οποίοι τοποθετήθηκαν μέσα σε δοχεία κατάλληλα για το όργανο εφαρμογής υψηλής υδροστατικής πίεσης. Τα δείγματα υποβλήθηκαν σε πίεση 400 MPa για πέντε λεπτά σε θερμοκρασία 20 °C.



Εικόνα 11. Τα δείγματα οίνου συσκευασμένα σε περιέκτες πολυαιθυλενίου και μέσα στο δοχείο για το όργανο εφαρμογής HHP



Εικόνα 12. Το δείγμα οίνου συσκευασμένο στον κατάλληλο περιέκτη του πολυαιθυλενίου.

Αναλύσεις Οίνων

Όλες οι κλασικές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν στους οίνους, έγιναν σύμφωνα με το πρωτόκολλο της ευρωπαϊκής νομοθεσίας (Compendium of International Methods of Analysis of Wines and Musts-OIV, 2006), ως ενδεικνυόμενες επίσημες μέθοδοι (International Organization of Vine and Wine). Επίσης μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις ακεταλδεύδης, L-μηλικού οξέος και L-γαλακτικού οξέος για όλα τα δείγματα με την βοήθεια του ημιαυτόματου αναλυτή ‘ONE Analyser’ από την εταιρία STEROGLOSS. Το φασματοφωτόμετρο το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τις κλασικές αναλύσεις που περιγράφονται παρακάτω είναι το UV-Vis Spectrophotometer V-530 (Jasco).

Κλασικές Αναλύσεις

Προσδιορισμός της Ενεργούς Οξύτητας-pH

Η ενεργός οξύτητα ή pH καλείται το σύνολο των ελεύθερων καρβοξυλομάδων που βρίσκονται σε διάσταση και δίνουν κατιόντα υδρογόνου (H^+). Το pH εξαρτάται τόσο από τη συγκέντρωση των οξέων όσο και από το είδος αυτών, επειδή κάθε ένα από τα οξέα έχει διαφορετική ικανότητα διάστασης. Επιπλέον, το pH των οίνων διαμορφώνεται από τις συγκεντρώσεις του τρυγικού οξέος και του καλίου (K^+), δηλαδή από την ισορροπία τρυγικού οξέος- όξινου τρυγικού καλίου.

Για τον προσδιορισμό της ενεργού οξύτητας των οίνων χρησιμοποιήθηκε ψηφιακό pH-μετρο HANNA HI 112.

Προσδιορισμός Ολικής ή Ογκομετρούμενης Οξύτητας

Ολική ή Ογκομετρούμενη οξύτητα ορίζεται το άθροισμα των όξινων ομάδων που τιτλοδοτούνται όταν το pH του οίνου ρυθμίζεται στην τιμή 7 με την προσθήκη τιτλοδοτημένου διαλύματος βάσης. Εξαρτάται από την περιεκτικότητα του οίνου σε ελεύθερα οργανικά οξέα, ενώ το είδος τους ουσιαστικά δεν παίζει ρόλο στη διαμόρφωση της τιμής. Το CO₂ και το SO₂ δεν περιλαμβάνονται στην ολική οξύτητα. Σα δείκτης για το τέλος της ογκομέτρησης χρησιμοποιείται το κυανούν της βρωμοθυμόλης που αλλάζει χρώμα γύρω στο pH 7. Η ογκομετρούμενη οξύτητα εκφράζεται σε γραμμάρια τρυγικού οξέος ανά λίτρο οίνου (g/L).

Προσδιορισμός Πτητικής Οξύτητας

Ο προσδιορισμός της πτητικής οξύτητας πραγματοποιήθηκε με τιτλοδότηση των πτητικών οξέων που διαχωρίζονται από τον οίνο με απόσταξη με υδρατμούς και ανακαθαρισμό των ατμών και εκφράζεται σε γραμμάρια οξικού οξέος ανά λίτρο οίνου (g/L).

Προσδιορισμός Χρωματικών Χαρακτηριστικών (Ένταση-Απόχρωση)

Για τον προσδιορισμό της έντασης και της απόχρωσης του χρώματος των οίνων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Glories Y. (1984), κατά την οποία λαμβάνονται οι απορροφήσεις σε μήκος κύματος 420, 520 και 620 nm, από φασματοφωτόμετρο υπεριώδους – ορατού. Το χρώμα των ερυθρών οίνων είναι το άθροισμα των χρωμάτων κίτρινου, κόκκινου και κυανού. Τα φάσματα απορρόφησής τους παρουσιάζουν ένα μέγιστο στα 520 nm, το οποίο ελαττώνεται με την παλαίωση, και ένα ελάχιστο στα 420 nm, που κατά την παλαίωση αυξάνει ή παραμένει σταθερό. Τα 420 nm είναι χαρακτηριστικό μήκος κύματος του κίτρινου χρώματος, το οποίο οφείλεται στις συμπυκνωμένες τανίνες και αυξάνει με τον πολυμερισμό και την οξείδωση των μορίων αυτών. Τα 520 nm είναι χαρακτηριστικό μήκος κύματος του κόκκινου χρώματος και οφείλεται στο καθαρό ερυθρό χρώμα των ελεύθερων ανθοκυανών που βρίσκονται υπό τη μορφή φλαβυλίου. Η απορρόφηση στα 620 nm εκφράζει το κυανό χρώμα των νέων ερυθρών οίνων, το οποίο οφείλεται στις ανθοκυάνες όταν αυτές βρίσκονται με τη μορφή της άνυδρης βάσης. Η ένταση αντιπροσωπεύει την ποσότητα του χρώματος και παρουσιάζει μεγάλη διαφοροποίηση μεταξύ των ποικιλιών. Είναι καθαρός αριθμός και οι τιμές της κυμαίνονται από 0.3 έως 1.8. Η απόχρωση αντιπροσωπεύει την εξέλιξη του χρώματος προς το πορτοκαλί και εκφράζει το βαθμό οξείδωσης

των οίνων. Όσο πιο οξειδωμένος είναι ο οίνος, τόσο μεγαλύτερη είναι η τιμή της απόχρωσης. Οι νέοι οίνοι παρουσιάζουν τιμές απόχρωσης μεταξύ 0.5 – 0.7 που αυξάνονται κατά την παλαίωση, φθάνοντας σε ένα ανώτερο όριο, περίπου 1.2-1.3 (Χαρβαλιά, Α. και Μπενά-Τζούρου, Ε., 1982, , Κουράκου, Σ., 1998, Ribéreau-Gayon, P., *et al.*, 2000).

α) Ένταση χρώματος (I)

Η ένταση προκύπτει από το άθροισμα των απορροφήσεων στα 420nm, 520nm και 620 nm (Glories, 1984).

$$I = OD_{420} + OD_{520} + OD_{620}$$

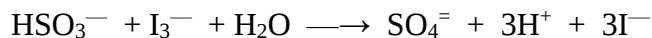
β) Απόχρωση (H)

Η απόχρωση προκύπτει από τον λόγο της απορρόφησης του γλεύκους ή του οίνου στα 420 nm προς την απορρόφηση στα 520 nm (Glories 1984, Sudraud 1958).

$$H = OD_{420}/OD_{520}$$

Προσδιορισμός Ελεύθερου και Ολικού Θειώδη Ανυδρίτη

Όταν ο θειώδης ανυδρίτης βρεθεί σε διάλυμα και μάλιστα σε pH 3.0-4.0 (τιμές pH των οίνων) διίσταται ως εξής : $SO_2 + H_2O \rightarrow HSO_3^- + H^+$ όπου SO_2 : ο θειώδης ανυδρίτης που παραμένει διαλυμένος ως μοριακός (η κυρίως δραστική μορφή) και HSO_3^- : τα ανιόντα του εξουδετερωμένου θειώδους οξέος. Το άθροισμα των δύο μορφών (μοριακού και εξουδετερωμένου) δίνει τον ελεύθερο θειώδη ανυδρίτη. Ο προσδιορισμός του θειώδη ανυδρίτη βασίζεται στην οξειδοαναγωγική αντίδραση του διοξειδίου του θείου με το ιώδιο ως εξής :



Η οξείδωση γίνεται σε ισχυρά όξινο περιβάλλον, διαφορετικά το ιώδιο αντιδρά με πολυφαινόλες, σάκχαρα, αλδεϋδες και άλλους αναγωγικούς παράγοντες. Το τέλος της αντίδρασης ελέγχεται με την εμφάνιση μπλε χρώματος όταν η περίσσεια του ιωδίου δίνει χρώμα παρουσία

αμύλου. Έτσι προσδιορίζεται ο ελεύθερος θειώδης ανυδρίτης. Μεταβάλλοντας το pH του οίνου σε ισχυρά αλκαλικό, με προσθήκη KOH, αποδεσμεύουμε τον ανυδρίτη από τις ενώσεις του με την ακεταλδεΐδη επιτρέποντας τον προσδιορισμό και της δεσμευμένης μορφής. Το άθροισμα του ελεύθερου και του ενωμένου δίνει τον ολικό θειώδη ανυδρίτη.

Ολικά Φαινολικά Συστατικά

Δείκτης Φαινολικών Ουσιών (ΔΦΟ)

Εφαρμόστηκε η μέθοδος ΔΦΟ όπως περιγράφεται από τους Flanzky και Poux (1958) και Ribéreau-Gayon και Stonestreet (1966), βάσει της οποίας μετράται η απορρόφηση δείγματος ερυθρού οίνου αραιωμένου 100 φορές με απεσταγμένο νερό, σε μήκος κύματος 280nm του υπεριώδους φωτός. Το αποτέλεσμα εκφράζεται ως «δείκτης ολικών φαινολικών» πολλαπλασιάζοντας με τον συντελεστή απορρόφησης. Ο προσδιορισμός βασίζεται στην ισχυρή απορρόφηση που παρουσιάζουν οι βενζολικοί δακτύλιοι των φαινολικών ενώσεων στο υπεριώδες φως, το μέγιστο της οποίας παρατηρείται γύρω στα 280 nm. Μετρά την περιεκτικότητα των φλαβονοειδών φαινολών (ανθοκυάνες, τανίνες), των μη φλαβονοειδών (φαινολικά οξέα) και κάποιων μη φαινολικών ουσιών που απορροφούν στα 280 nm. Μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί το γεγονός ότι ορισμένες ενώσεις όπως τα κινναμωμικά οξέα και οι χαλκόνες, δεν παρουσιάζουν μέγιστο απορρόφησης στα 280 nm, αλλά το σφάλμα αυτό θεωρείται μικρό, διότι η περιεκτικότητα των παραπάνω ουσιών στα σταφύλια και τους οίνους είναι χαμηλή. Η τιμή του δείκτη ολικών φαινολών κυμαίνεται από 6 έως 120 (Ribéreau-Gayon, P., *et al.*, 2000).

Μέθοδος Folin-Ciocalteu

Είναι η επίσημη μέθοδος του OIV και πρόκειται για φωτομετρική μέθοδο που βασίζεται στην οξείδωση των φαινολικών ενώσεων του οίνου από το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu όπως περιγράφεται από τους Waterman P. and Mole S (1994). Χρησιμοποιείται για την μέτρηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου χωρίς να γίνεται διάκριση μεταξύ μονομερών, διμερών ή μεγαλύτερων φαινολικών συστατικών. Το κύριο αντιδραστήριο της μεθόδου, το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu, είναι διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφομολυβδαινικά ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) και φωσφοβόλφραμικά ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) ετεροπολυμερή οξέα. Τα

φαινολικά ιόντα οξειδώνονται με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων. Κατά την οξείδωση των φαινολών, το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu ανάγεται προς μείγμα κυανών οξειδίων του βολφραμίου (W_8O_{23}) και του μολυβδαινίου (Mo_8O_{23}). Το σχηματιζόμενο κυανό χρώμα παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση περίπου στα 765 nm και είναι ανάλογο με τη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων. Η αλκαλικότητα ρυθμίζεται με διάλυμα Na_2CO_3 . Το αποτέλεσμα των φαινολικών ουσιών εκφράζεται σε mg/L γαλλικού οξέος που προκύπτουν από την καμπύλη αναφοράς, η χάραξη της οποίας γίνεται με διαλύματα γαλλικού οξέος γνωστών συγκεντρώσεων (Χαρβαλιά, Α. και Μπενά- Τζούρου, Ε., 1982, Ribéreau-Gayon, P., *et al.*, 2000).

Μέθοδος προσδιορισμού τανινών με δέσμευση από πρωτεΐνες (BSA)

Η μέθοδος προσδιορισμού των τανινών των δειγμάτων οίνου έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται από τους Harbertson *et al.* (2002). Η συγκεκριμένη μέθοδος μετράει το σύνολο των τανινών δείγματος οίνου ή ράγας και βασίζεται στην συγκάθιση της αλβουμίνης του ορού βοοειδών (Bovine serum albumin BSA) και του ενζύμου αλκαλική φωσφατάση (Harberston και Adams, 1999). Οι τανίνες του οίνου είναι ανάλογες με την ποσότητα του ενζύμου που καθιζάνει, οπότε η ποσότητα τους μπορεί να προσδιοριστεί έμμεσα από τη μέτρηση της αλκαλικής φωσφατάσης. Η μέτρηση γίνεται με φασματοφωτόμετρο σε απορρόφηση στα 510 nm. Οι τιμές του οίνου λαμβάνονται από την καμπύλη αναφοράς και συνεπώς εκφράζονται σε mg κατεχίνης (Harbertson *et al.*, 2002).

Το δείγμα οίνου αραιώνεται με model wine σε αναλογία 1:2, ποσοστό που προσδιορίστηκε πειραματικά μετά από διαφορετικές συγκεντρώσεις και μετρήσεις. Για την μέθοδο χρησιμοποιούνται 500 μl αραιωμένου δείγματος οίνου και 1 ml πρωτεϊνικού διαλύματος BSA. Γίνεται ήπια ανάδευση για 15 min και το δείγμα φυγοκεντρείται για 5 min στις 13500 rpm. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και στο ίζημα προστίθενται 250 μL μη πρωτεϊνικού διαλύματος χωρίς να διαταραχθεί το ίζημα. Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 5 min στις 13500 rpm και στη συνέχεια το υπερκείμενο απομακρύνεται. Στο ίζημα προστίθενται 875 μL διαλύματος TEA-SDS και αφήνεται σε ηρεμία για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια αναδεύεται σε vortex για να διαλυθεί το ίζημα. Μετά την ανάδευση μετρείται η απορρόφηση στα 510 nm (A1) με κυψελίδα στένωσης. Στη συνέχεια προστίθενται 125 μL διαλύματος $FeCl_3$ και μετά από 15 min μετρείται ξανά η απορρόφηση στα 510 nm (A2). Για τον μηδενισμό του φασματοφωτόμετρου

(μάρτυρας) χρησιμοποιείται διάλυμα TEA-SDS. Τα αποτελέσματα υπολογίζονται με βάση τη διαφορά μεταξύ των δύο απορροφήσεων: $A_{510} - A_1$.

Στη συνέχεια από την καμπύλη αναφοράς υπολογίζεται η συγκέντρωση των τανινών του αραιωμένου δείγματος, έστω C1, και εκφράζονται σε ισοδύναμα κατεχίνης. Για την τελική συγκέντρωση τανινών, τα αποτελέσματα πολλαπλασιάζονται με την αραιώση που πραγματοποιήθηκε στο δείγμα οίνου, δηλαδή η τελική συγκέντρωση είναι $C = C1 * (\text{αραιώση}) \text{ mg/L}$ οίνου.

Καμπύλη αναφοράς της κατεχίνης: Για την καμπύλη αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα κατεχίνης 10 έως 150mg/L (Πίνακας 2).

Πίνακας 2. Διαλύματα που χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία της καμπύλης κατεχίνης

Συγκέντρωση Κατεχίνης (mg/L)	Διάλυμα κατεχίνης (μl)	Διάλυμα TEA- SDS (μl)	Διάλυμα FeCl ₃ (μl)
10	10	865	125
25	25	850	125
50	50	825	125
100	100	775	125
150	150	725	125

Προσδιορισμός Ολικών Τανινών με τη μέθοδο Ribéreau-Gayon Stonestreet (1966)

Για τον προσδιορισμό των τανινών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των Ribéreau-Gayon and Stonestreet (1966) και στηρίζεται στην ιδιότητα των τανινών να μετατρέπονται σε ανθοκυανιδίνες με θέρμανση σε όξινο περιβάλλον. Έτσι, γίνεται μέτρηση των απορροφήσεων στα 550 nm ενός θερμαινόμενου διαλύματος οίνου με πυκνό HCl και ενός μη θερμαινόμενου. Η διαφορά τους είναι ανάλογη με το ποσό των τανινών (Ribéreau-Gayon, P. *et al.*, 2006).

Η μέθοδος ποσοτικοποιεί τα αποτελέσματα με τη μέτρηση της απορρόφησης στα 550nm. Στη διάρκεια του βρασμού οι τανίνες μετατρέπονται σε ανθοκυανιδίνες και, επομένως, το δείγμα

που έχει θερμανθεί περιέχει τις αρχικές ανθοκυάνες και τις ανθοκυάνες που σχηματίστηκαν από την υδρόλυση των τανινών. Το δείγμα που δεν θερμάνθηκε περιέχει μόνο τις αρχικές ανθοκυάνες. Η διαφορά τους δίνει τις ανθοκυάνες που σχηματίστηκαν. Η διαφορά των απορροφήσεων είναι ανάλογη με το ποσοστό των τανινών.

Σε δύο δοκιμαστικούς σωλήνες φέρονται 2 mL αραιωμένου (1:50) οίνου, 1 mL απεσταγμένο νερό, 3 mL πυκνό HCl (37%) και πωματίζονται. Ο ένας δοκιμαστικός σωλήνας μεταφέρεται σε υδατόλουτρο στους 100 °C για 45 λεπτά. Μετά το πέρας των 45 λεπτών, προστίθενται και στους δύο σωλήνες 500μl αιθανόλης (95%) για την σταθεροποίηση του χρώματος, αφού ψυχθεί ο σωλήνας που υπέστη βρασμό. Μετά από ανάδευση, μετρούνται οι οπτικές πυκνότητες των δύο δειγμάτων στα 550 nm, σε πλαστικές κυψελίδες με μάρτυρα το νερό. Η συγκέντρωση των τανινών λαμβάνεται από την διαφορά της απορρόφησης του δείγματος που θερμάνθηκε (d_2) με την απορρόφηση του δείγματος χωρίς θέρμανση(d_1) σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Τανίνες (g/L)} = (d_2 - d_1) \cdot 19.35$$

και αν βρεθεί ότι $(d_2 - d_1) \leq 0.07$ τότε η σχέση γίνεται : $\text{Τανίνες (g/L)} = (d_2 - d_1) \cdot 20.83$

Μέτρηση της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας (DPPH)

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

Σε μικρούς γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες τοποθετούνται 50 μL αραιωμένου δείγματος οίνου (η αραιώση έγινε με dH₂O σε αναλογία 1:10) και 1950 μL διαλύματος DPPH. Ακολουθείται ανάδευση σε vortex και μέτρηση της απορρόφησης στα 515 nm με μάρτυρα dH₂O σε χρόνο $t=0$. Το δείγμα επιστρέφεται στο σωλήνα και επαναλαμβάνεται η μέτρηση της απορρόφησης μετά από 30 min ($t=30$). Από τη διαφορά αυτών των δύο απορροφήσεων 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).

Προσδιορισμός Ανθοκυανών με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (HPLC)

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των ανθοκυανών με HPLC βασίστηκε σε προηγούμενες μελέτες (Kallithraka S., *et al.*, 2005). 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 (250 x 4.0 mm x 5 μm) από την εταιρία Restek.

Για την δημιουργία της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα διαλύματα μαλβιδίνης με συγκεντρώσεις 5 mg/L, 4 mg/L, 3 mg/L, 2 mg/L, 1 mg/L, 0.8 mg/L, 0.6 mg/L, 0.4 mg/L, 0.2mg/L και 0.1 mg/L. Τα δείγματα οίνου περνάνε από φίλτρο σύριγγας πορότητας 0,2 μm και τοποθετούνται σε φιαλίδια του αυτόματου δειγματολήπτη για HPLC. Τα χαρακτηριστικά του προγράμματος έκλουσης που εφαρμόστηκε εμφανίζονται στον Πίνακα 3. 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 3).

Πίνακας 3 Gradient για τον προσδιορισμό των ανθοκυανών με HPLC

Χρόνος (min)	Διαλύτης A (10% φορμικό οξύ σε dH ₂ O)	Διαλύτης B (MeOH)
Αρχικές συνθήκες	90	10
22	50	50
32	5	95
34	5	95
35	90	10

38	90	10
----	----	----

Αντιστοιχίζοντας τη μάζα 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.

Προσδιορισμός μέσου βαθμού πολυμερισμού (mDP) τανινών με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)

Για τον προσδιορισμό του μέσου βαθμού πολυμερισμού των τανινών 10 mL δείγματος οίνου εξατμίζονται υπό κενό (rotary evaporation), στους 40 °C, για απομάκρυνση της αιθανόλης και συμπύκνωση του δείγματος μέχρι 6-7 mL. Το υγρό υπόλειμμα μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη 20 mL και συμπληρώνεται ο όγκος με νερό. Στη συνέχεια, με τη χρήση συσκευής SPE και με στηλάκι C18-(5 g/25 mL) (Isolute, Biotage) συλλέγουμε με έκπλυση με 50mL μεθανόλη σε περιέκτη τις ουσίες που μας ενδιαφέρουν (προανθοκυανιδίνες). Στο μεθανολικό εκχύλισμα προστίθενται 2mL H₂O και ακολουθεί συμπύκνωση υπό κενό. Το συμπύκνωμα μεταφέρεται σε προζυγισμένο, γυάλινο περιέκτη (ξηρό και με καπάκι). Μετά από κατάψυξη στους -30 °C ακολουθεί λυοφιλίωση. Αφού η ξήρανση ολοκληρωθεί ο περιέκτης ζυγίζεται εκ νέου. Η διαφορά του βάρους δίνει την ποσότητα των φαινολικών συστατικών που εκχυλίστηκαν. Το ξηρό εκχύλισμα επαναδιαλύεται με μεθανόλη σε τελική συγκέντρωση 20 g/L και ακολουθεί κατάψυξη του. Σε γυάλινα φιαλίδια προστίθενται 100 μL δείγματος και 100 μL διαλύματος phloroglucinol. Το μίγμα αναδεύεται και παραμένει για 30 min σε θερμοκρασία 50 °C. Μετά το πέρας των 30 min η αντίδραση σταματά με την προσθήκη 1 mL διαλύματος οξικού νατρίου. Τα δείγματα περνάνε από φίλτρο σύριγγας πορότητας 0,2 μm και τοποθετούνται σε φιαλίδια του αυτόματου δειγματολήπτη για HPLC

Με σκοπό 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.

Για την έκφραση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν πρότυπες καμπύλες της κάθε ουσίας γνωστών συγκεντρώσεων εκφρασμένα σε μικρογραμμάρια (μg). Για την αντιστοιχία των προτύπων των τερματικών της κάθε ουσίας με τις επεκτατικές του μονάδες χρησιμοποιήθηκαν συντελεστές αναγωγής. Οι συντελεστές που χρησιμοποιήθηκαν για τα τερματικά ήταν 57156, 57156, 19052, 197204 για την κατεχίνη (C), την επικατεχίνη (EC), την επιγαλλοκατεχίνη (EGC) και τον γαλλικό εστέρα της επικατεχίνης (ECG) και οι συντελεστές που χρησιμοποιήθηκαν για τις επεκτατικές μονάδες ήταν 60585, 60585, 19433 και 19433 για την κατεχίνη-φλωρογλουκινόλη (C-ph), την επικατεχίνη-φλωρογλουκινόλη (EC-ph), την επιγαλλοκατεχίνη-φλωρογλουκινόλη (EGC-ph) και τον γαλλικό εστέρα της επικατεχίνης-φλωρογλουκινόλη (ECG-ph). Για την μετατροπή των αποτελεσμάτων από μg σε μmol χρησιμοποιήθηκαν τα μοριακά βάρη των τερματικών και επεκτατικών μονάδων

Πίνακας 4 Μέθοδος προσδιορισμού μέσου βαθμού πολυμερισμού με HPLC

Μέθοδος	Προσδιορισμός Βαθμού Πολυμερισμού						
Στήλη	Waters XTerra RP18 (3.5 μm, 4.6x100mm)						
Ρυθμός ροής	1 mL/min						
Διαλυτών							
Ανιχνευτής	diode array (DAD; Jasco MD-910)						
Μήκος κύματος ανίχνευσης	280nm						
Ποσότητα ένεσης	40μL						
Διαλύτες	A: 0.1% οξικό οξύ σε νερό καθαρότητας HPLC B: μεθανόλη καθαρότητας HPLC						
Πρόγραμμα HPLC	Χρόνος σε min	0	1	7	8	15	16 23
	% διαλύτη A	95	84	78	65	58	0 100
	% διαλύτη B	5	16	22	35	42	100 0
Καμπύλη Αναφοράς							
Ct	$y = 681803x - 11133$ ($R^2 = 1$)						
ECt	$y = 711537x + 16700$ ($R^2 = 0,9997$)						
EGCt	$y = 193623x + 10189$ ($R^2 = 0,9999$)						
ECGt	$y = 2E+06x - 257185$ ($R^2 = 0,9989$)						
Ce	$y = 722711x - 11801$ ($R^2 = 1$)						
ECe	$y = 754229x + 17702$ ($R^2 = 0,9997$)						
EGCe	$y = 197495x + 10392$ ($R^2 = 0,9999$)						
ECGe	$y = 15915x - 0.2572$ ($R^2 = 0,9989$)						

Έκφραση αποτελεσμάτων

όπου y = εμβαδόν κάθε κορυφής που ποσοτικοποιείται

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

$\%G = 100 * (EG_{Ce} + EG_{Ct}) / \Sigma (\text{επεκτατικές} + \text{τερματικές υπομονάδες})$, σε μmol

$\%P = 100 * (EG_{Ce} + EG_{Ct}) / \Sigma (\text{επεκτατικές} + \text{τερματικές υπομονάδες})$, σε μmol

% συνεισφορά των τερματικών και επεκτατικών υπομονάδων σε κάθε κλάσμα

Οργανοληπτικός έλεγχος οίνων

Στα πλαίσια του πειράματος πραγματοποιήθηκε οργανοληπτικός έλεγχος κατά τον έκτο μήνα (3^η δειγματοληψία) προκειμένου να προσδιοριστούν οι διαφορές στην ποιότητα μεταξύ των «πιεσμένων» και των «απίεστων» οίνων σε διάστημα αποθήκευσης έξι μηνών. Χρησιμοποιήθηκαν δώδεκα εκπαιδευμένοι δοκιμαστές, μεταπτυχιακοί φοιτητές του μεταπτυχιακού προγράμματος Οινολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και ο οργανοληπτικός έλεγχος έλαβε χώρα στην Αίθουσα Οργανοληπτικού Ελέγχου του Εργαστηρίου Οινολογίας. Οι δοκιμαστές δοκίμασαν τα δώδεκα δείγματα (Εικόνα 13), εκ των οποίων τα έξι ήταν «πιεσμένα» με συγκεντρώσεις SO_2 0, 20, 40, 60, 80 και 100ppm και έξι «απίεστα» δείγματα με αντίστοιχες συγκεντρώσεις. Το κάθε δείγμα αντιστοιχούσε σε έναν τριψήφιο αριθμό ενώ δίνονταν με τυχαία σειρά. Η διαδικασία επαναλήφθηκε μετά από δύο ημέρες. Τα κριτήρια που επιλέχθηκαν για ποιοτική αξιολόγηση φαίνονται παρακάτω στην φόρμα αξιολόγησης που συμπλήρωσαν οι δοκιμαστές για τα εξεταζόμενα δείγματα (Εικόνα 14). Η αξιολόγηση έγινε με τη χρήση αριθμητικής κλίμακας από το ένα έως το πέντε και για το σώμα από το ένα έως το τρία. Οι δοκιμαστές συμπλήρωσαν για τα εξεταζόμενα δείγματα την κάτωθι φόρμα αξιολόγησης (Εικόνα 14).



Εικόνα 13. Θάλαμος γευστιγνωσίας

Κωδικός Δείγματος:					
Οπτική Αξιολόγηση	1	2	3	4	5
Ένταση Χρώματος (Καθόλου→Πάρα Πολύ)					
Απόχρωση (Καφέ→Κόκκινο→Μωβ)					
Οσφρητική Αξιολόγηση	1	2	3	4	5
Ένταση Αρώματος (Άτονο→Έντονο)					
(Καθόλου→Πάρα Πολύ)					
Κόκκινα Φρούτα					
Αποξηραμένα Φρούτα					
Μπαχαρικά					
Σοκολάτα					
Μαρμελάδα Φρούτων					
Οσμή Οξείδωσης					
Γευστική Αξιολόγηση	1	2	3	4	5
(Καθόλου→Πάρα Πολύ)					
Οξύτητα					
Στυπτικότητα					
Πικράδα					
	1	2	3		
Σώμα (Υδαρές→Μέτριο→Γεμάτο)					
Συνολική Εκτίμηση	1	2	3	4	5
Ισορροπία- Συνολική Ποιότητα (Απαράδεκτο→Μέτριο→Εξαιρετικό)					

Εικόνα 14. Φόρμα Οργανοληπτικής Αξιολόγησης

Στατιστική Επεξεργασία Αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις αναλύσεις επεξεργάστηκαν στατιστικά με το στατιστικό πακέτο ανάλυσης JMP11. Εφαρμόστηκε η Ανάλυση Διασποράς με έναν Παράγοντα (OneWay ANOVA) με επίπεδο εμπιστοσύνης 95% ($p < 0.05$) και όταν τα δείγματα παρουσίαζαν σημαντικές διαφορές χρησιμοποιήθηκε ως έλεγχος πολλαπλών συγκρίσεων το Tukey ή Honestly Significant Difference –H.S.D. (Tukey, 1953). Στα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην εν λόγω διατριβή αναγράφεται το μέσο τυπικό σφάλμα των επαναλήψεων ως $\pm$ του μέσου όρου αυτών ή ως μπάρες όταν τα αποτελέσματα απεικονίζονται σε γράφημα. Με a, b, c κ.ο.κ χαρακτηρίζεται η στατιστική διαφορά των δειγμάτων (με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05\%$), ενώ δείγματα με ίδιο γράμμα δεν παρουσιάζουν σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ τους.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα αναλυτικά αποτελέσματα όλων των παρακάτω μεθόδων παρατίθενται στους Πίνακες του Παραρτήματος.

Κλασικές Αναλύσεις

Στους παρακάτω Πίνακες 5 6 και 7 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των κλασικών αναλύσεων που πραγματοποιήθηκαν στα δείγματα στις τρεις διαφορετικές δειγματοληψίες (0, 3 και 6 μήνες). Στο χρόνο μηδέν (0) οι κλασικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στον οίνο βάσης (από τον οποίο προήλθαν όλα τα δείγματα) πριν λάβει χώρα η θείωση. Με $\pm$ υποδεικνύεται το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στα δείγματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

Πίνακας 5 Κλασικές αναλύσεις στον οίνο βάσης στην 1^η δειγματοληψία (0 μήνες)

Δείγμα	pH	Ολική Οξύτητα (g τρυγικού οξέος/L)	Πτητική Οξύτητα (g οξικού οξέος/L)	Αλκοολικός Τίτλος (%vol)	Ανάγοντα Σάκχαρα (g/L)
Οίνος Βάσης	4.1 $\pm$ 0	5.175 $\pm$ 0.008	0.681 $\pm$ 0.003	14.00 $\pm$ 0.01	2.6 $\pm$ 0

Ο οίνος βάσης είναι ξηρός και παρουσιάζει σχετικά υψηλό αλκοολικό τίτλο.

Πίνακας 6. Κλασικές αναλύσεις στα «πιεσμένα» και τα «απίεστα» δείγματα στην 2^η δειγματοληψία (3 μήνες).

Δείγμα	pH	Ολική Οξύτητα (g τρυγικού οξέος/L)	Πτητική Οξύτητα (g οξικού οξέος/L)
hhp0X	4.08 $\pm$ 0 c	8.40 $\pm$ 0 a	1.54 $\pm$ 0 b
hhp20X	4.08 $\pm$ 0 c	8.40 $\pm$ 0 a	1.55 $\pm$ 0 a
hhp40X	4.29 $\pm$ 0.02 a	7.05 $\pm$ 0.43 b	1.36 $\pm$ 0 c
hhp60X	4.34 $\pm$ 0 a	4.73 $\pm$ 0.04 c	0.83 $\pm$ 0 d
hhp80X	4.24 $\pm$ 0.02 a,b	4.80 $\pm$ 0 c	0.58 $\pm$ 0 e
hhp100X	4.23 $\pm$ 0.04 a,b	5.18 $\pm$ 0.04 c	0.46 $\pm$ 0 j
hhp0	4.15 $\pm$ 0 c	4.80 $\pm$ 0 c	0.56 $\pm$ 0.01 f
hhp20	4.22 $\pm$ 0.04 a,b	5.03 $\pm$ 0.12 c	0.50 $\pm$ 0 h
hhp40	4.29 $\pm$ 0.04 a	4.95 $\pm$ 0 c	0.49 $\pm$ 0 i
hhp60	4.30 $\pm$ 0.01 a	4.8 $\pm$ 0 c	0.51 $\pm$ 0.01 g
hhp80	4.29 $\pm$ 0.01 a	5.1 $\pm$ 0 c	0.46 $\pm$ 0 j

hhp100	4.24±0 a,b	5.25±0c	0.38±0 k
--------	------------	---------	----------

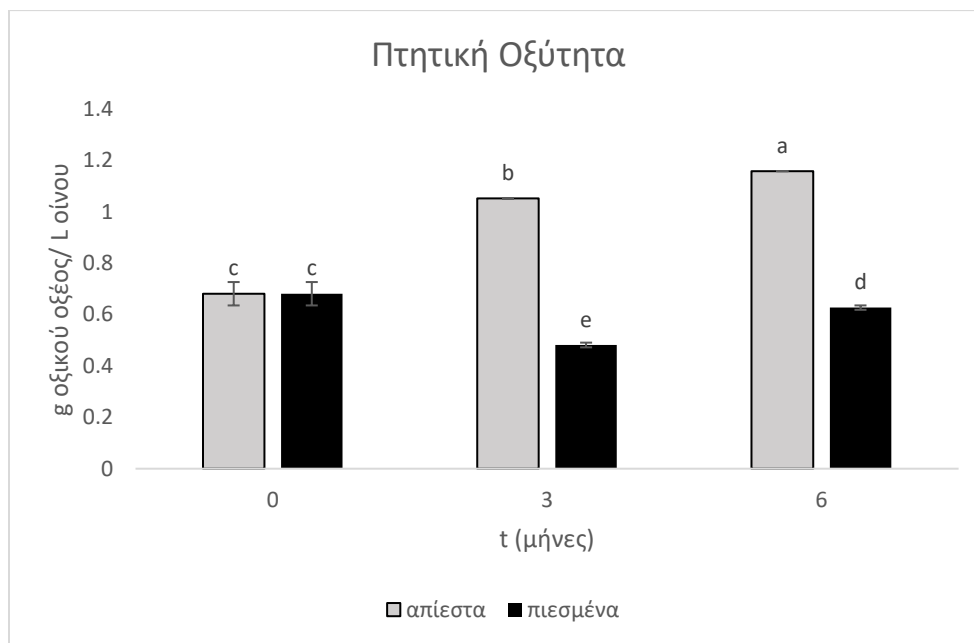
Το pH των οίνων κυμαίνεται σε σχετικά υψηλές τιμές. Στην 2^η δειγματοληψία (Πίνακας 6) η υψηλότερη τιμή σημειώνεται στον οίνο hhp60 (60ppm SO₂, πιεσμένο) και η χαμηλότερη στον οίνο hhp0X (0ppm SO₂, απίεστο) και hhp20X (20ppm SO₂, απίεστο). Από τον Πίνακα 6 φαίνεται επίσης η ολική οξύτητα των «απίεστων» και «πιεσμένων» οίνων. Το δείγμα hhp60X (60ppm SO₂, απίεστο) παρουσιάζει την χαμηλότερη τιμή ολικής οξύτητας, ενώ την υψηλότερη τιμή την παρουσιάζουν οι «απίεστοι» οίνοι hhp0X και hhp20X (0 και 20 ppm SO₂). Μετά από τρεις μήνες αποθήκευσης, η πτητική οξύτητα εμφανίζεται πολύ υψηλή στους «απίεστους» οίνους hhp0X, hhp20X, hhp40X (0, 20 και 40ppm SO₂), ενώ σε όλα τα «πιεσμένα» δείγματα (hhp0, hhp20, hhp40, hhp60, hhp80 και hhp100) καταγράφεται χαμηλότερη πτητική οξύτητα, σε σχέση με τα αντίστοιχα «απίεστα», παρουσιάζοντας όλα μεταξύ τους στατιστικά σημαντικές διαφορές πέραν των δειγμάτων hhp100X και hhp80.

Πίνακας 7. Κλασικές αναλύσεις στα «πιεσμένα» και τα «απίεστα» δείγματα στην 3^η δειγματοληψία (6 μήνες).

Δείγμα	pH	Ολική Οξύτητα (g τρυγικού οξέος/L)	Πτητική Οξύτητα (g οξικού οξέος/L)
hhp0X	3.98±0 a,b	8.10±0.08 a,b	1.54±0 b
hhp20X	3.78±0.1 c	8.25±0.17 a	1.52±0 c
hhp40X	3.87±0 c	7.95±0.08 a,b	1.59±0.02 a
hhp60X	4.10±0.04 a,b	7.65±0.08 b	1.06±0.09 d
hhp80X	4.26±0.06 a	5.02±0.12 d	0.67±0 e
hhp100X	4.31±0.02 a	5.40±0.08 c,d	0.58±0 i
hhp0	4.14±0 a,b	5.85±0.08 c	0.66±0 f
hhp20	4.25±0.07 a	5.25±0 d	0.63±0 g
hhp40	4.14±0 a,b	5.10±0.08 d	0.60±0.01 h
hhp60	4.14±0 a,b	5.25±0 d	0.67±0.07 e,f
hhp80	4.14±0 a,b	4.95±0.08 d	0.61±0.05 h
hhp100	4.11±0.01 a,b	5.33±0.04 d	0.60±0 h

Στην 3^η δειγματοληψία (Πίνακας 7) ο οίνος hhp20X (20ppm SO₂, απίεστο) εμφανίζει πάλι την χαμηλότερη τιμή pH ενώ η υψηλότερη εμφανίζεται στο δείγμα hhp100X (100ppm SO₂, απίεστο). Μετά από τους έξι μήνες, οι τιμές pH όλων των δειγμάτων παρουσίασαν μικρή μείωση. Η υψηλότερη τιμή ολικής οξύτητας, καταγράφεται στον οίνο hhp20X, ενώ η χαμηλότερη στον οίνο hhp80 (80ppm, πιεσμένο). Όσον αφορά την πτητική οξύτητα παρατηρήθηκε αύξηση τιμών σε όλα

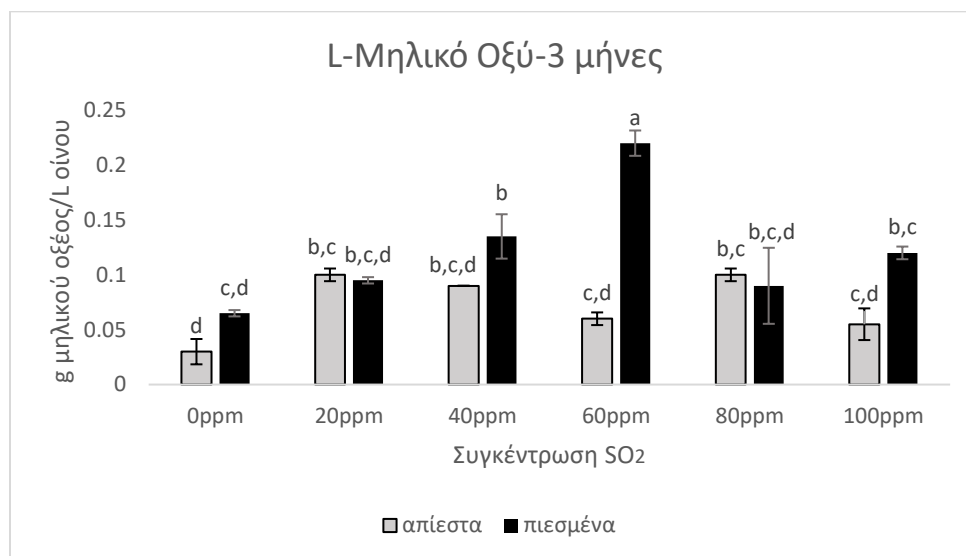
τα δείγματα, με την υψηλότερη να απαντά στον «απίεστο» οίνο hhr40X (40ppm SO₂) και η χαμηλότερη στον «απίεστο» οίνο hhr100X. Ωστόσο, όλοι οι οίνοι που υποβλήθηκαν σε HHP σημείωσαν χαμηλότερες τιμές πτητικής οξύτητας σε σύγκριση με τους «απίεστους» οίνους και μόνο οι «απίεστοι» οίνοι hhr80X και hhr100X προσέγγισαν τις τιμές των «πιεσμένων» οίνων.



Διάγραμμα 1. Εξέλιξη της πτητικής οξύτητας σε διάστημα έξι μηνών. Οι μπάρες δείχνουν το $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών και τα τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους.

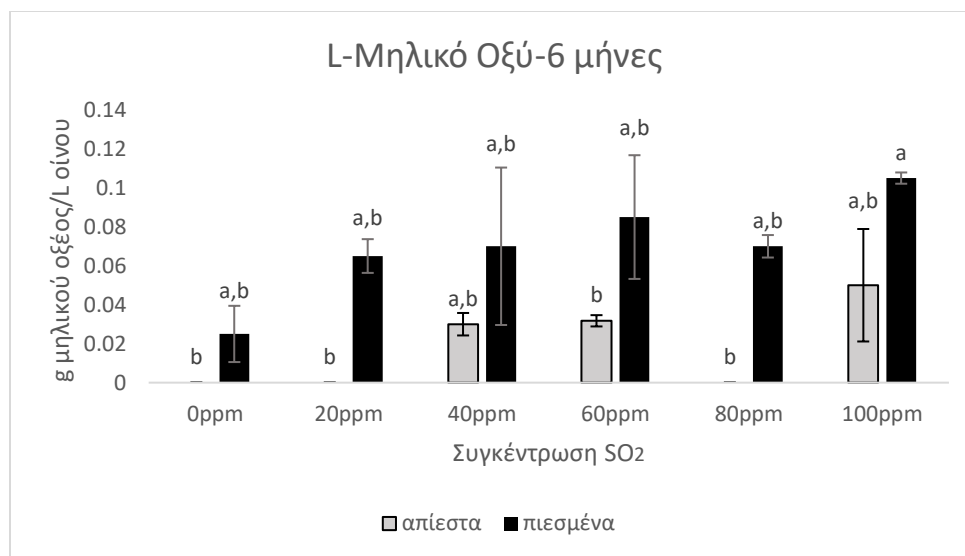
Το Διάγραμμα 1 απεικονίζει την εξέλιξη της πτητικής οξύτητας μέσα στον χρόνο στα «πιεσμένα» και «απίεστα» δείγματα. Παρατηρείται αύξηση της πτητικής οξύτητας των «απίεστων» οίνων αναλογικά με τον χρόνο από τους 0 μέχρι τους 6 μήνες, ενώ αντίθετα η πτητική οξύτητα των «πιεσμένων» αρχικά μειώνεται (από 0 μέχρι 3 μήνες) και στη συνέχεια αυξάνεται (από 3 μέχρι τους 6 μήνες). Στις δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν στους τρεις και στους έξι μήνες, τα «απίεστα» με τα «πιεσμένα» δείγματα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους. Η πτητική οξύτητα των «πιεσμένων» οίνων διατηρείται σε χαμηλότερα επίπεδα μέσα στον χρόνο σε σχέση με αυτήν τον «απίεστων».

L-Μηλικό Οξύ



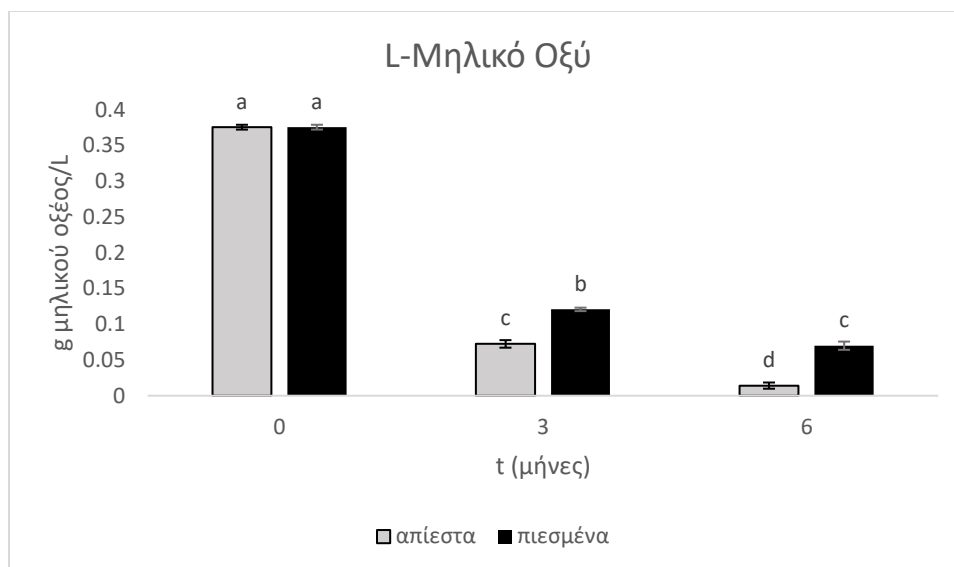
Διάγραμμα 2. L-μηλικό οξύ εκφρασμένο σε g ανά L οίνου των «πιεσμένων» και «απίεστων» οίνων με διαφορετικές συγκεντρώσεις SO₂ στους 3 μήνες. Οι μπάρες δείχνουν το $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στα δείγματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

Στο Διάγραμμα 2 παρατίθενται οι τιμές του L-μηλικού οξέος στα «πιεσμένα» και «απίεστα» δείγματα οίνου, στις έξι διαφορετικές συγκεντρώσεις SO₂. Η υψηλότερη τιμή L-μηλικού οξέος εμφανίζεται στον «πιεσμένο» οίνο 60ppm, ο οποίος διαφέρει από τον αντίστοιχο «απίεστο» οίνο με στατιστικά σημαντική διαφορά, ενώ καμία άλλη συγκέντρωση δεν παρουσιάζει στατιστική σημαντική διαφορά μεταξύ «πιεσμένου» και «απίεστου» οίνου. Η χαμηλότερη τιμή απαντά στον «απίεστο» οίνο με μηδενική προσθήκη θειώδους. Οι τιμές του L-μηλικού οξέος σε γενικά πλαίσια κυμαίνονται χαμηλά, λόγω της μηλογαλακτικής ζύμωσης που έχει λάβει χώρα στον οίνο.



Διάγραμμα 3. L-μηλικό οξύ εκφρασμένο σε g ανά L οίνου των «πιεσμένων» και «απίεστων» οίνων με διαφορετικές συγκεντρώσεις SO₂ στους 3 μήνες. Οι μπάρες δείχνουν το $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στα δείγματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

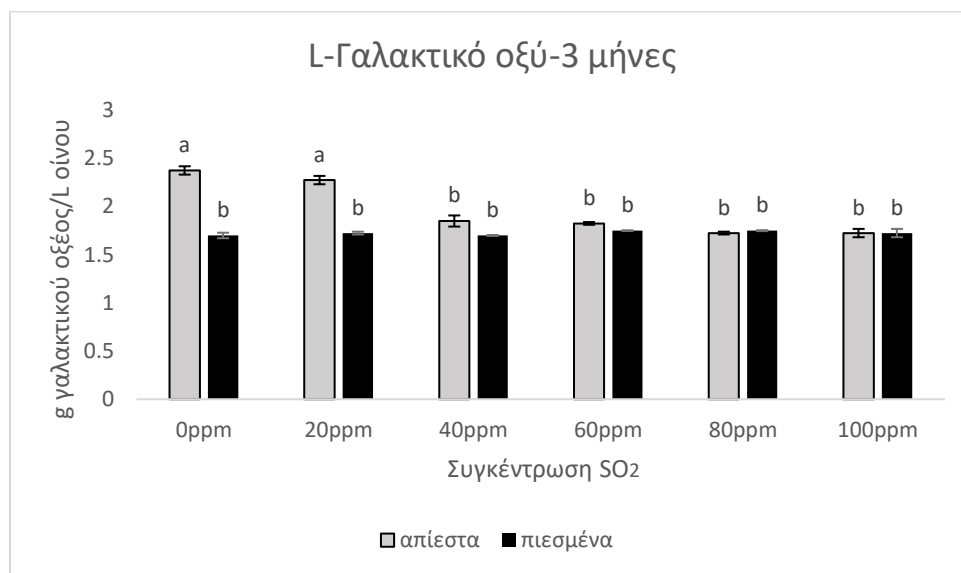
Στο Διάγραμμα 3 εμφανίζονται οι τιμές του L-μηλικού οξέος σε όλα τα δείγματα του οίνου στους έξι μήνες. Οι «πιεσμένοι» και «απίεστοι» οίνοι των διαφορετικών συγκεντρώσεων δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Επιπλέον οι τιμές του L-μηλικού οξέος των «πιεσμένων» δειγμάτων εμφανίζονται μεγαλύτερες από των αντίστοιχων «απίεστων» δειγμάτων.



Διάγραμμα 4. Εξέλιξη του L-μηλικού οξέος σε διάστημα έξι μηνών. Οι μπάρες δείχνουν το $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στα δείγματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

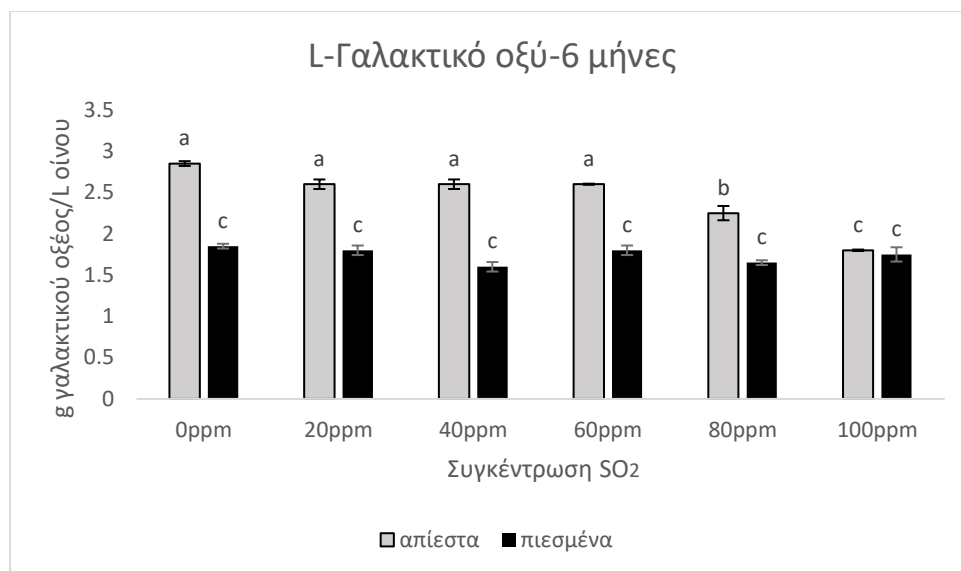
Η εξέλιξη της τιμής του L-μηλικού οξέος στους «πιεσμένους» και «απίεστους» οίνους απεικονίζεται στο Διάγραμμα 4. Η τιμή του L-μηλικού οξέος παρουσιάζει καθοδική πορεία μέσα στο χρόνο και για τους δύο τύπους οίνων («πιεσμένα» και «απίεστα»). Οι «πιεσμένοι» οίνοι εμφανίζουν μεγαλύτερες τιμές L-μηλικού οξέος και διαφέρουν με στατιστικά σημαντική διαφορά από τους «απίεστους» οίνους στις δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν στους τρεις και τους έξι μήνες. Επιπλέον, παρατηρείται ότι η μείωση στη συγκέντρωση του L-μηλικού οξέος μετά από έξι μήνες ήταν 96.2% για τους «πιεσμένους» οίνους, ενώ οι «απίεστοι» παρουσίασαν πτώση 81.4%.

L-Γαλακτικό Οξύ



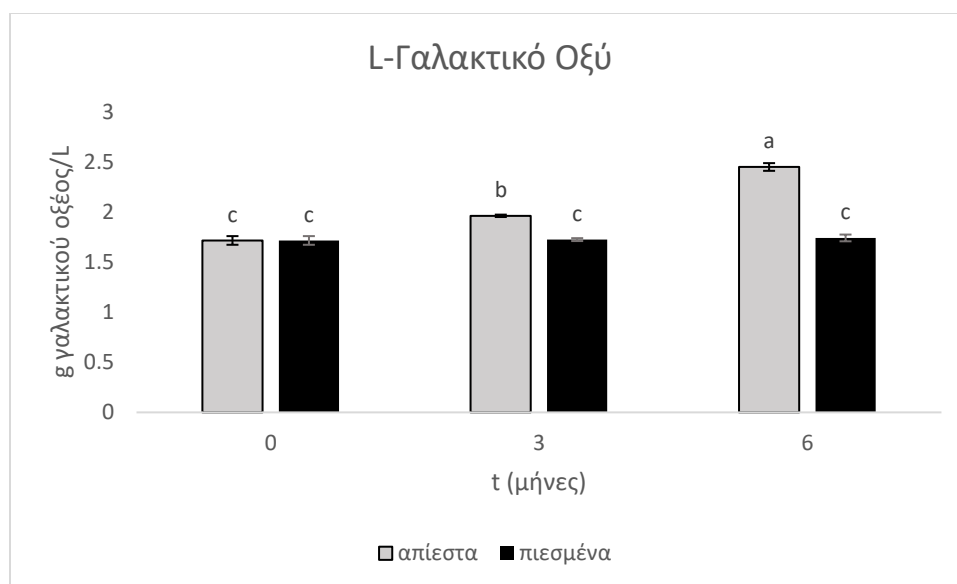
Διάγραμμα 5. L-γαλακτικό οξύ εκφρασμένο σε g ανά L οίνου των «πιεσμένων» και «απίεστων» οίνων με διαφορετικές συγκεντρώσεις SO₂ στους 3 μήνες. Οι μπάρες δείχνουν το $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στα δείγματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

Στο Διάγραμμα 5 απεικονίζονται οι τιμές του L-γαλακτικού οξέος, εκφρασμένες σε γραμμάρια ανά λίτρο οίνου στα επιμέρους δείγματα μετά το διάστημα των τριών μηνών. Οι συγκεντρώσεις 0 και 20ppm SO₂ παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ «πιεσμένων» και «απίεστων» οίνων. Οι τιμές των «απίεστων» οίνων εμφανίζονται υψηλότερες σε σχέση με εκείνες των «πιεσμένων» με εξαίρεση τις τιμές των δειγμάτων της συγκέντρωσης 100ppm, οι οποίες είναι ίσες. Η υψηλότερη τιμή L-γαλακτικού οξέος απαντά στον «απίεστο» οίνο με 0ppm SO₂, ενώ η χαμηλότερη απαντά στους «πιεσμένους» οίνους με 0ppm και 40ppm SO₂.



Διάγραμμα 6. L-γαλακτικό οξύ εκφρασμένο σε g ανά L οίνου των «πιεσμένων» και «απίεστων» οίνων με διαφορετικές συγκεντρώσεις SO₂ στους 6 μήνες. Οι μπάρες δείχνουν το $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στα δείγματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

Στο Διάγραμμα 6 απεικονίζονται οι τιμές του L-γαλακτικού οξέος, εκφρασμένες σε γραμμάρια ανά λίτρο οίνου στα επιμέρους δείγματα μετά το διάστημα των έξι μηνών. Όλοι οι «πιεσμένοι» και «απίεστοι» οίνοι εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους, με τους «απίεστους» να παρουσιάζουν υψηλότερες τιμές L-γαλακτικού οξέος. Εξαίρεση αποτελούν οι οίνοι με 100ppm SO₂, οι οποίοι δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ «πιεσμένου» και «απίεστου» δείγματος. Το «απίεστο» δείγμα με μηδενική προσθήκη SO₂ εμφανίζει την υψηλότερη τιμή L-γαλακτικού οξέος, ενώ η χαμηλότερη απαντά στον «πιεσμένο» οίνο 40ppm SO₂.

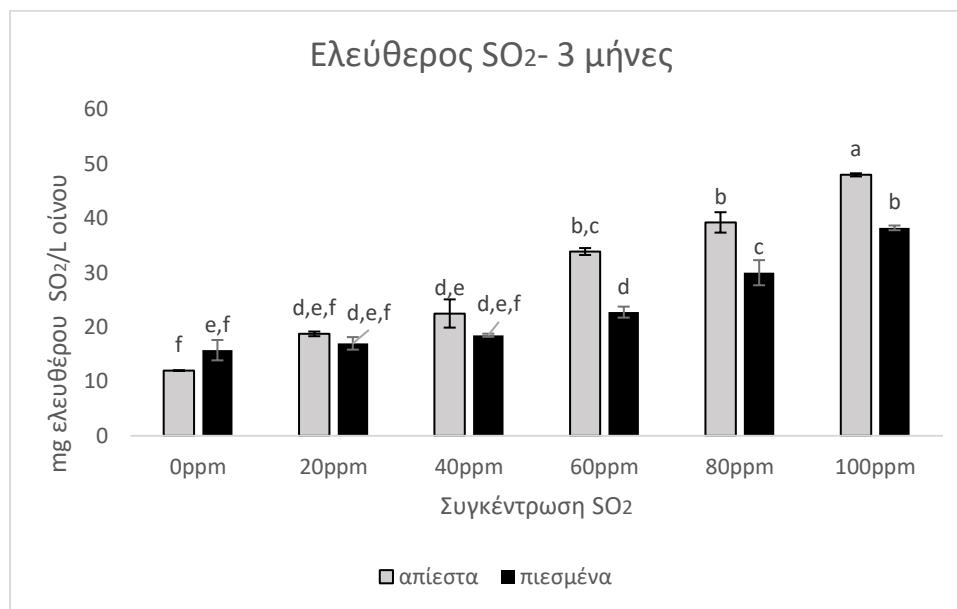


Διάγραμμα 7. Εξέλιξη του L-γαλακτικού οξέος στο διάστημα έξι μηνών. Οι μπάρες δείχνουν το $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στα δείγματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

Η εξέλιξη της τιμής του L-γαλακτικού οξέος, μέσα στο διάστημα των έξι μηνών, απεικονίζεται στο Διάγραμμα 7. Στην πρώτη δειγματοληψία (χρόνος 0) τα «πιεσμένα» και «απίεστα» δείγματα εμφανίζουν ίσες τιμές L-γαλακτικού οξέος, στην συνέχεια όμως διαφοροποιούνται, με τα «απίεστα» να εμφανίζουν υψηλότερες τιμές. Στους τρεις μήνες τα «πιεσμένα» και τα «απίεστα» δείγματα διαφέρουν με στατιστικά σημαντική διαφορά και τα «απίεστα» εμφανίζουν αισθητή αύξηση σε σχέση με την δειγματοληψία του χρόνου 0. Επίσης οι «απίεστοι» οίνοι εμφανίζουν επιπλέον αύξηση στους έξι μήνες, παρουσιάζοντας στατιστικά σημαντικές διαφορές με τους «πιεσμένους» οίνους. Η μεταβολή στην αύξηση του L-γαλακτικού οξέος των «πιεσμένων» οίνων μέσα στον χρόνο εμφανίζεται μηδαμινή εφόσον παρουσιάζει αύξηση κατά 1.5%, σε αντίθεση με την αύξηση των «απίεστων» που παρατηρήθηκε να είναι 42.7%. Το αποτέλεσμα αυτό, στους «απίεστους» οίνους, πιθανόν να φανερώνει μια συνέχεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης μέσα στη φιάλη διότι υφίσταται και ταυτόχρονη μείωση του L-μηλικού οξέος (Διάγραμμα 4).

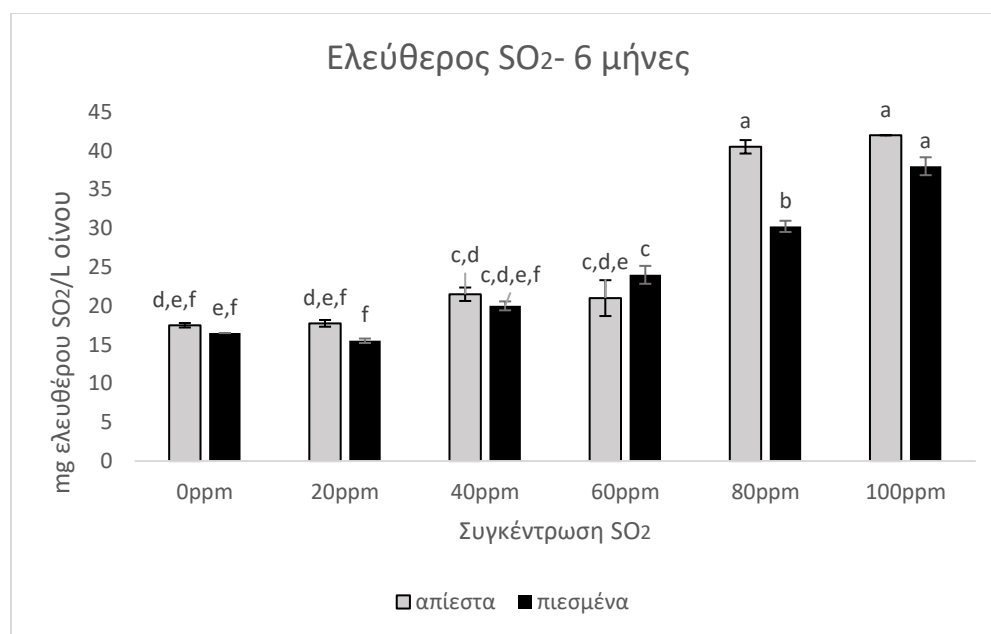
Ελεύθερος και Ολικός Θειώδης Ανυδρίτης

Ελεύθερος SO₂



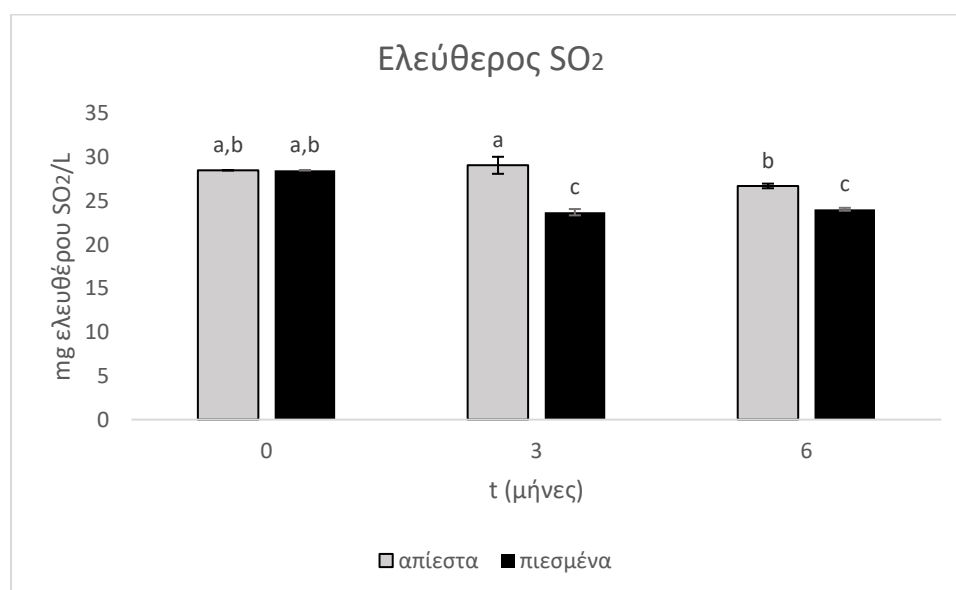
Διάγραμμα 8. Ελεύθερο SO₂ εκφρασμένο σε mg ανά L οίνου των «πιεσμένων» και «απίεστων» οίνων με διαφορετικές συγκεντρώσεις SO₂ στους 3 μήνες. Οι μπάρες δείχνουν το $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στα δείγματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

Στο Διάγραμμα 8 απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις του ελεύθερου SO₂ εκφρασμένο σε mg ανά λίτρο οίνου όλων των «πιεσμένων» και «απίεστων» οίνων με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις SO₂ στους τρεις μήνες. Οι συγκεντρώσεις του ελεύθερου SO₂ των «πιεσμένων» δειγμάτων εμφανίζονται μικρότερες σε σχέση με εκείνες των «απίεστων», με εξαίρεση το «πιεσμένο» δείγμα που δεν προστέθηκε SO₂ (0ppm) που εμφανίζεται μεγαλύτερο συγκριτικά με το αντίστοιχο «απίεστο». Ωστόσο, οι οίνοι με συγκεντρώσεις 60, 80 και 100ppm εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ «πιεσμένων» και «απίεστων» δειγμάτων.



Διάγραμμα 9. Ελεύθερο SO₂ εκφρασμένο σε mg ανά L οίνου των «πιεσμένων» και «απίεστων» οίνων με διαφορετικές συγκεντρώσεις SO₂ στους 6 μήνες. Οι μπάρες δείχνουν το $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στα δείγματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

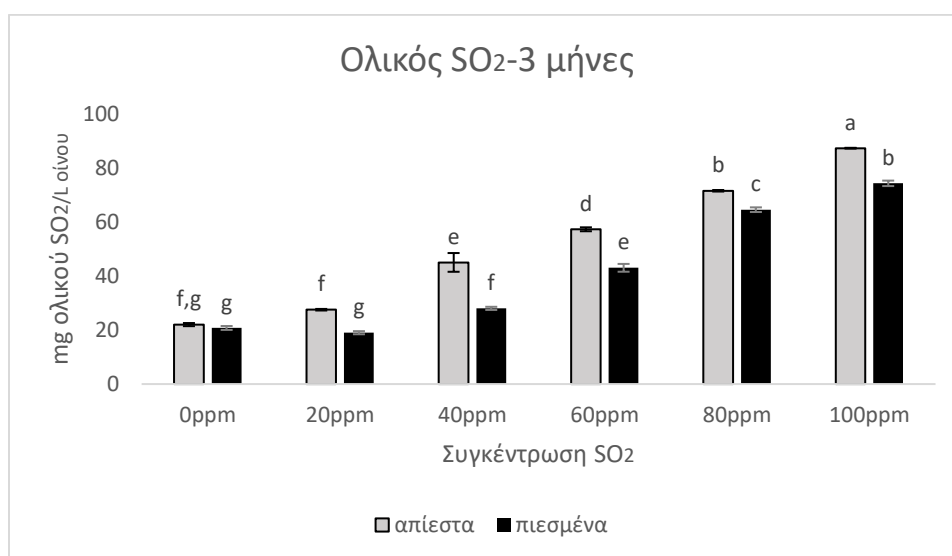
Στο Διάγραμμα 9 παρατίθενται οι συγκεντρώσεις του ελεύθερου SO₂ εκφρασμένο σε mg ανά λίτρο οίνου όλων των «πιεσμένων» και «απίεστων» οίνων με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις SO₂ στους έξι μήνες. Μετά από τους έξι μήνες, ο ελεύθερος SO₂ εμφανίζεται μεγαλύτερος στα «απίεστα» δείγματα, με εξαίρεση τα δείγματα της συγκέντρωσης 60ppm. Το «πιεσμένο» και «απίεστο» δείγμα της συγκέντρωσης 80ppm διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους.



Διάγραμμα 10. Εξέλιξη του ελεύθερου SO₂ στους «πιεσμένους» και «απίεστους» οίνους μέσα στο διάστημα των έξι μηνών. Οι μπάρες δείχνουν το $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στα δείγματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

Οι τιμές του ελεύθερου θειώδη των «πιεσμένων» και «απίεστων» δειγμάτων, στις τρεις δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν, απεικονίζονται στο Διάγραμμα 10. Ο ελεύθερος θειώδης μειώθηκε μέσα στο διάστημα των έξι μηνών και στους δύο τύπους δειγμάτων. Η μείωση που σημείωσαν τα «απίεστα» δείγματα ήταν 6.3%, ενώ τα «πιεσμένα» παρουσίασαν 15.6% μείωση. Οι δύο τύπου δειγμάτων παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους στην 2^η (3 μήνες) και την 3^η δειγματοληψία (6 μήνες).

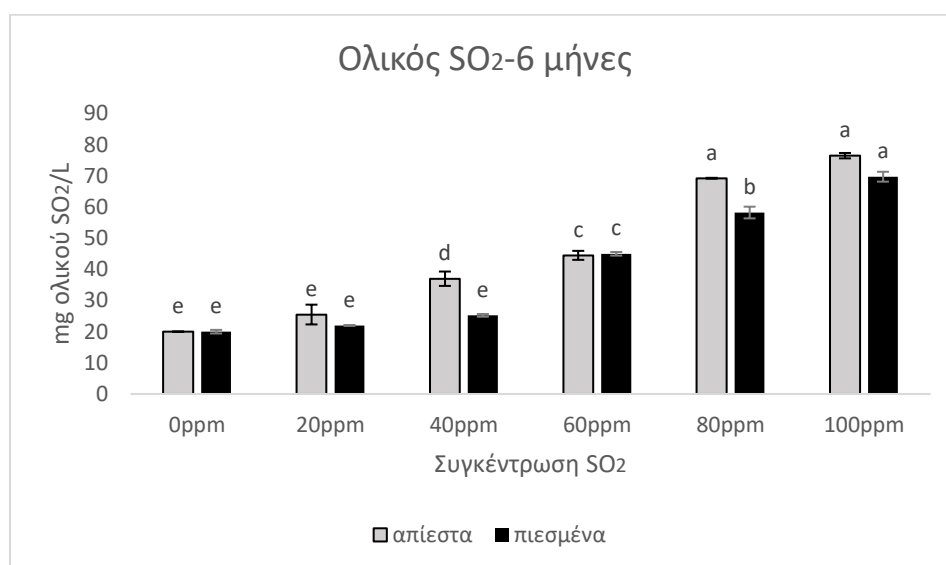
Ολικός SO₂



Διάγραμμα 11. Ολικό SO₂ εκφρασμένο σε mg ανά L οίνου των «πιεσμένων» και «απίεστων» οίνων με διαφορετικές συγκεντρώσεις SO₂ στους 3 μήνες. Οι μπάρες δείχνουν το $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στα δείγματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

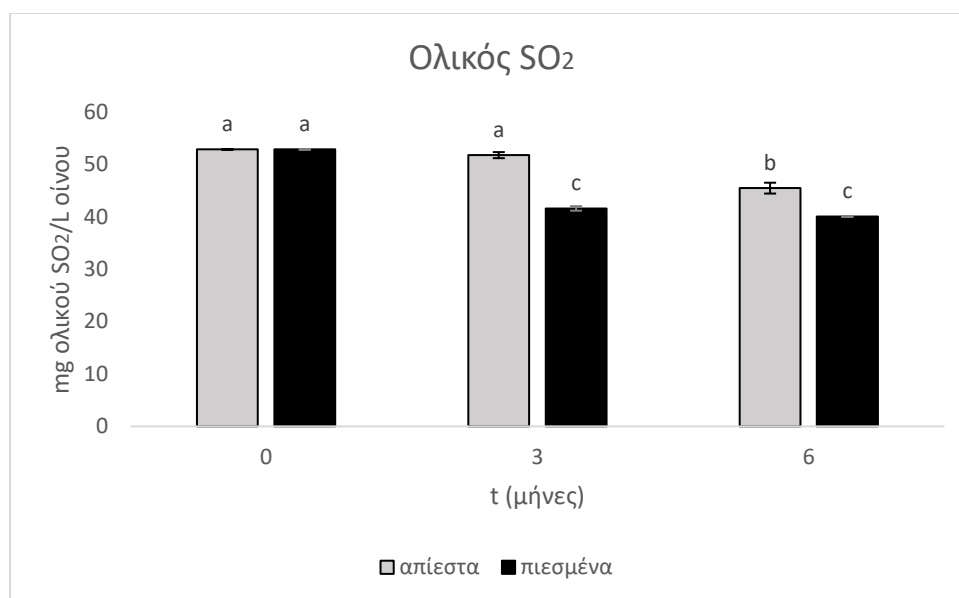
Στο Διάγραμμα 11, εμφανίζονται οι τιμές του ολικού θειώδη ανυδρίτη που μετρήθηκαν στα διαφορετικά δείγματα μετά από τρεις μήνες. Τα «πιεσμένα» και τα «απίεστα» δείγματα όλων των συγκεντρώσεων διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους, εξαιρουμένου εκείνα με τη μηδενική προσθήκη θειώδους. Οι τιμές του ολικού θειώδους των «απίεστων» οίνων εμφανίζονται

μεγαλύτερες από εκείνες των «πιεσμένων». Οι οίνοι στους οποίους δεν προστέθηκαν θειώδη παρουσιάζουν υψηλή τιμή ολικού θειώδους από την αναμενόμενη.



Διάγραμμα 12. Ολικό SO₂ εκφρασμένο σε mg ανά L οίνου των «πιεσμένων» και «απίεστων» οίνων με διαφορετικές συγκεντρώσεις SO₂ στους 6 μήνες. Οι μπάρες δείχνουν το $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στα δείγματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

Στο Διάγραμμα 12, παρατίθενται τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν για τον ολικό θειώδη ανυδρίτη στα διαφορετικά δείγματα μετά από έξι μήνες. Οι οίνοι στους οποίους προστέθηκε 40 και 80ppm SO₂ εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ «πιεσμένων» και «απίεστων» δειγμάτων.

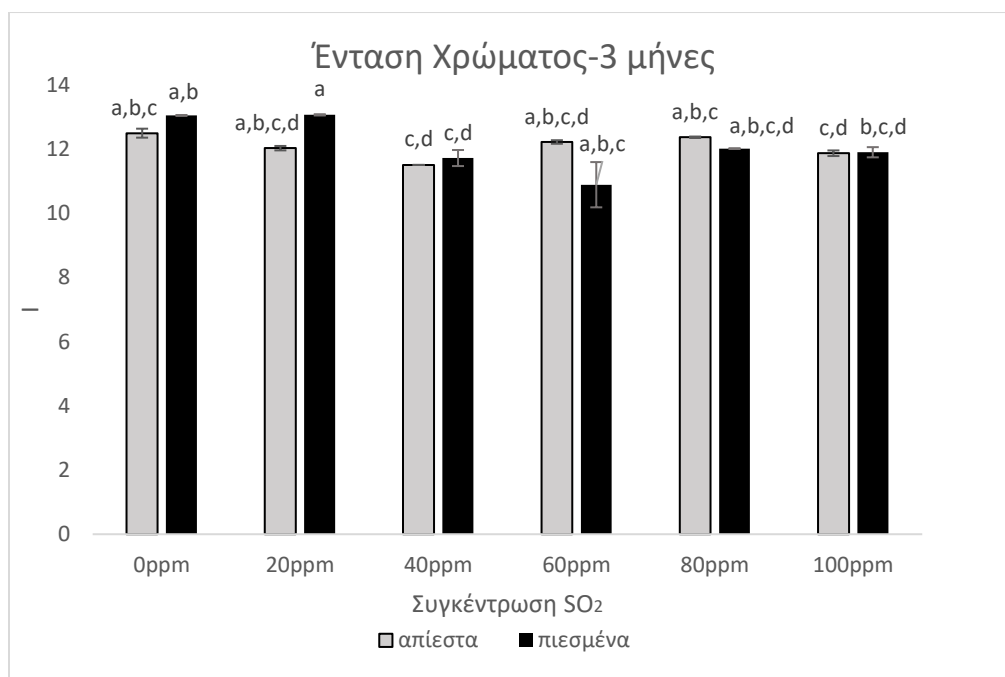


Διάγραμμα 13. Εξέλιξη του ολικού SO₂ στους «πιεσμένους» και «απίεστους» οίνους στο διάστημα έξι μηνών. Οι μπάρες δείχνουν το $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών.

Κατ' όπως φαίνεται απ' το Διάγραμμα 13, ο ολικός θειώδης ανυδρίτης σημειώνει καθοδική τάση και για τους δύο τύπους οίνου («πιεσμένα» και «απίεστα»). Στις δειγματοληψίες που έλαβαν χώρα στους τρεις και στους έξι μήνες οι «απίεστοι» με τους «πιεσμένους» οίνους διαφέρουν μεταξύ τους με στατιστικά σημαντική διαφορά. Η συνολική μείωση που σημειώθηκε στους «απίεστους» οίνους ήταν 14%, σε αντίθεση με τους «πιεσμένους» που ήταν 24.2%. Αυτή η εντονότερη μείωση που παρατηρείται στους «πιεσμένους» οίνους, κατά την αποθήκευση, συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί (Santos *et al.*, 2016, Santos *et al.*, 2018). Πιθανόν να σχετίζεται με τις πολύ δραστικές ρίζες που παράγονται κατά τη διάρκεια της εφαρμογής της πίεσης, λόγω της υψηλής ενσωμάτωσης οξυγόνου στο διάλυμα οίνου, το οποίο και προωθεί τις αντιδράσεις μεταξύ του ελεύθερου SO₂ και των ριζών που σχηματίζονται (Tao *et al.*, 2012). Συνεπώς, η HHP φαίνεται να μεταβάλλει την ισορροπία της αντίδρασης του SO₂ στον οίνο κατά την αποθήκευση, αφού το ελεύθερο SO₂ μπορεί να αντιδράσει με τις δραστικές μορφές οξυγόνου που σχηματίζονται από τις φαινολικές ενώσεις κατά τη διάρκεια της πίεσης, οδηγώντας σε μια πιο έντονη μείωση της περιεκτικότητας του SO₂ στον «πιεσμένο» οίνο (Santos *et al.*, 2016). Ωστόσο η μεταβολή από τους τρεις μήνες στους έξι για τα «απίεστα» δείγματα ήταν 12.2%, σε αντίθεση με τα «πιεσμένα» που σημείωσαν 3.7% μείωση.

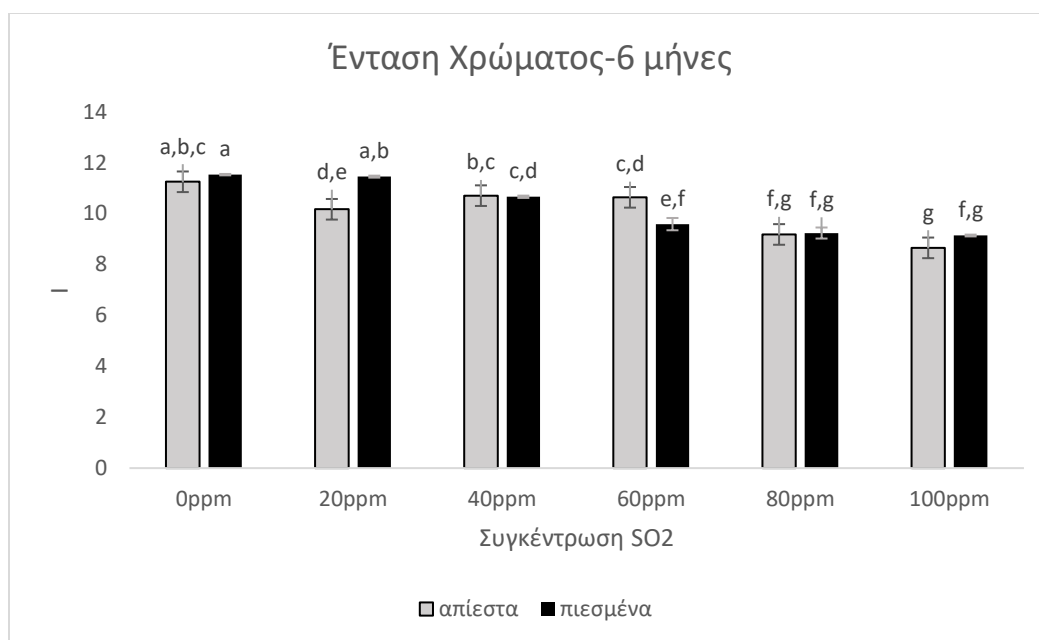
Χρωματικά Χαρακτηριστικά των οίνων

Ένταση



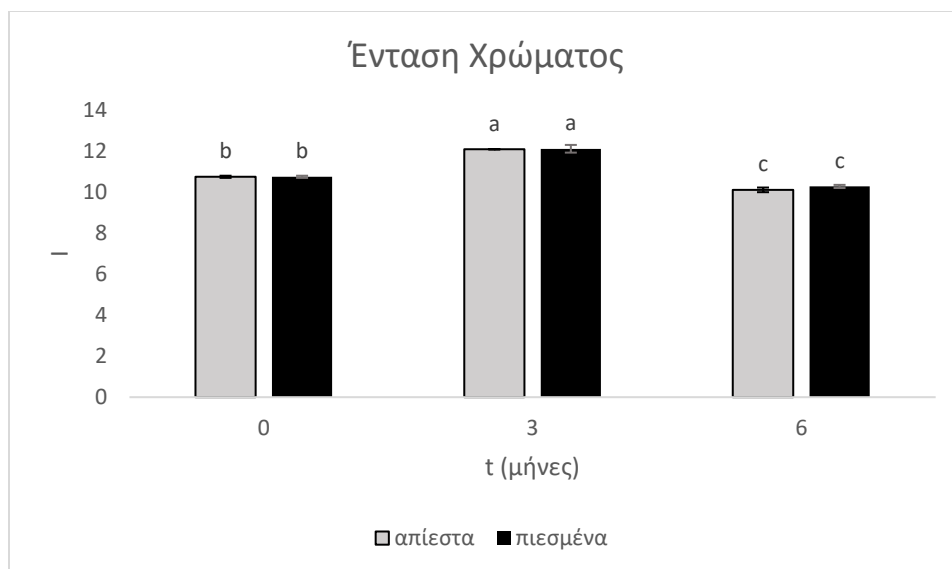
Διάγραμμα 14. Ένταση χρώματος των «πιεσμένων» και «απίεστων» οίνων με διαφορετικές συγκεντρώσεις SO₂ μετά από 3 μήνες. Οι μπάρες δείχνουν το $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στα δείγματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

Στο Διάγραμμα 14 απεικονίζεται η ένταση του χρώματος στα «πιεσμένα» και «απίεστα» δείγματα με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις SO₂ στους τρεις μήνες αποθήκευσης. Η μεγαλύτερη ένταση χρώματος εμφανίζεται στο «πιεσμένο» δείγμα 20ppm, ενώ η μικρότερη στο «πιεσμένο» δείγμα 60ppm. Μεταξύ τους οι «πιεσμένοι» και «απίεστοι» οίνοι με τις ίδιες συγκεντρώσεις θειώδους ανυδρίτη δεν διαφέρουν στατιστικά. Η ένταση χρώματος σε όλα τα δείγματα κυμαίνεται σε τιμές ανώτερες των 10 μονάδων, γεγονός που επιδεικνύει ικανότητα παλαίωσης του οίνου.



Διάγραμμα 15. Ένταση χρώματος των «πιεσμένων» και «απίεστων» οίνων με διαφορετικές συγκεντρώσεις SO₂ μετά από 6 μήνες. Οι μπάρες δείχνουν το $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στα δείγματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

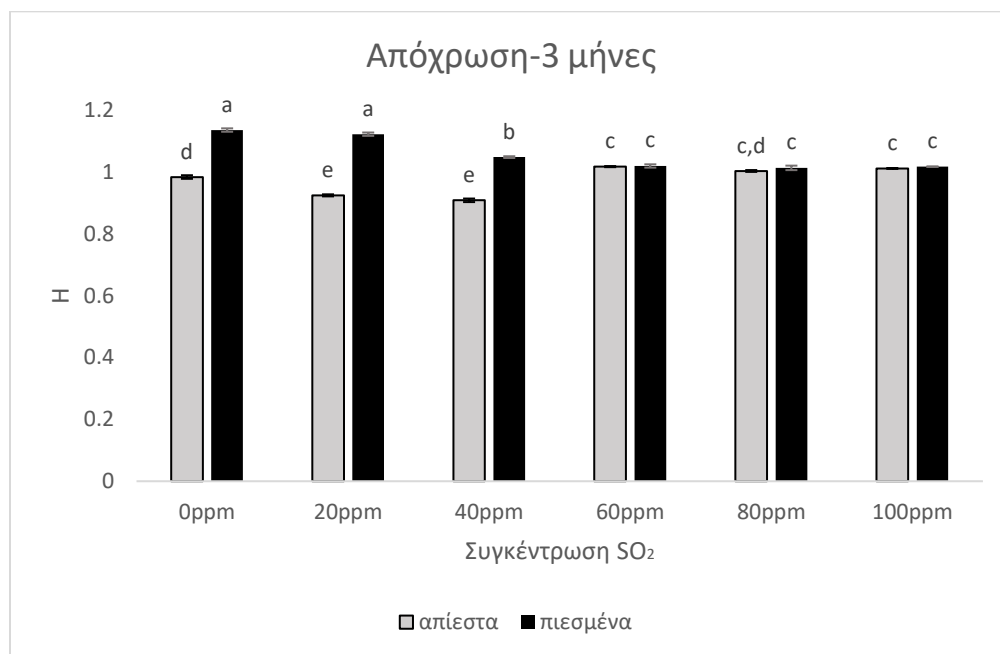
Στο Διάγραμμα 15, παρατίθενται οι τιμές της έντασης χρώματος των οίνων στους έξι μήνες. Συγκριτικά με τους τρεις μήνες, παρατηρείται αισθητή μείωση στην ένταση του χρώματος όλων των οίνων, ανεξαρτήτου εφαρμογής HHP. Επίσης από το Διάγραμμα 15, διαπιστώνεται ότι οι οίνοι με χαμηλότερες συγκεντρώσεις SO₂ (0, 20, 40 και 60ppm) παρουσιάζουν υψηλότερη ένταση χρώματος σε σχέση με τους οίνους με τις υψηλότερες τιμές θειώδους (80 και 100ppm) στο διάστημα των έξι μηνών, διαφέροντας στατιστικά μεταξύ τους. Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ «πιεσμένου» και «απίεστου» δείγματος παρουσιάζουν οι οίνοι με 20ppm και 60ppm, εναντιθέσει με τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις που δεν διέφεραν μεταξύ τους στατιστικά. Οι οίνοι με τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις (0, 20, 40 και 60) εμφανίζουν υψηλότερες τιμές έντασης σε σχέση με τους υπόλοιπους οίνους, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στο ελαφρώς μικρότερο pH που παρουσιάζουν αλλά και στον SO₂, ο οποίος αποχρωματίζει τις ανθοκυάνες (Ribéreau-Gayon and Stonestreet, 1965). Επιπλέον αυτές οι συγκεντρώσεις (0, 20, 40 και 60) διαφέρουν από τις άλλες δύο με στατιστικά σημαντική διαφορά.



Διάγραμμα 16. Εξέλιξη της έντασης του χρώματος «πιεσμένων» και «απίεστων» οίνων σε διάστημα έξι μηνών. Οι μπάρες δείχνουν το $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών και τα διαφορετικά γράμματα επιδεικνύουν τις στατιστικές διαφορές.

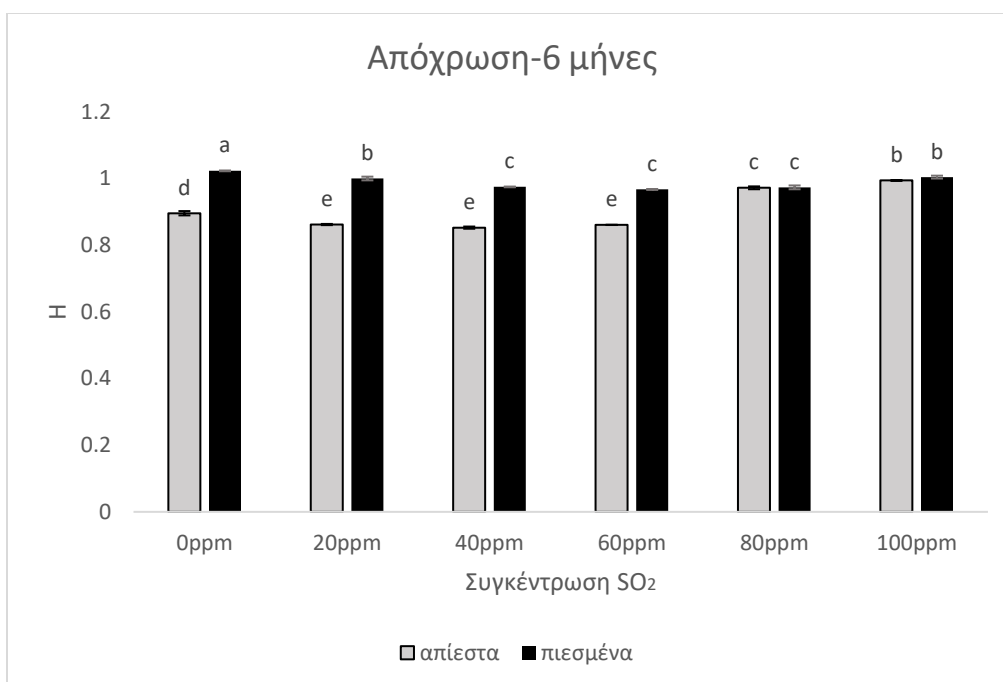
Παρατηρώντας το Διάγραμμα 16, είναι εμφανές ότι στην εξέλιξη του χρόνου η ένταση του χρώματος των δειγμάτων υπέστη αρχικά μια αύξηση στους τρεις μήνες και στη συνέχεια στους έξι μήνες μειώθηκε. Οι «πιεσμένοι» και «απίεστοι» οίνοι δεν παρουσιάζουν μεταξύ τους μεγάλες διαφορές στις τιμές της έντασης του χρώματος και δεν διαφέρουν στατιστικά. Παράλληλα οι τρεις δειγματοληψίες (0, 3 και 6 μήνες) παρουσιάζουν μεταξύ τους στατιστικά σημαντικές διαφορές. Πιθανόν η μείωση που επήλθε στην ένταση του χρώματος στο διάστημα των έξι μηνών να οφείλεται στην παρατηρούμενη μείωση των ανθοκυανών που παρατηρείται κατά την παλαίωση λόγω συμμετοχής των μονομερών ανθοκυανών σε πολυάριθμες αντιδράσεις συμπύκνωσης καθώς και σε άλλες αντιδράσεις υδρόλυσης και αποικοδόμησης σε μικρότερο βαθμό (Santos-Buelga *et al.*, 1999).

Απόχρωση



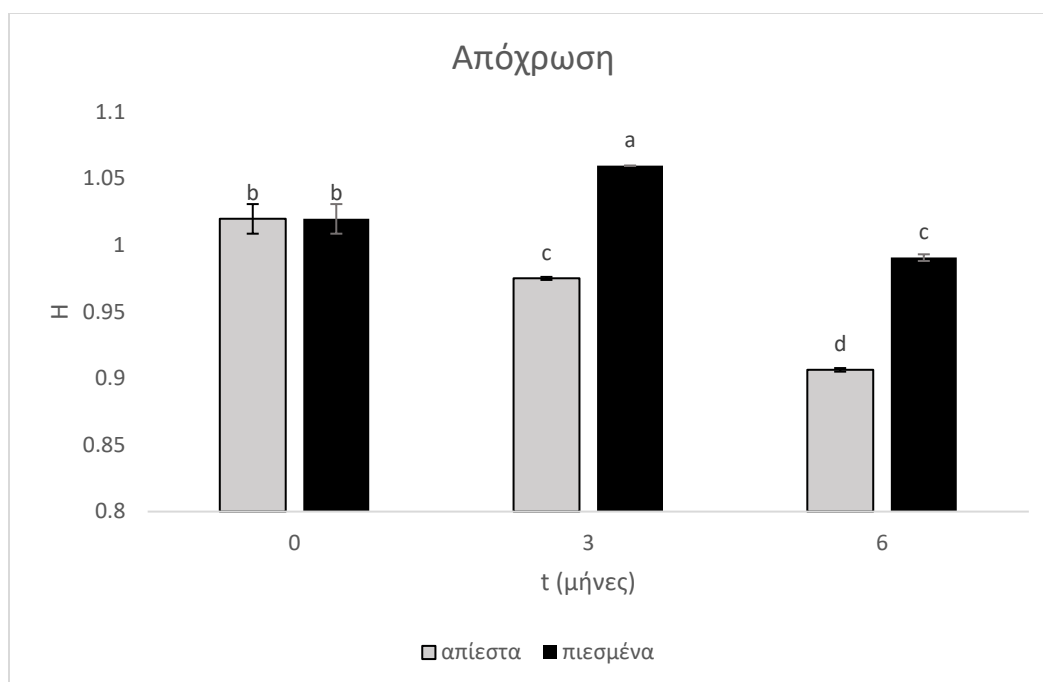
Διάγραμμα 17. Απόχρωση των «πιεσμένων» και «απίεστων» οίνων με διαφορετικές συγκεντρώσεις SO₂ στους 3 μήνες. Οι μπάρες δείχνουν το $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στα δείγματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

Στο Διάγραμμα 17 απεικονίζεται η απόχρωση των οίνων στους τρεις μήνες αποθήκευσης. Οι οίνοι με συγκεντρώσεις 0, 20 και 40ppm SO₂ εμφανίζουν στατιστικές διαφορές μεταξύ «πιεσμένων» και «απίεστων», με τα «απίεστα» δείγματα να παρουσιάζουν χαμηλότερες τιμές απόχρωσης. Πιο συγκεκριμένα, ο «απίεστος» οίνος 40ppm εμφανίζει την χαμηλότερη τιμή απόχρωσης, ενώ ο «πιεσμένος» οίνος με 0 προσθήκη θειώδους παρουσίασε την υψηλότερη.



Διάγραμμα 18. Απόχρωση των «πιεσμένων» και «απίεστων» οίνων με διαφορετικές συγκεντρώσεις SO₂ στους 6 μήνες. Οι μπάρες δείχνουν το $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στα δείγματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

Στο Διάγραμμα 18, παρατίθενται οι τιμές της απόχρωσης όλων των οίνων μετά το διάστημα των έξι μηνών. Παρατηρείται ότι οι «πιεσμένοι» οίνοι με συγκεντρώσεις 0, 20, 40 και 60ppm SO₂ παρουσιάζουν αυξημένες τιμές απόχρωσης μετά την πάροδο των έξι μηνών, και διαφέρουν στατιστικά από τους αντίστοιχους «απίεστους», οι οποίοι εμφανίζουν χαμηλότερες τιμές απόχρωσης. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στην εφαρμογή της HHP, η οποία μακροπρόθεσμα (μετά από έξι μήνες) επηρεάζει τα φυσικοχημικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ερυθρού οίνου, εμφανίζοντας μια πιο πορτοκαλί απόχρωση, διότι αυξάνει τις αντιδράσεις συμπύκνωσης των φαινολικών ενώσεων που λαμβάνουν χώρα κατά την αποθήκευση του οίνου (Santos *et al.*, 2016). Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις SO₂ (80 και 100ppm) δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

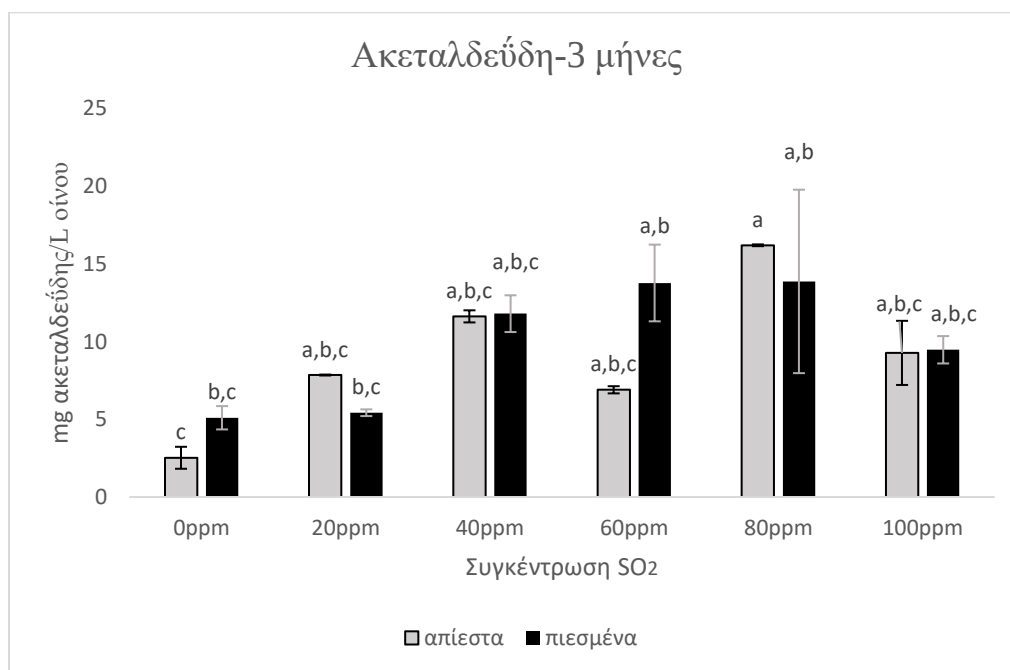


Διάγραμμα 19. Εξέλιξη της απόχρωσης μεταξύ «πιεσμένων» και «απίεστων» σε διάστημα έξι μηνών. Οι μπάρες δείχνουν το $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών, ενώ οι τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στα δείγματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

Στο Διάγραμμα 19 παρουσιάζεται η εξέλιξη της απόχρωσης μεταξύ των οίνων που υποβλήθηκαν σε HHP και των μη υποβληθέντων μέσα στο διάστημα των έξι μηνών. Στον χρόνο 0 τα «πιεσμένα» και τα «απίεστα» δεν παρουσίασαν διαφορές μεταξύ τους, ενώ στους τρεις και στους έξι μήνες οι διαφορές των «πιεσμένων» και των «απίεστων» είναι στατιστικά σημαντικές. Η απόχρωση φαίνεται μέσα στο διάστημα των τριών μηνών να αυξήθηκε στους «πιεσμένους» οίνους, ενώ μειώθηκε στους «απίεστους». Στους έξι μήνες μειώθηκε η απόχρωση και στις δύο κατηγορίες οίνων, με τους «πιεσμένους» να εμφανίζουν υψηλότερη τιμή. Οι τιμές που λήφθηκαν για την απόχρωση των οίνων στην πρώτη δειγματοληψία (0 μήνες), οι οποίες υποδεικνύουν την χημική ηλικία ενός οίνου, εμφανίζονται στο 1,01 και χαρακτηρίζονται αυξημένες για φρέσκο οίνο. Οι ανθοκυάνες, οι οποίες είναι οι βασικές φαινολικές ενώσεις που προσδίδουν το ερυθρό χρώμα στον οίνο (Monagas *et al.*, 2006) έχουν την τάση να ξεθωριάζουν κατά τη διάρκεια της παλαίωσης (De Coninck, Jordao *et al.*, 2006), οπότε το χρώμα του οίνου μετατρέπεται σε πορτοκαλί το οποίο εκφράζεται στο φασματοφωτόμετρο με αυξημένη απόχρωση, γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με το αποτέλεσμα αυτής της μελέτης.

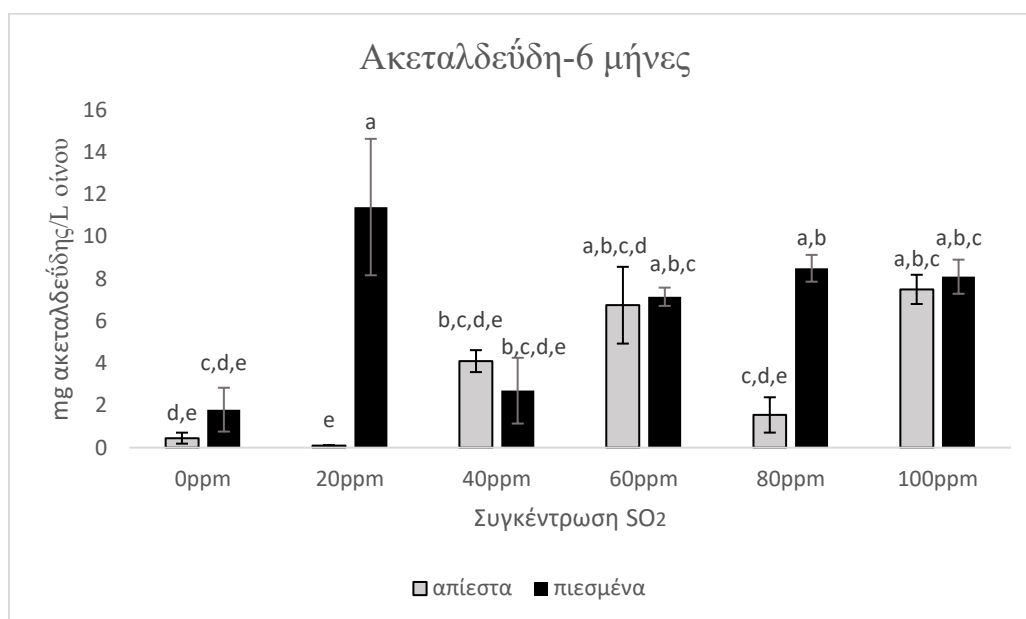
Ακεταλδεΐδη

Στα παρακάτω Διαγράμματα (20, 21 και 22) απεικονίζονται τα αποτελέσματα από την μέτρηση της συγκέντρωσης της ακεταλδεΐδης με τον ‘One analyser’. Για την μέτρηση της ακεταλδεΐδης με τη βοήθεια του ‘One analyser’ δεν χρειάστηκε η δημιουργία πρότυπης καμπύλης.



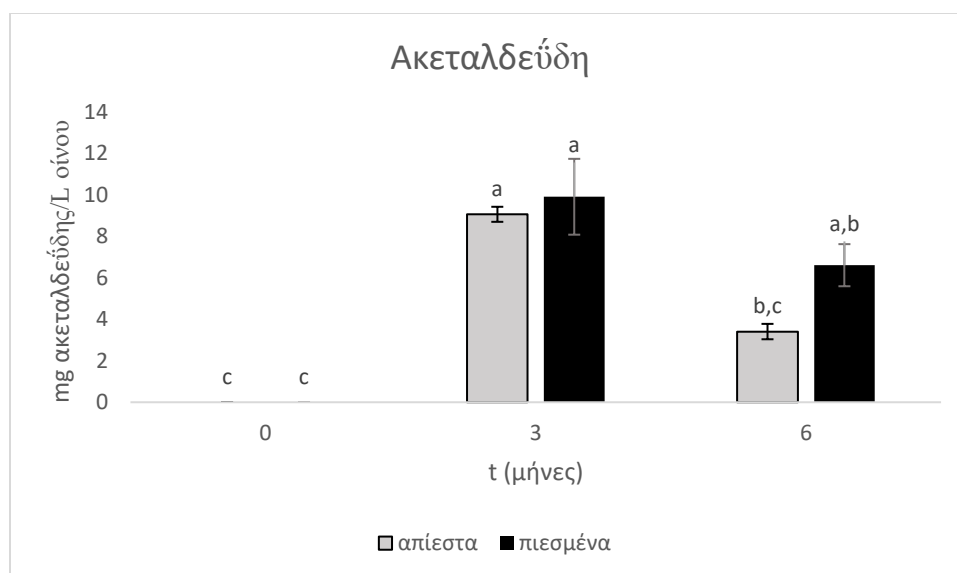
Διάγραμμα 20. Η συγκέντρωση της ακεταλδεΐδης των «πιεσμένων» και «απίεστων» οίνων με διαφορετικές συγκεντρώσεις SO₂ στους 3 μήνες. Οι μπάρες δείχνουν το $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στα δείγματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

Στο παραπάνω Διάγραμμα 20 φαίνονται πως κυμαίνονται οι συγκεντρώσεις ακεταλδεΐδης των «πιεσμένων» και «απίεστων» δειγμάτων μετά το διάστημα των τριών μηνών. Η υψηλότερη τιμή ακεταλδεΐδης εμφάνισε ο «απίεστος» οίνος με 80ppm SO₂ ενώ η χαμηλότερη τιμή απαντά στον «απίεστο» οίνο με μηδενική προσθήκη θειώδη ανυδρίτη. Καμία συγκέντρωση SO₂ δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ «πιεσμένων» και «απίεστων» οίνων.



Διάγραμμα 21. Η συγκέντρωση της ακεταλδεΰδης των «πιεσμένων» και «απίεστων» οίνων με διαφορετικές συγκεντρώσεις SO₂ στους 6 μήνες. Οι μπάρες δείχνουν το $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στα δείγματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

Στο Διάγραμμα 21 εμφανίζονται οι συγκεντρώσεις της ακεταλδεΰδης στα «πιεσμένα» και «απίεστα» δείγματα όλων των συγκεντρώσεων SO₂ όπως μετρήθηκαν στους έξι μήνες. Οι οίνοι με συγκεντρώσεις 20ppm και 80ppm παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ «πιεσμένων» και «απίεστων» δειγμάτων, με τα πρώτα («πιεσμένα») να παρουσιάζουν υψηλότερες τιμές ακεταλδεΰδης. Ταυτόχρονα ο «πιεσμένος» οίνος 20ppm εμφανίζει την υψηλότερη συγκέντρωση ακεταλδεΰδης στη δειγματοληψία που πραγματοποιήθηκε στους έξι μήνες, ενώ ο αντίστοιχος «απίεστος» οίνος (20ppm) την χαμηλότερη.

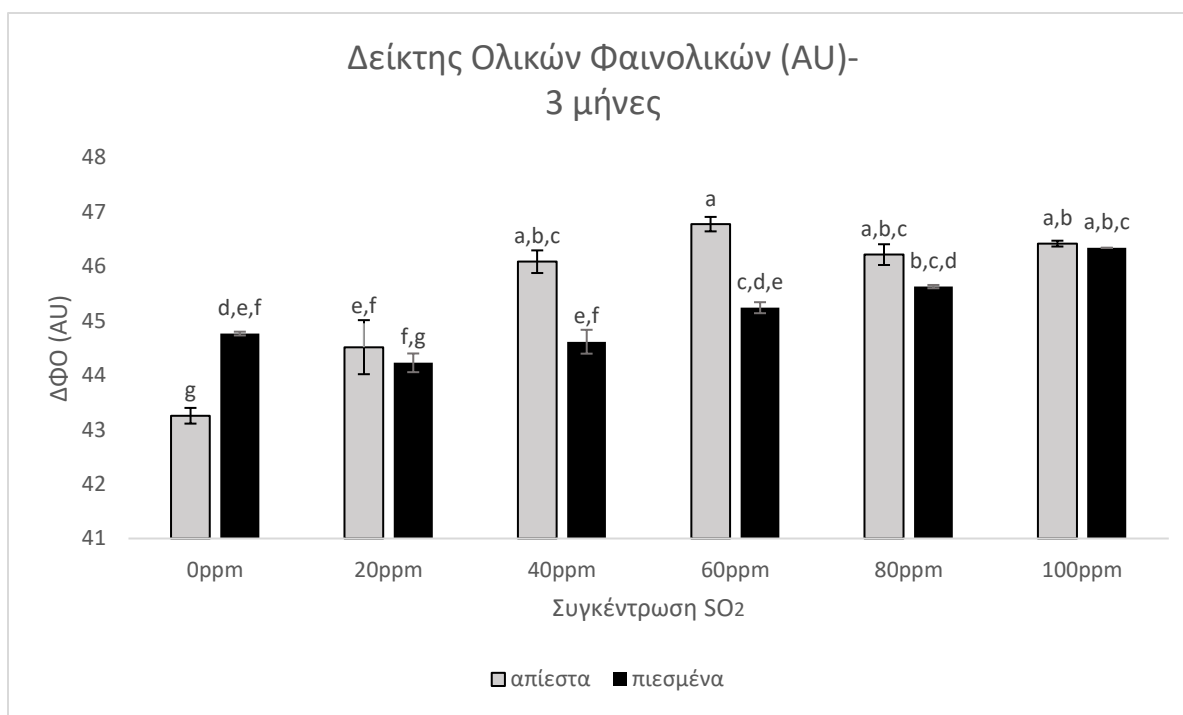


Διάγραμμα 22. Εξέλιξη της συγκέντρωσης ακεταλδεΰδης σε mg ανά L οίνου μεταξύ «πιεσμένων» και «απίεστων» σε χρονικό διάστημα 6 μηνών. Οι μπάρες δείχνουν το $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών, ενώ οι τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στα δείγματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

Στο Διάγραμμα 22 απεικονίζεται η εξέλιξη της συγκέντρωσης της ακεταλδεΰδης μέσα στο χρονικό διάστημα των έξι μηνών. Η ακεταλδεΰδη εμφανίζεται μηδενική στην πρώτη δειγματοληψία και στη συνέχεια παρουσιάζει ανοδική πορεία μέχρι τους τρεις μήνες. Στους έξι μήνες φαίνεται ότι η συγκέντρωση της ακεταλδεΰδης μειώθηκε σε σχέση με τις μετρήσεις της προηγούμενης δειγματοληψίας (3 μήνες). Η συγκέντρωση της ακεταλδεΰδης εμφανίζεται πιο αυξημένη στους «πιεσμένους» οίνους στις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν στους τρεις και στους έξι μήνες, ωστόσο τα «πιεσμένα» με τα «απίεστα» δείγματα δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους σε καμία από τις τρεις δειγματοληψίες. Η μείωση της ακεταλδεΰδης που παρατηρείται μετά τους έξι μήνες αποθήκευσης, μπορεί να οφείλεται 1) στις άμεσες αντιδράσεις της ακεταλδεΰδης με τον 3-Ο-γλυκοζίτη της μαλβιδίνης (Bakker & Timberlake, 1997), 2) στην ένωση των φλαβονολών συνδεδεμένα με γλυοξυλικά οξέα (Es-Safi *et al.*, 2000), 3) τη δημιουργία αιθυλο-γέφυρων μεταξύ ανθοκυανών και φλαβονολών (Atanasova *et al.*, 2002).

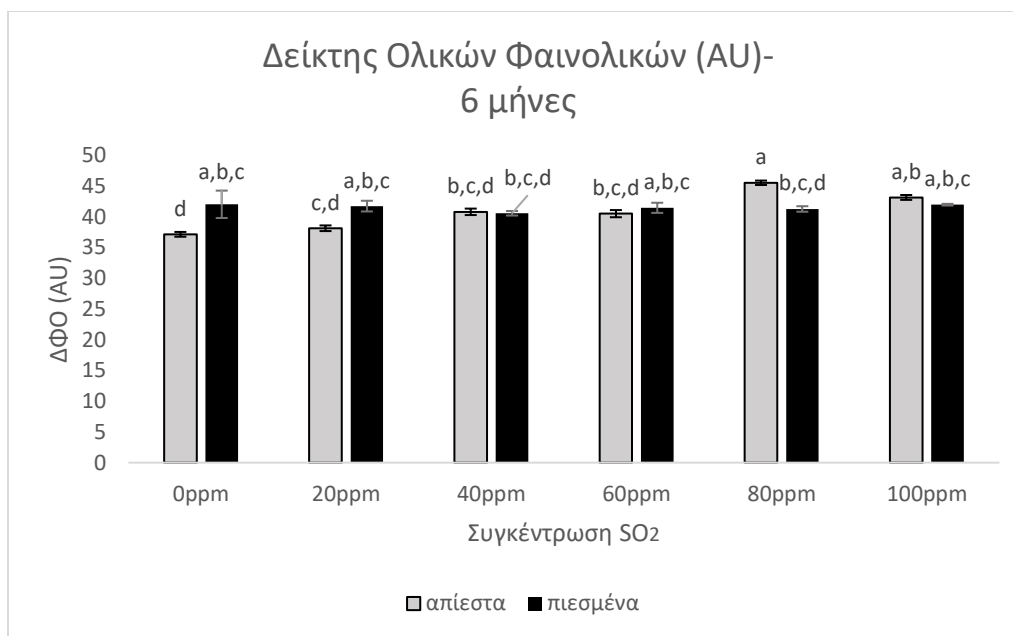
Ολικά Φαινολικά Συστατικά

Δείκτης Φαινολικών Ουσιών (ΔΦΟ)



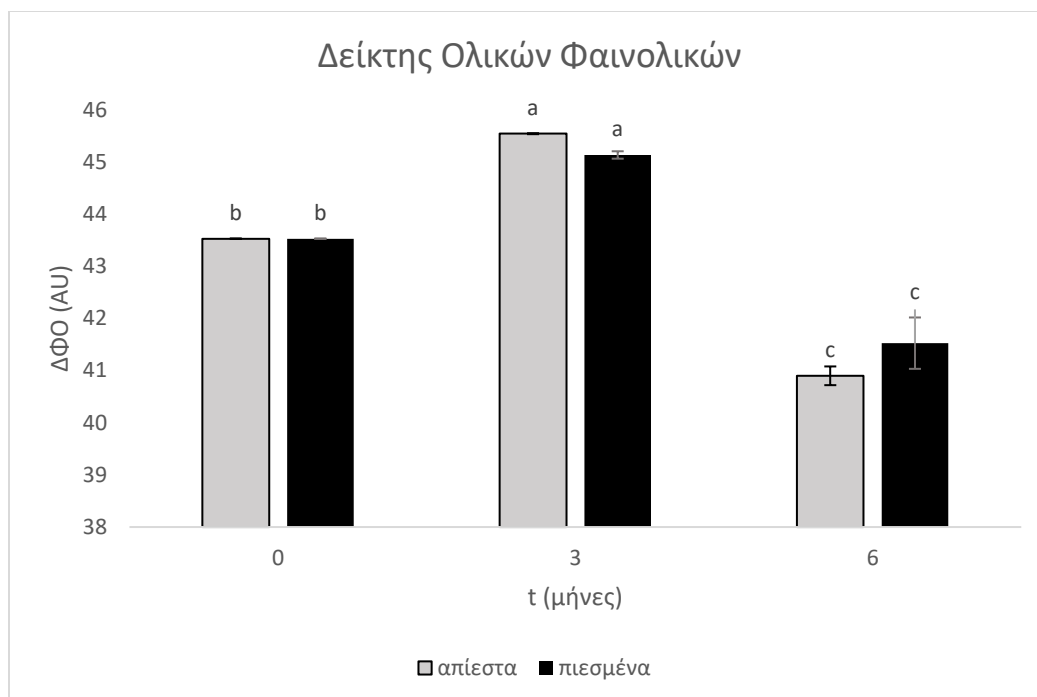
Διάγραμμα 23. Δείκτης Φαινολικών Ουσιών «πιεσμένων» και «απίεστων» οίνων με διαφορετικές συγκεντρώσεις SO₂ στους 3 μήνες. Οι μπάρες δείχνουν το $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στα δείγματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

Στο Διάγραμμα 23 παρουσιάζονται οι τιμές του Δείκτη Φαινολικών Ουσιών (ΔΦΟ) μετά το διάστημα των τριών μηνών. Η υψηλότερη τιμή Δ.Φ.Ο. απαντά στον «απίεστο» οίνο με 60ppm και η χαμηλότερη τιμή απαντά στον «απίεστο» οίνο στον οποίο δεν προστέθηκε SO₂ (0ppm). Οι «πιεσμένοι» οίνοι των συγκεντρώσεων 0, 40 και 60ppm SO₂ παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές με τους αντίστοιχους «απίεστους» οίνους, εμφανίζοντας χαμηλότερες τιμές Δ.Φ.Ο., με εξαίρεση την 0ppm συγκέντρωση που το «απίεστο» δείγμα έχει χαμηλότερη τιμή.



Διάγραμμα 24. Δείκτης Φαινολικών Ουσιών «πιεσμένων» και «απίεστων» οίνων με διαφορετικές συγκεντρώσεις SO₂ στους 3 μήνες. Οι μπάρες δείχνουν το $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στα δείγματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

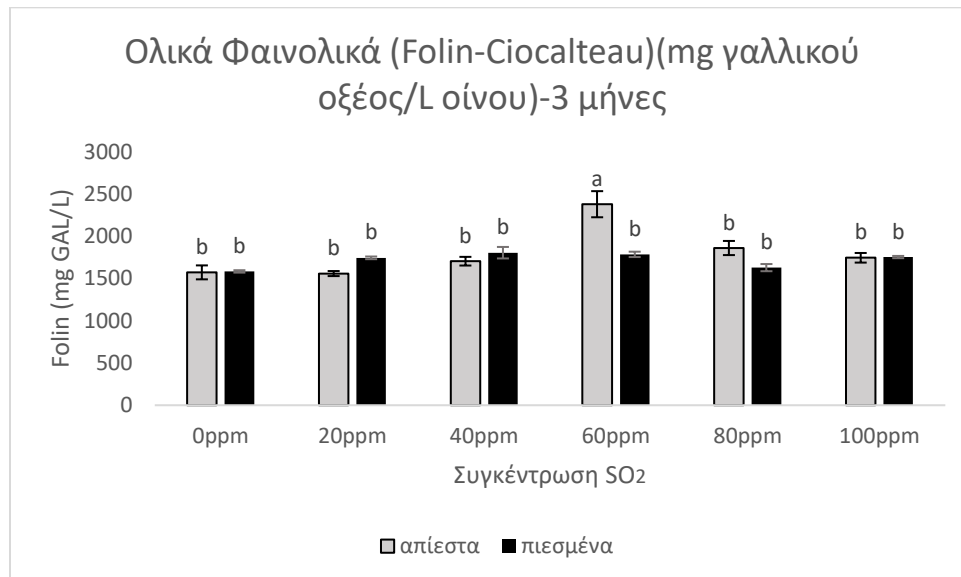
Οι τιμές του Δείκτη Φαινολικών Ουσιών (Δ.Φ.Ο.) όλων των δειγμάτων μετά από έξι μήνες παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 24. Οι «πιεσμένοι» και «απίεστοι» οίνοι οι οποίοι διαφέρουν στατιστικά είναι εκείνοι με την μηδενική προσθήκη θειώδους και τα 80ppm. Στην πρώτη περίπτωση ο «απίεστος» οίνος 0ppm εμφανίζει χαμηλότερη τιμή από τον αντίστοιχο «πιεσμένο», ενώ ταυτόχρονα αποτελεί και την χαμηλότερη τιμή Δ.Φ.Ο. που καταγράφηκε στους έξι μήνες. Παράλληλα, η τιμή του «απίεστου» οίνου 80ppm υπερέχει του «πιεσμένου» και αποτελεί την υψηλότερη τιμή που καταγράφηκε στους έξι μήνες.



Διάγραμμα 25. Εξέλιξη του Δείκτη Φαινολικών Ουσιών μεταξύ «πιεσμένων» και «απίεστων» σε διάστημα 6 μηνών. Οι μπάρες δείχνουν το $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών, ενώ οι τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στα δείγματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

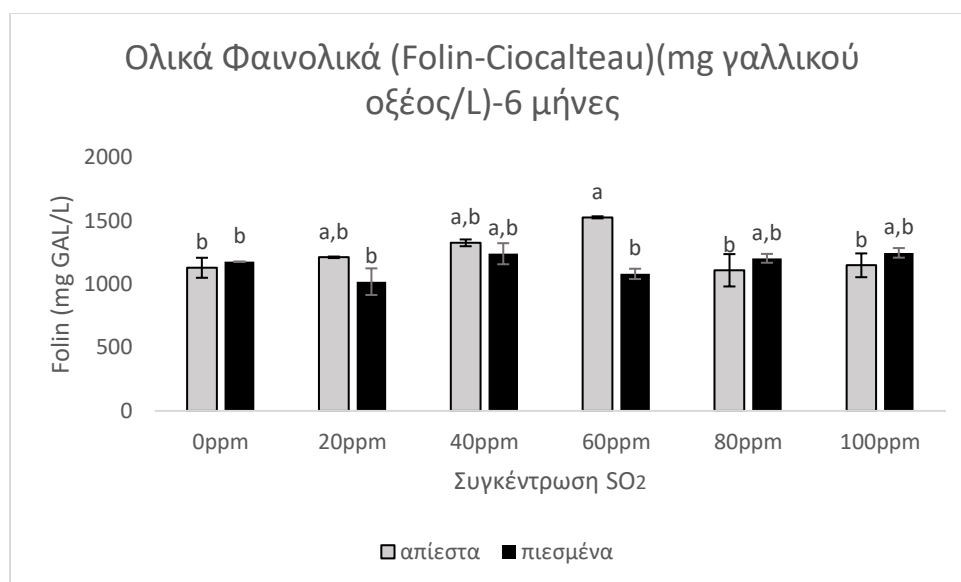
Στο Διάγραμμα 25 φαίνεται η εξέλιξη των τιμών του Δείκτη Φαινολικών Ουσιών σε διάστημα έξι μηνών. Τα «πιεσμένα» και «απίεστα» δείγματα δεν διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους σε καμία δειγματοληψία. Παρατηρείται όμως μια αύξηση της τιμής του Δ.Φ.Ο. μετά από τρεις μήνες και στη συνέχεια μια υψηλή μείωση. Η μείωση των ολικών φαινολικών που λαμβάνει χώρα στους έξι μήνες συγκριτικά με τις πρώτες μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν, μπορεί να οφείλεται στην χημική οξείδωση ή στον συγχρωματισμό των φαινολικών με ανθοκυάνες (Burin *et al.*, 2011; Monagas *et al.*, 2006).

Μέθοδος Folin-Ciocalteu



Διάγραμμα 26. Ολικά φαινολικά (μέθοδος Folin-Ciocalteu) «πιεσμένων» και «απίεστων» οίνων με διαφορετικές συγκεντρώσεις SO₂ στους 3 μήνες. Οι μπάρες δείχνουν το $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στα δείγματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

Στο Διάγραμμα 26, παρατίθενται οι συγκεντρώσεις των ολικών φαινολικών των «πιεσμένων» και «απίεστων» οίνων με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις SO₂ μετά από τρεις μήνες. Για την έκφραση των αποτελεσμάτων σε mg γαλλικού οξέος ανά λίτρο οίνου, χρησιμοποιήθηκε πρότυπη ευθεία γνωστών συγκεντρώσεων γαλλικού οξέος, με εξίσωση $y = 0,0011 \cdot x + 0,0192$ ($R^2 = 0,999$). Και με αυτή τη μέθοδο, όπως και με το ΔΦΟ μετά από τρεις μήνες (Διάγραμμα 26), η ψηλότερη συγκέντρωση φαινολικών παρατηρείται στον «απίεστο» οίνο με 60ppm SO₂, ο οποίος παρουσιάζει στατιστικά σημαντικές διαφορές με τον αντίστοιχο «πιεσμένο». Επίσης το «απίεστο» δείγμα 20ppm εμφανίζει την χαμηλότερη τιμή ολικών φαινολικών, βέβαια ούτε η ίδια αλλά ούτε και καμία άλλη συγκέντρωση δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ «πιεσμένου» και «απίεστου» δείγματος.

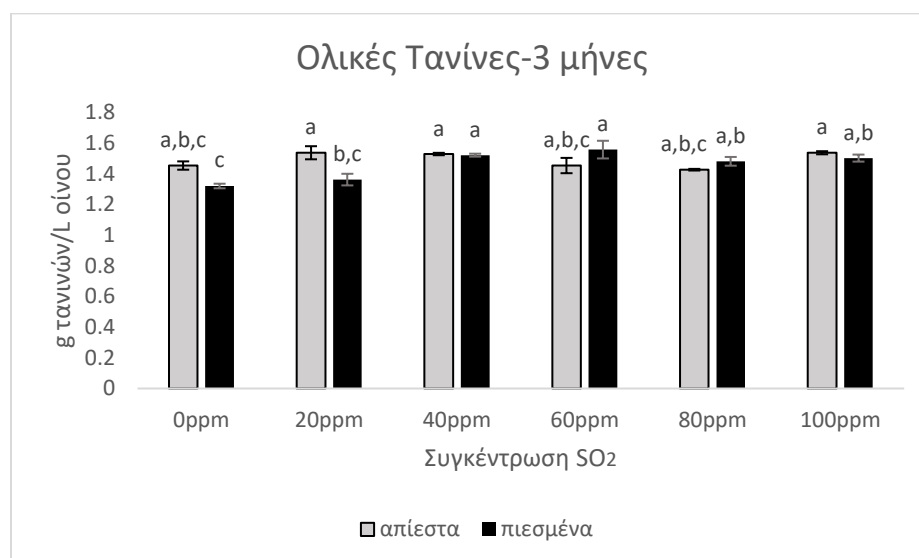


Διάγραμμα 27. Ολικά φαινολικά (μέθοδος Folin-Ciocalteu) «πιεσμένων» και «απίεστων» οίνων με διαφορετικές συγκεντρώσεις SO₂ στους 6 μήνες. Οι μπάρες δείχνουν το $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στα δείγματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

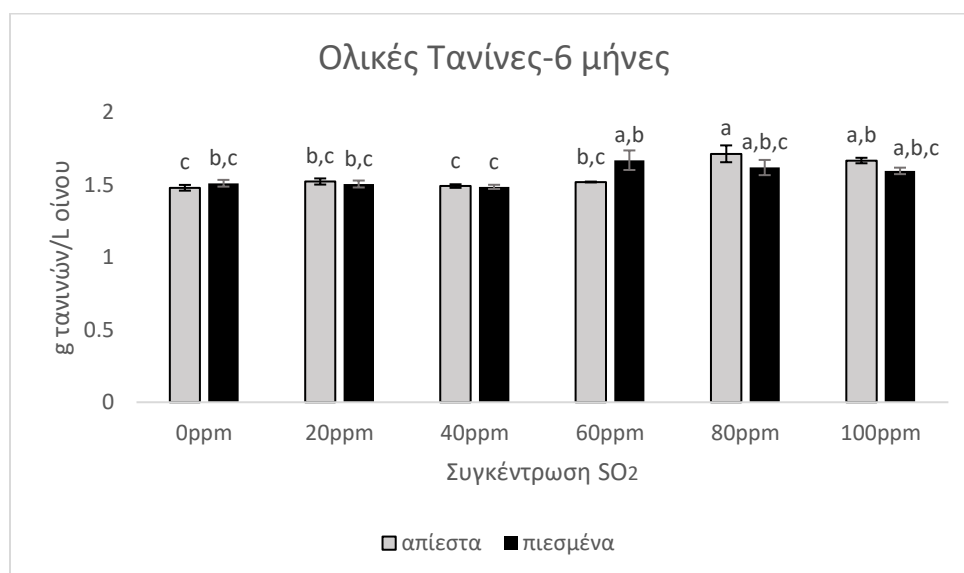
Στο Διάγραμμα 27, παρατίθενται οι συγκεντρώσεις των ολικών φαινολικών των «πιεσμένων» και «απίεστων» οίνων με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις SO₂ μετά από έξι μήνες. Για την έκφραση των αποτελεσμάτων σε mg γαλλικού οξέος ανά λίτρο οίνου, χρησιμοποιήθηκε πρότυπη ευθεία γνωστών συγκεντρώσεων γαλλικού οξέος, με εξίσωση $y = 0,0011 \cdot x + 0,0192$ ($R^2 = 0,999$). Και στους έξι μήνες τα «πιεσμένα» και «απίεστα» δείγματα που διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους είναι αυτά με 60ppm συγκέντρωση θειώδους ανυδρίτη, με το «απίεστο» να εμφανίζει την υψηλότερη τιμή ολικών φαινολικών που καταγράφηκε στην συγκεκριμένη δειγματοληψία. Η χαμηλότερη τιμή εμφανίστηκε στον «πιεσμένο» οίνο με 20ppm.

Με τη χρήση της μεθόδου Folin-Ciocalteu παρατηρούνται κάποιες διαφορές ως προς την κατάταξη των οίνων σε σύγκριση με τα αποτελέσματα του ΔΦΟ (Διάγραμμα 24). Οι διαφορές αυτές μπορεί να οφείλονται σε ενώσεις όπως τα κινναμωμικά οξέα και οι χαλκόνες, που δεν παρουσιάζουν μέγιστη απορρόφηση στα 280nm (μέθοδος ΔΦΟ) και άρα δεν προσμετρώνται από την μέθοδο του ΔΦΟ, ενώ η μέθοδος του Folin-Ciocalteu υπολογίζει και τις συγκεκριμένες φαινολικές ενώσεις.

Ολικές Τανίνες με τη μέθοδο Ribéreau-Gayon & Stonestreet (1966)

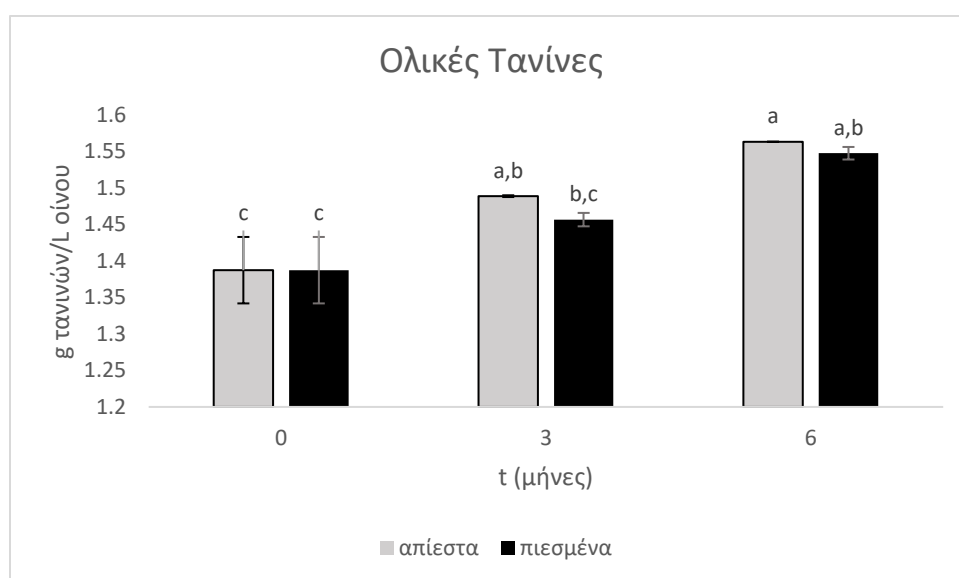


Διάγραμμα 28. Ολικές τανίνες στα δείγματα οίνου («πιεσμένα» και «απίεστα») μετά από τρεις μήνες αποθήκευσης. Οι μπάρες δείχνουν το $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στα δείγματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).



Διάγραμμα 29. Ολικές τανίνες στα δείγματα οίνου («πιεσμένα» και «απίεστα») μετά από έξι μήνες αποθήκευσης. Οι μπάρες δείχνουν το $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στα δείγματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

Στο Διάγραμμα 28 και 29 απεικονίζονται οι ολικές τανίνες των «πιεσμένων» και «απίεστων» οίνων στους τρεις και στους έξι μήνες αντίστοιχα. Στους τρεις μήνες, ο «πιεσμένος» οίνος με 60ppm SO₂ εμφανίζει τις περισσότερες ολικές τανίνες και ο «πιεσμένος» οίνος με 0ppm SO₂ τις λιγότερες. Ωστόσο τα μόνα δείγματα που επέδειξαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ «πιεσμένου» και «απίεστου» ήταν τα δείγματα με 20ppm SO₂. Εξετάζοντας τα επιμέρους δείγματα μετά από έξι μήνες, δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά στις ολικές τανίνες. Η υψηλότερη τιμή καταγράφηκε στον «απίεστο» οίνο 80ppm και η χαμηλότερη στον «απίεστο» οίνο με 0ppm SO₂.

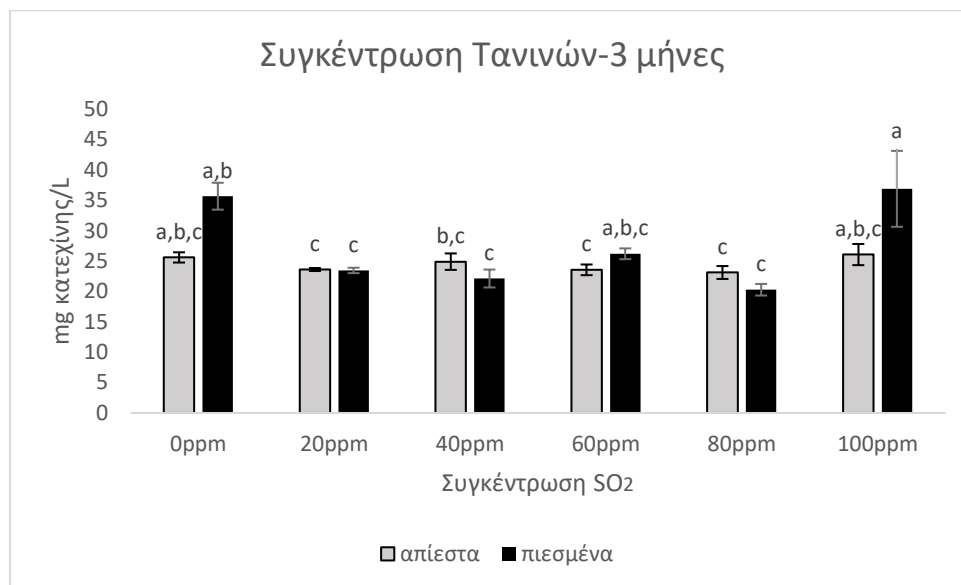


Διάγραμμα 30. Εξέλιξη των ολικών τανινών σε διάστημα έξι μηνών. Οι μπάρες δείχνουν το $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στα δείγματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

Στο Διάγραμμα 30 παρατηρούμε συνολικά την εξέλιξη των «πιεσμένων» και «απίεστων» οίνων μέσα στον διάστημα των έξι μηνών. Μέσα στον χρόνο παρατηρούνται μικρές διαφορές μεταξύ των «πιεσμένων» και «απίεστων» οίνων και δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ούτε μετά από έξι μήνες. Επίσης παρατηρείται μια ανοδική πορεία στην τιμή των ολικών τανινών σε όλα τα δείγματα μέσα στο χρονικό διάστημα των έξι μηνών.

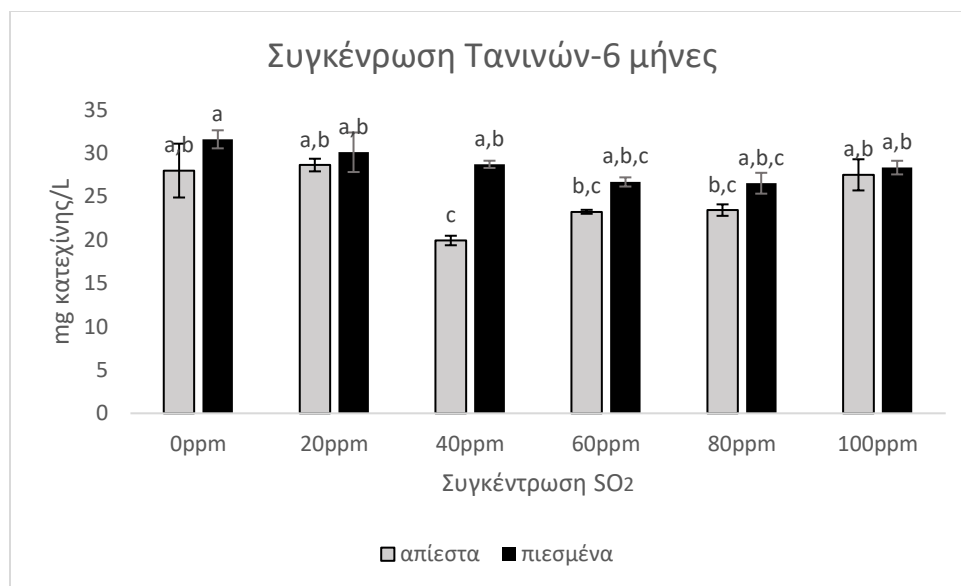
Τανίνες με τη μέθοδο Harbertson (BSA)

Στο Διάγραμμα 31 και στο Διάγραμμα 32, παρατίθενται οι συγκεντρώσεις των τανινών των «πιεσμένων» και «απίεστων» οίνων με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις SO₂ μετά από τρείς και έξι μήνες αντίστοιχα.



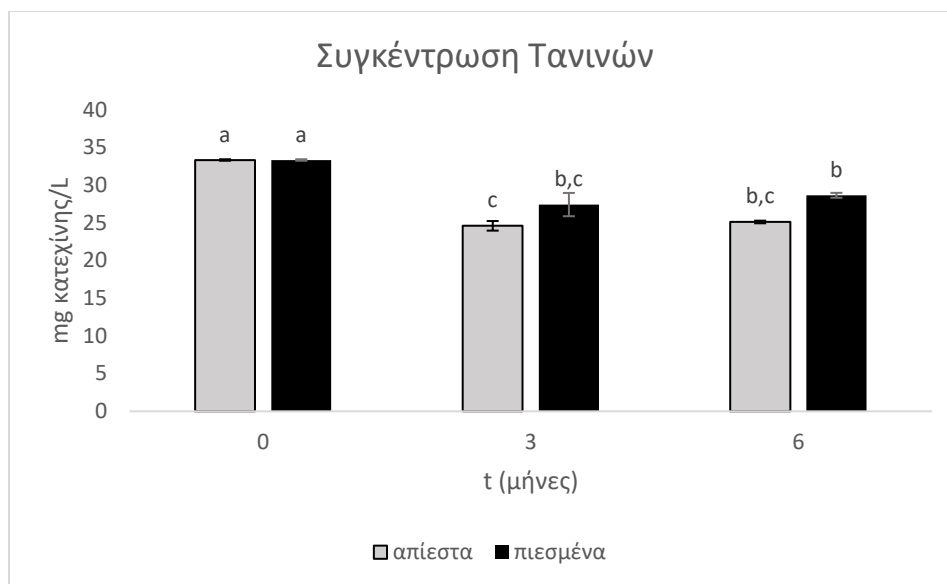
Διάγραμμα 31. Συγκέντρωση τανινών (μέθοδος Harbertson), εκφρασμένη σε mg κατεχίνης ανά λίτρο οίνου, των «πιεσμένων» και «απίεστων» οίνων με διαφορετικές συγκεντρώσεις SO₂ μετά από 3 μήνες. Οι μπάρες δείχνουν το $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στα δείγματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

Για την έκφραση των αποτελεσμάτων της μεθόδου Harbertson (BSA) σε mg κατεχίνης ανά λίτρο οίνου, χρησιμοποιήθηκε πρότυπη ευθεία γνωστών συγκεντρώσεων κατεχίνης, με εξίσωση $y = 0,0061 \cdot x - 0,0257$ ($R^2 = 0,9966$). Η μέγιστη συγκέντρωση τανινών σημειώνεται στον «πιεσμένο» οίνο με 100ppm SO₂ με έποντα τον «πιεσμένο» οίνο με 0ppm SO₂. Η χαμηλότερη συγκέντρωση σύμφωνα με τη μέθοδο παρατηρήθηκε στον «πιεσμένο» οίνο με συγκέντρωση SO₂ 80ppm. Μεταξύ τους τα επιμέρους «πιεσμένα» και «απίεστα» δείγματα δεν διέφεραν στατιστικά.



Διάγραμμα 32. Συγκέντρωση τανινών (μέθοδος Harbertson), εκφρασμένη σε mg κατεχίνης ανά λίτρο οίνου, των «πιεσμένων» και «απίεστων» οίνων με διαφορετικές συγκεντρώσεις SO₂ μετά από 6 μήνες. Οι μπάρες δείχνουν το $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στα δείγματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

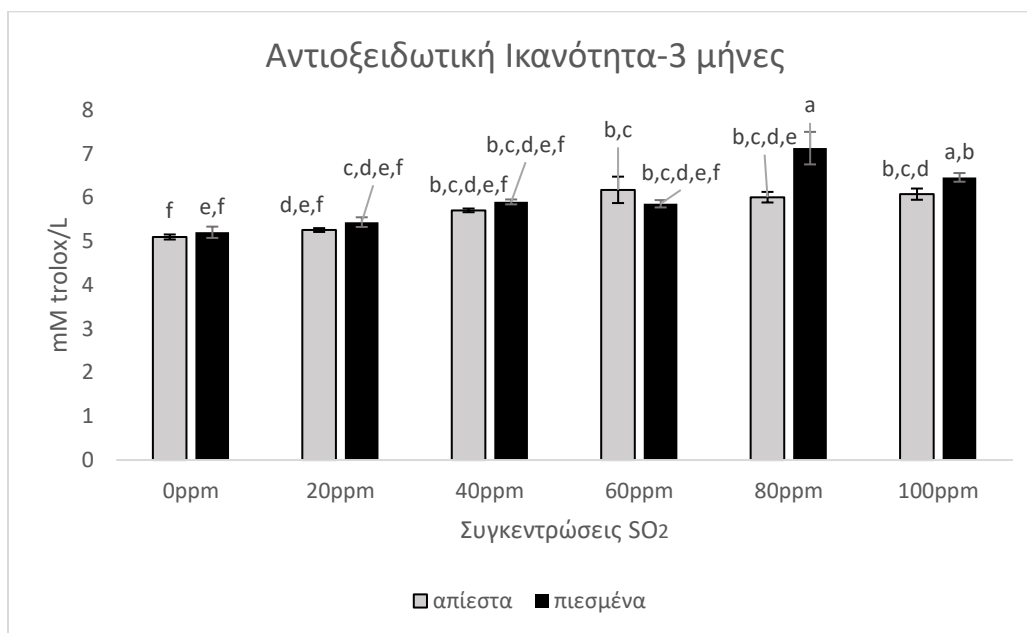
Εξετάζοντας τη συγκέντρωση των τανινών δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ «πιεσμένων» και «απίεστων» δειγμάτων, ούτε μετά από 6 μήνες (Διάγραμμα 32). Μοναδική εξαίρεση αποτελούν τα δείγματα με 40 ppm τα οποία παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά στον 6^ο μήνα. Το δείγμα με 0ppm, που είχε υποβληθεί σε HHP, εμφάνισε την μεγαλύτερη συγκέντρωση τανινών στους έξι μήνες ενώ το δείγμα 40ppm που δεν υποβλήθηκε σε HHP παρουσίασε την χαμηλότερη συγκέντρωση τανινών.



Διάγραμμα 33. Εξέλιξη της συγκέντρωσης των τανινών με τη μέθοδο Harbertson σε διάστημα έξι μηνών. Οι μπάρες δείχνουν το $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στα δείγματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

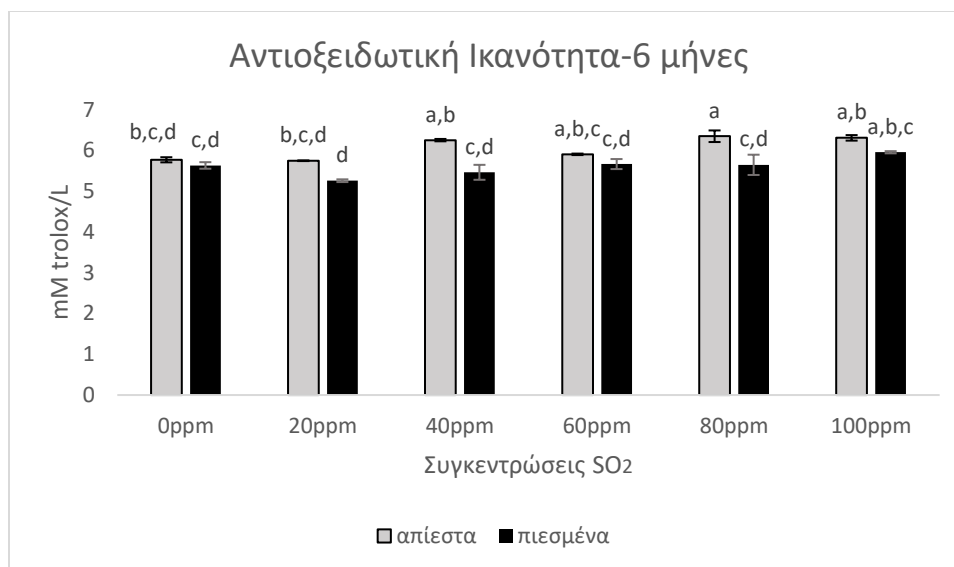
Στο Διάγραμμα 33 παρουσιάζεται η εξέλιξη της συγκέντρωσης των τανινών με τη μέθοδο Harbertson σε χρονικό διάστημα έξι μηνών και οι διαφορές που έφεραν τα «πιεσμένα» με τα «απίεστα» δείγματα. Παρατηρείται ότι η εφαρμογή της HHP επέφερε στα δείγματα μια ελαφρώς αυξημένη συγκέντρωση τανινών σε σχέση με τα δείγματα που δεν υποβλήθηκαν σε HHP στους τρεις και τους έξι μήνες. Η συγκέντρωση των τανινών στον χρόνο 0 παρουσιάστηκε υψηλότερη και στους δύο τύπους δειγμάτων, σε σχέση με τις επόμενες δύο δειγματοληψίες (3 και 6 μήνες). Ωστόσο, και στις τρεις δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν στο διάστημα των έξι μηνών, η HHP δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των, επεξεργασμένων με HHP και μη, δειγμάτων.

Αντιοξειδωτική Ικανότητα (DPPH)



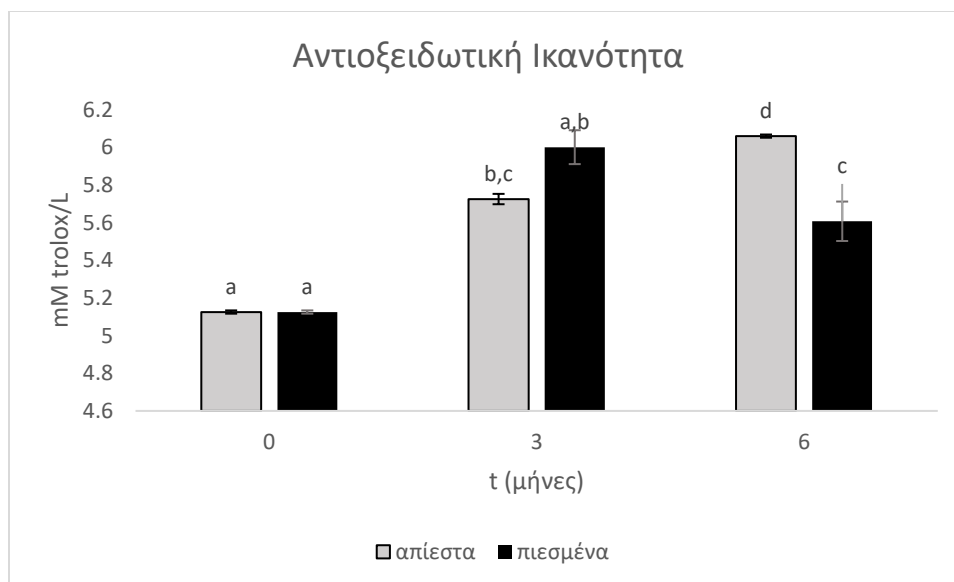
Διάγραμμα 34. Αντιοξειδωτική ικανότητα εκφρασμένη σε mM trolox ανά L οίνου, των «πιεσμένων» και «απίεστων» οίνων με διαφορετικές συγκεντρώσεις SO₂ μετά από 3 μήνες. Οι μπάρες δείχνουν το $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στα δείγματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

Στο Διάγραμμα 34 παρουσιάζονται οι μετρήσεις της αντιοξειδωτικής ικανότητας όλων των οίνων στους τρεις μήνες. Ο «πιεσμένος» οίνος με 80ppm SO₂ εμφανίζει την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα για το συγκεκριμένο χρόνο μέτρησης, ενώ παράλληλα παρουσιάζει στατιστικά σημαντικές διαφορές με τον αντίστοιχο «απίεστο» οίνο (80ppm). Η χαμηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα απαντά στον «απίεστο» οίνο 0ppm SO₂.



Διάγραμμα 35. Αντιοξειδωτική ικανότητα εκφρασμένη σε mM trolox ανά L οίνου, των «πιεσμένων» και «απίεστων» οίνων με διαφορετικές συγκεντρώσεις SO₂ μετά από 6 μήνες. Οι μπάρες δείχνουν το $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στα δείγματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

Στην δειγματοληψία που έλαβε χώρα στους έξι μήνες, οι οίνοι με 40 και 80ppm SO₂ παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ «πιεσμένων» και «απίεστων» δειγμάτων. Οι «απίεστοι» οίνοι όλων των συγκεντρώσεων εμφανίζουν υψηλότερες τιμές αντιοξειδωτικής ικανότητας. Η χαμηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα απαντά στον «πιεσμένο» οίνο με 20ppm SO₂, ενώ η υψηλότερη στον «απίεστο» οίνο 80ppm.



Διάγραμμα 36. Η πορεία της αντιοξειδωτικής ικανότητας, εκφρασμένη σε mM Trolox ανά L οίνου των «πιεσμένων» και «απίεστων» δειγμάτων οίνου στο διάστημα των έξι μηνών. Οι μπάρες δείχνουν το $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στα δείγματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

Στο Διάγραμμα 36 απεικονίζεται πως κυμαίνονται οι τιμές της αντιοξειδωτικής ικανότητας στις τρεις δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν στο διάστημα των έξι μηνών. Η αντιοξειδωτική ικανότητα των «απίεστων» οίνων παρουσιάζει μια ανοδική πορεία μέσα στον χρόνο, και ενώ φαίνεται ότι οι «πιεσμένοι» οίνοι ακολουθούν αυτήν την ίδια ανοδική πορεία μέχρι τους τρεις μήνες, εν τέλει στους έξι μήνες η αντιοξειδωτική τους ικανότητα μειώνεται, εμφανίζοντας στατιστικά σημαντικές διαφορές από τους «απίεστους». Πιθανόν η μείωση που παρατηρείται στην αντιοξειδωτική ικανότητα των «πιεσμένων» οίνων μετά από τους έξι μήνες αποθήκευσης να οφείλεται στον πολυμερισμό των φαινολικών ενώσεων, αντιδράσεις οι οποίες επιταχύνονται με την εφαρμογή της υψηλής υδροστατικής πίεσης (Santos *et al.*, 2012; Tao *et al.*, 2012).

Ανθοκυάνες με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

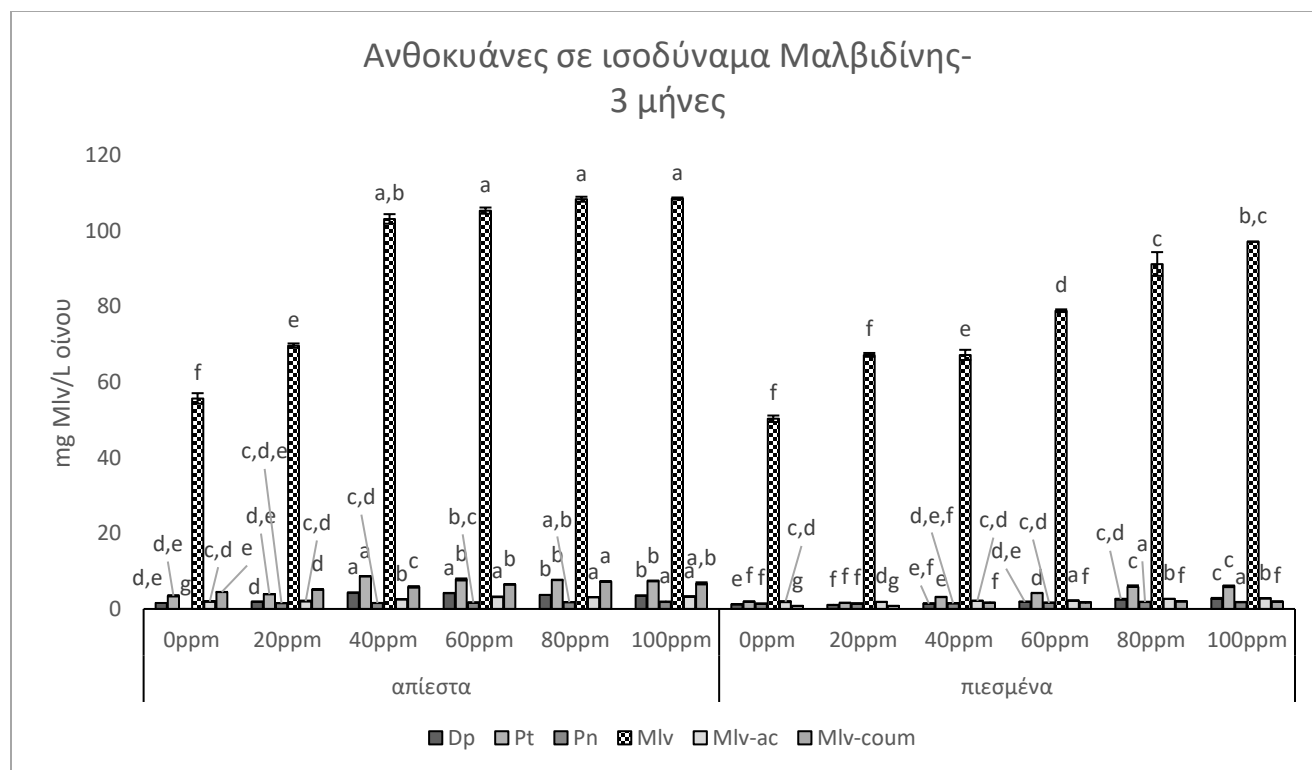
Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 8) παρατίθενται οι τιμές των ανθοκυανών που λήφθηκαν κατά την πρώτη δειγματοληψία. Στην αρχή της αποθήκευσης δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές μεταξύ των «πιεσμένων» και «απίεστων» δειγμάτων οίνου, υποδεικνύοντας ότι η HHP αμέσως μετά την εφαρμογή της δεν επηρεάζει τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του οίνου (Santos *et al.*,

2016). Επομένως η πρώτη δειγματοληψία των ανθοκυανών με HPLC πραγματοποιήθηκε σε έξι μόνο δείγματα.

Πίνακας 8. Οι ανθοκυάνες των οίνων στην πρώτη δειγματοληψία (χρόνος 0). Όπου: Dp, 3-O-μονογλυκοζίτης της δελφινιδίνης, Pt, 3-O-μονογλυκοζίτης της πετουινιδίνης, Pn, 3-O-μονογλυκοζίτης της πεονιδίνης; Mlv, 3-O-μονογλυκοζίτης της μαλβιδίνης, Mlv-ac, οξικός εστέρας του 3-O-μονογλυκοζίτη της μαλβιδίνης, Mlv-coum, κουμαρικός εστέρας του 3-O-μονογλυκοζίτη της μαλβιδίνης.

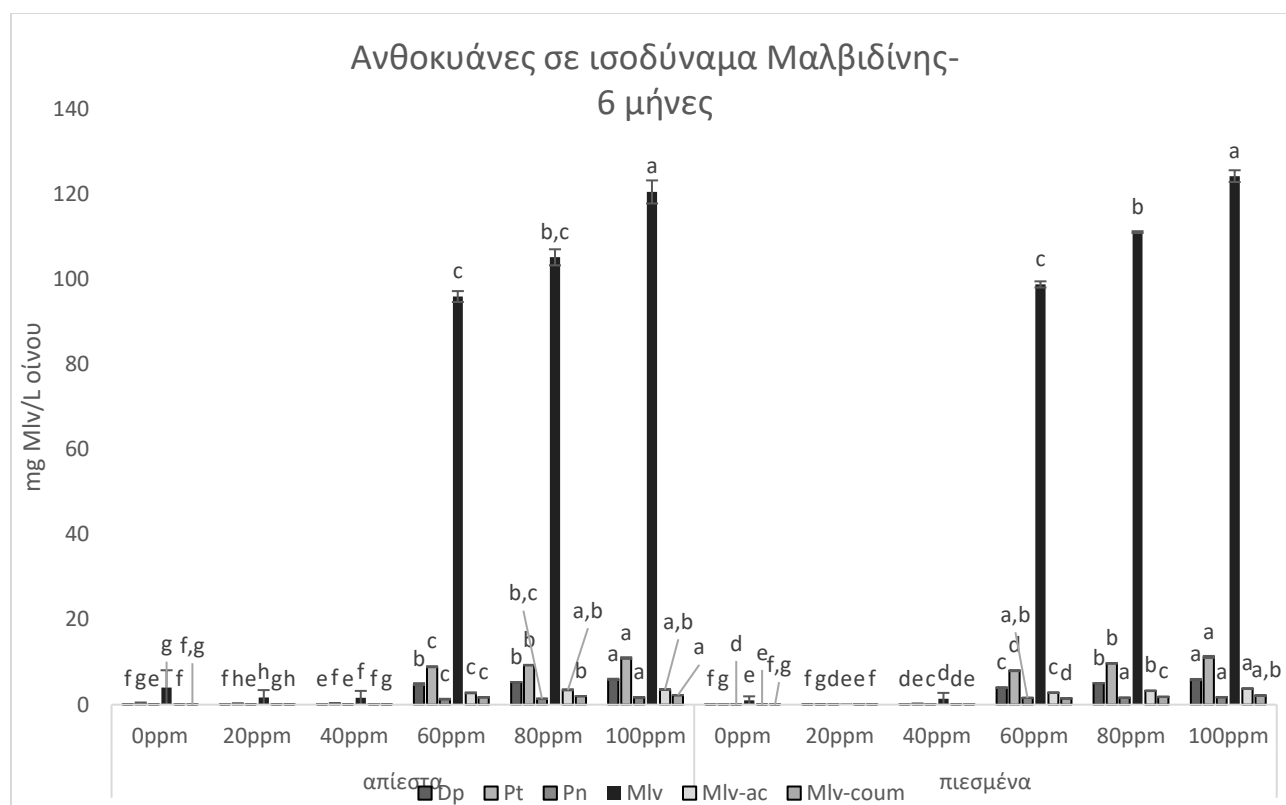
Συγκεντρώσεις SO ₂ δειγμάτων	Dp	Pt	Pn	Mlv	Mlv-ac	Mlv-coum
0ppm	5.0991±0.0390	12.0624±0.2257	3.0886±0.1105	175.772±0.196	5.3172±0.0138	4.4927±0.0055
20ppm	7.8271±0.1185	16.4238±0.2101	2.8634±0.1436	198.874±0.335	5.8330±0.0455	5.1547±0.0742
40ppm	10.5724±0.1188	21.0599±0.3818	3.4109±0.1449	233.927±0.040	6.8977±0.2323	5.8291±0.2050
60ppm	12.0802±0.3137	24.5241±0.0904	3.3748±0.1209	257.725±0.396	7.7345±0.0069	6.5030±0.0580
80ppm	12.5808±0.0086	25.6109±0.1101	4.0103±0.0699	275.217±0.604	8.3413±0.1166	7.2571±0.0432
100ppm	12.7867±0.2658	26.1001±0.3059	3.5891±0.1501	286.263±0.946	8.0267±0.1580	6.7692±0.2820

Στα Διάγραμμα 37 που ακολουθεί, παρουσιάζονται οι ανθοκυάνες των «πιεσμένων» και «απίεστων» οίνων, με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις SO₂, εκφρασμένες σε mg μαλβιδίνης ανά λίτρο οίνου στους τρεις μήνες αποθήκευσης. Ο μονογλυκοζίτης της μαλβιδίνης (Mlv) ήταν η κυρίαρχη ανθοκυάνη σε όλους τους οίνους και η υψηλότερη συγκέντρωσή της, ανάμεσα στα δείγματα, σημειώνεται στον «απίεστο» οίνο 100ppm, ενώ η χαμηλότερη συγκέντρωσή της, στον «πιεσμένο» οίνο με μηδενική προσθήκη θειώδους. Οι συγκεντρώσεις 60, 80 και 100ppm παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ «πιεσμένων» και «απίεστων» δειγμάτων όσον αφορά την μαλβιδίνη και τα «απίεστα» εμφανίζουν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις.



Διάγραμμα 37. Ανθοκυάνες με HPLC εκφρασμένες σε ισοδύναμα μαλβιδίνης των «πιεσμένων» και «απίεστων» οίνων με διαφορετικές συγκεντρώσεις SO₂. Οι μπάρες δείχνουν το $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στα δείγματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$). Στο υπόμνημα :Dp, 3-O-μονογλυκοζίτης της δελφινιδίνης, Pt, 3-O-μονογλυκοζίτης της πετουινιδίνης, Pn, 3-O-μονογλυκοζίτης της πεονιδίνης; Mlv, 3-O-μονογλυκοζίτης της μαλβιδίνης, Mlv-ac, οξικός εστέρας του 3-O-μονογλυκοζίτη της μαλβιδίνης, Mlv-coum, κουμαρικός εστέρας του 3-O-μονογλυκοζίτη της μαλβιδίνης.

Δεύτερη κυρίαρχη ανθοκυάνη στους οίνους ήταν ο μονογλυκοζίτης της πετουινιδίνης (Pt) και εν συνεχεία ο κουμαρικός εστέρας της μαλβιδίνης (MLv-coum). Μέγιστη συγκέντρωση του Pt απαντά στον «απίεστο» οίνο της συγκέντρωσης 40ppm και ελάχιστες στους «πιεσμένους» οίνους των 0 και 20ppm SO₂, ενώ μέγιστη συγκέντρωση του MLv-coum παρουσιάζεται στον «απίεστο» οίνο των 80ppm και ελάχιστες στους «πιεσμένους» οίνους των 0 και των 20ppm. Και οι δύο αυτές ανθοκυάνες εμφανίζονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στους «απίεστους» οίνους με στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ «πιεσμένων» και «απίεστων». Οι ανθοκυάνες με τις μικρότερες συγκεντρώσεις είναι ο οξικός εστέρας του μονογλυκοζίτη της μαλβιδίνης, ο μονογλυκοζίτης της δελφινιδίνης (Dp) και ο μονογλυκοζίτης της πεονιδίνης (Pn). Σε κανέναν οίνο δεν ανιχνεύτηκε μονογλυκοζίτης της κυανιδίνης. Όλες οι μονομερείς ανθοκυάνες, σε όλους τους «πιεσμένους» οίνους εμφανίζουν χαμηλότερες συγκεντρώσεις, συγκριτικά με τους «απίεστους» οίνους.



Διάγραμμα 38. Ανθοκυάνες με HPLC εκφρασμένες σε ισοδύναμα μαλβιδίνης των «πιεσμένων» και «απίεστων» οίνων με διαφορετικές συγκεντρώσεις SO₂. Οι μπάρες δείχνουν το $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στα δείγματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$). Στο υπόμνημα :Dp, 3-O-μονογλυκοζίτης της δελφινιδίνης, Pt, 3-O-μονογλυκοζίτης της πετουινιδίνης, Pn, 3-O-μονογλυκοζίτης της πεονιδίνης; Mlv, 3-O-μονογλυκοζίτης της μαλβιδίνης, Mlv-ac, οξικός εστέρας του 3-O-μονογλυκοζίτη της μαλβιδίνης, Mlv-coum, κουμαρικός εστέρας του 3-O-μονογλυκοζίτη της μαλβιδίνης.

Στο παραπάνω Διάγραμμα 38, απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις των ανθοκυανών των «απίεστων» και «πιεσμένων» οίνων των διαφορετικών συγκεντρώσεων SO₂, στους έξι μήνες, εκφρασμένοι σε mg μαλβιδίνης ανά λίτρο οίνου. Και σε αυτούς τους οίνους ο μονογλυκοζίτης της μαλβιδίνης (MLv) είναι η κυρίαρχη ανθοκυάνη, και εμφανίζει μέγιστη συγκέντρωση στον «πιεσμένο» οίνο 100ppm και με μικρή διαφορά έπεται ο «απίεστος» οίνος 100ppm, ενώ ελάχιστη συγκέντρωση εμφανίζει στους «πιεσμένους» οίνους με 0 και 20ppm SO₂. Ο μονογλυκοζίτης της πετουινιδίνης (Pt) και ο μονογλυκοζίτης της δελφινιδίνης (Dp) είχαν την αμέσως επόμενη μεγαλύτερη συνεισφορά στο ανθοκυανικό προφίλ όλων των οίνων που μελετήθηκαν. Επίσης τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε όλους τους οίνους είχαν ο οξικός εστέρας της μαλβιδίνης (MLv-ac), η πεονιδίνη (Pn) και ο κουμαρικός εστέρας της μαλβιδίνης (MLv-coum). Οι συγκεντρώσεις 0, 20 και 40ppm SO₂ εμφανίζουν πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις μονομερών ανθοκυανών στους έξι μήνες, ανεξαρτήτου πίεσης. Αυτό μπορεί

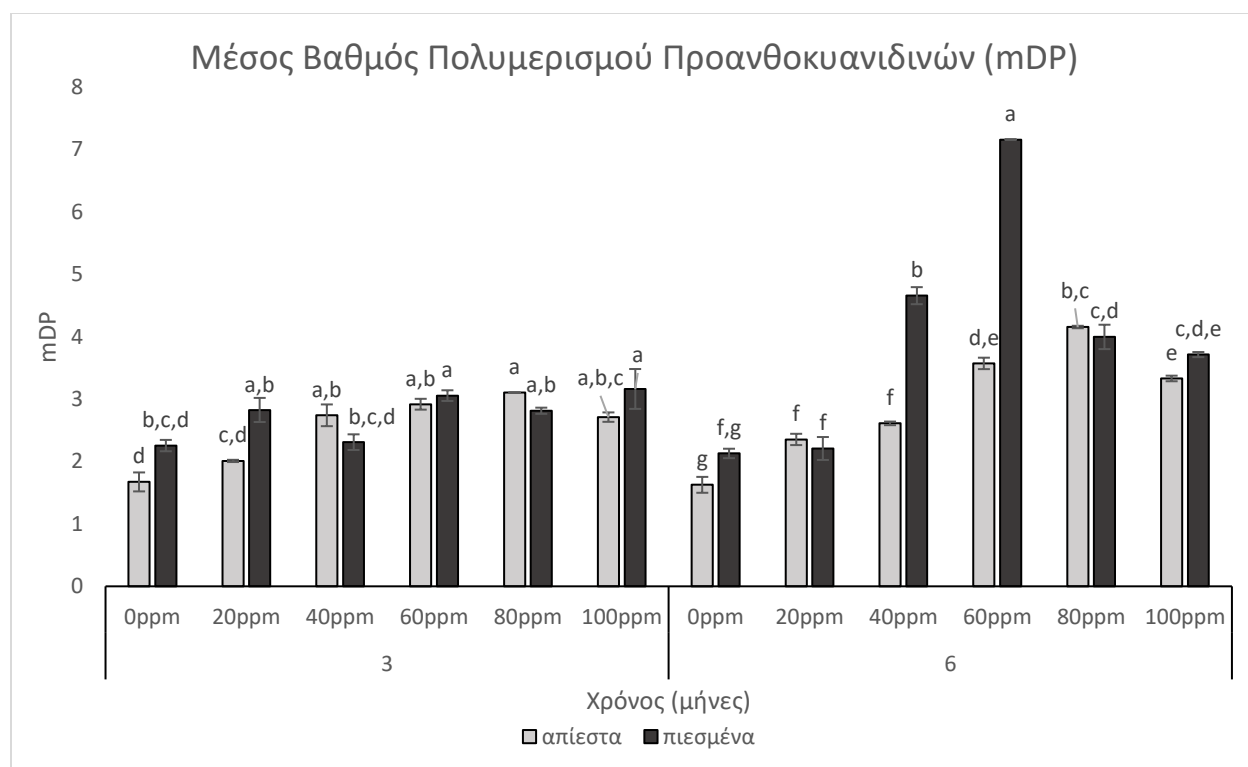
να οφείλεται σε χημική οξείδωση των ανθοκυανών λόγω μειωμένης συγκέντρωσης SO_2 , ο οποίος προστατεύει από την οξείδωση των φαινολικών. Συνολικά, όλοι οι οίνοι παρουσίασαν μείωση στην ολική περιεκτικότητα σε μονομερείς ανθοκυάνες μετά από έξι μήνες αποθήκευσης. Αυτή η μείωση πραγματοποιείται κυρίως λόγω της συμμετοχής των ανθοκυανών σε πολυάριθμες αντιδράσεις συμπύκνωσης καθώς και σε άλλες αντιδράσεις υδρόλυσης και αποικοδόμησης σε μικρότερο βαθμό (Santos *et al.*, 2018).

Μέσος βαθμός πολυμερισμού τανινών (mDP) με μέθοδο υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)

Στον Πίνακα 9 παρουσιάζεται ο μέσος βαθμός πολυμερισμού τανινών (mDP) των δειγμάτων στην πρώτη δειγματοληψία που πραγματοποιήθηκε (χρόνος 0). Στην αρχή της αποθήκευσης τα «πιεσμένα» και τα «απίεστα» δείγματα δεν παρουσιάζουν διαφορές (Santos *et al.*, 2016), συνεπώς ο mDP υπολογίστηκε σε έξι δείγματα.

Πίνακας 9. Ο μέσος βαθμός πολυμερισμού (mDP) των δειγμάτων στον χρόνο 0. Με $\pm$ υποδεικνύεται στο τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών.

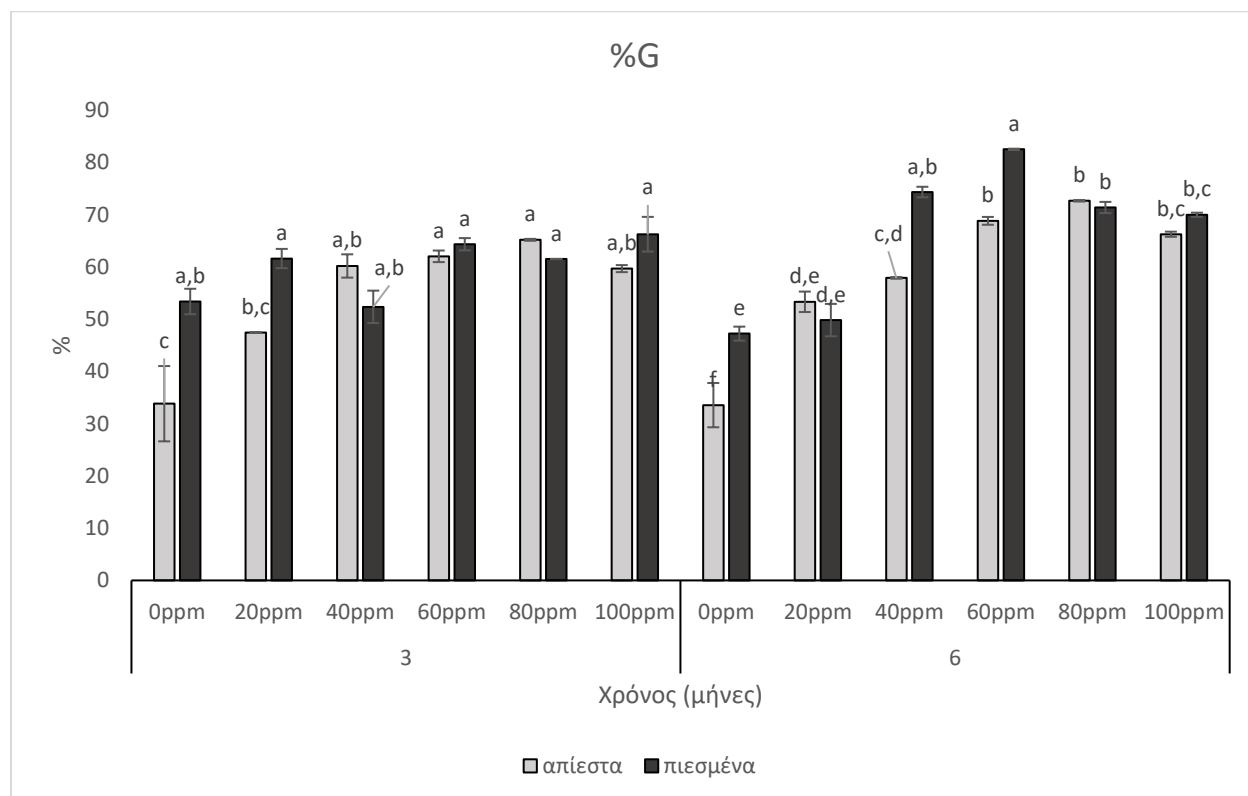
Δείγματα (Διαφορετικές συγκεντρώσεις SO_2)	mDP
0ppm	1.63531 $\pm$ 0.03369
20ppm	1.78055 $\pm$ 0.05171
40ppm	1.62875 $\pm$ 0.03202
60ppm	1.93609 $\pm$ 0.04303
80ppm	1.94659 $\pm$ 0.13716
100ppm	1.98639 $\pm$ 0.026



Διάγραμμα 39. Μέσος βαθμός πολυμερισμού (mDP) των προανθοκυανιδινών στους «πιεσμένους» και «απίεστους» οίνους με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις θειώδους μετά από την πάροδο 3 και 6 μηνών. Οι μπάρες δείχνουν το $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στους οίνους διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

Στο Διάγραμμα 39 απεικονίζεται ο μέσος βαθμός πολυμερισμού προανθοκυανιδινών (mDP) των «πιεσμένων» και «απίεστων» οίνων με 0, 20, 40, 60, 80 και 100ppm SO₂ στους τρεις και έξι μήνες. Ο υψηλότερος mDP στους τρεις μήνες παρουσιάζεται στον «πιεσμένο» οίνο με 100ppm SO₂ ενώ ο χαμηλότερος στον «απίεστο» οίνο με μηδενική προσθήκη θειώδους. Μετά από έξι μήνες ο «πιεσμένος» οίνος με 60ppm εμφανίζει τον μεγαλύτερο mDP ενώ ο χαμηλότερος απαντά πάλι στο «απίεστο» δείγμα με 0ppm SO₂. Τα δείγματα με συγκεντρώσεις 60, 80 και 100ppm SO₂, «πιεσμένα» και «απίεστα» παρουσιάζουν αύξηση στον βαθμό πολυμερισμού από τους τρεις μέχρι τους έξι μήνες. Στους τρεις μήνες δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των «πιεσμένων» και «απίεστων» δειγμάτων, ενώ στους έξι μήνες οι «απίεστοι» και «πιεσμένοι» οίνοι με 40 και 60ppm SO₂ διαφέρουν μεταξύ τους με στατιστικά σημαντική διαφορά. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, ο mDP έχει άμεση συσχέτιση με την στυπτικότητα. Ένας οίνος με mDP μεταξύ 2 και 4 χαρακτηρίζεται ελαφρώς στυπτικός, ενώ όταν ο mDP είναι μεγαλύτερος του 4 ο οίνος θεωρείται αρκετά τανικός (Chira *et al.*, 2011). Επιπλέον, ο mDP εμφανίζεται πολύ

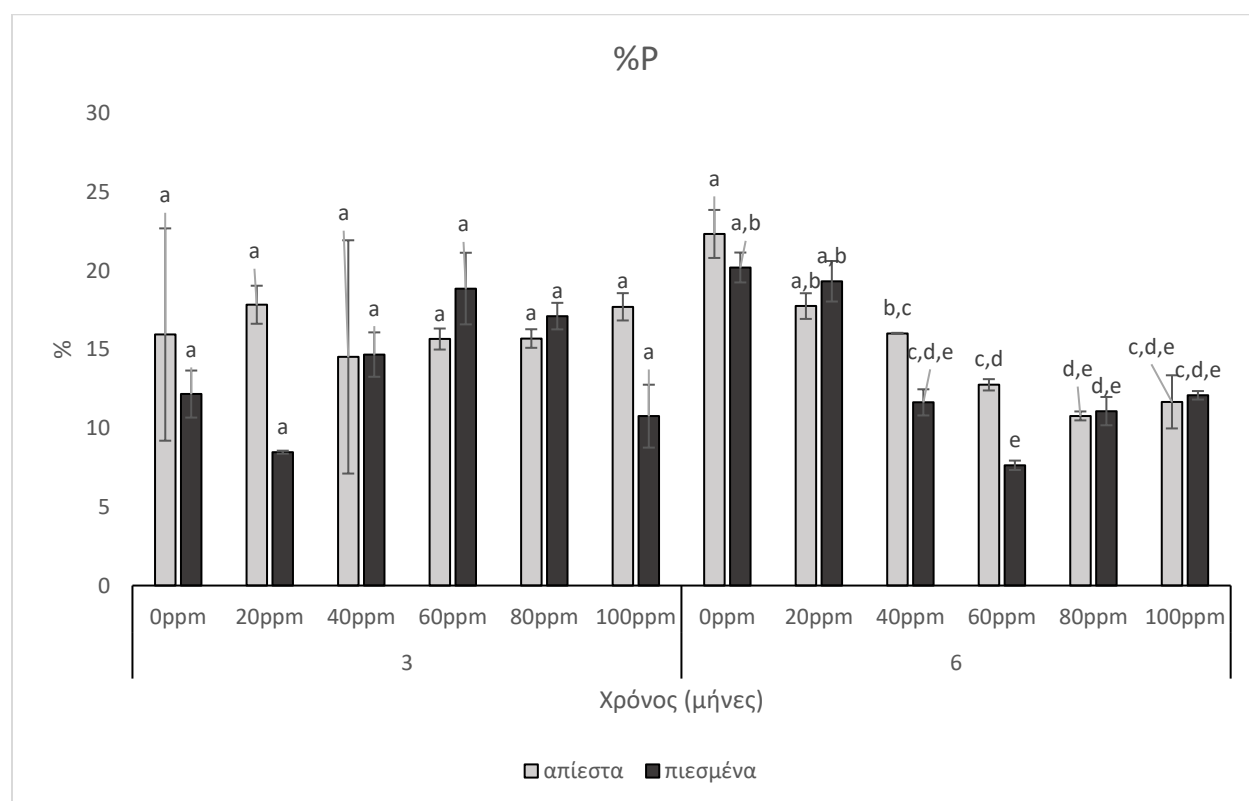
αυξημένος στους «πιεσμένους» οίνους 40, 60 και 100 στους έξι μήνες συγκριτικά με τις αρχικές μετρήσεις, πιθανόν λόγω εφαρμογής της υψηλής πίεσης, η οποία φαίνεται να αυξάνει τις αντιδράσεις συμπύκνωσης των φαινολικών ενώσεων κατά την παλαίωση του οίνου, σχηματίζοντας ενώσεις με μεγαλύτερο βαθμό πολυμερισμού, αποτέλεσμα που γίνεται αντιληπτό μετά τους έξι μήνες (Santos *et al.*, 2013, Santos *et al.*, 2016, Santos *et al.*, 2018).



Διάγραμμα 40. Ποσοστό εστεροποίησης (%G) των τανινών στους «απίεστους» και «πιεσμένους» οίνους των διαφορετικών συγκεντρώσεων SO₂ στους 3 και στους 6 μήνες. Οι μπάρες δείχνουν το $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στους οίνους διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

Στο Διάγραμμα 40, παρουσιάζεται το ποσοστό εστεροποίησης των τανινών με γαλλικό οξύ (%G) στους τρεις και στους έξι μήνες για όλους τους οίνους. Παρατηρούνται ιδιαίτερα υψηλές τιμές εστεροποίησης με γαλλικό οξύ. Στους τρεις μήνες, ο «πιεσμένος» οίνος 60ppm φαίνεται να εμφανίζει το υψηλότερο ποσοστό (66.3%) χωρίς να διαφέρει στατιστικά από τον αντίστοιχο «απίεστο» οίνο. Το χαμηλότερο ποσοστό απαντά στον «απίεστο» οίνο με 0 προσθήκη SO₂ (33.8%), ο οποίος διαφέρει από τον αντίστοιχο «πιεσμένο» οίνο με στατιστικά σημαντική

διαφορά. Όσον αφορά τους έξι μήνες, η υψηλότερη τιμή παρατηρείται στον «πιεσμένο» οίνο με 60ppm (82.5%), ο οποίος διαφέρει με στατιστικά σημαντική διαφορά με τον αντίστοιχο «απίεστο», και η χαμηλότερη τιμή καταγράφεται στον «απίεστο» οίνο με 0ppm (33.5%), εμφανίζοντας στατικά σημαντική διαφορά από τον αντίστοιχο «πιεσμένο». Με την πάροδο του χρόνου, από τους τρεις μέχρι τους έξι μήνες, το ποσοστό εστεροποίησης παρουσιάζει αύξηση στους οίνους με 60, 80 και 100ppm τόσο στους «πιεσμένους» όσο και στους «απίεστους». Σε αρκετές μελέτες οι τιμές %G έχουν συσχετιστεί θετικά με την αντιλαμβανόμενη στυπτικότητα (Chira *et al.*, 2011; Čurko *et al.*, 2014), ενώ άλλες μελέτες είτε αναφέρουν απουσία συσχέτισης (Kyrleou *et al.*, 2016; Wollmann & Hofmann, 2013), είτε αρνητική συσχέτιση (Chira *et al.*, 2015).

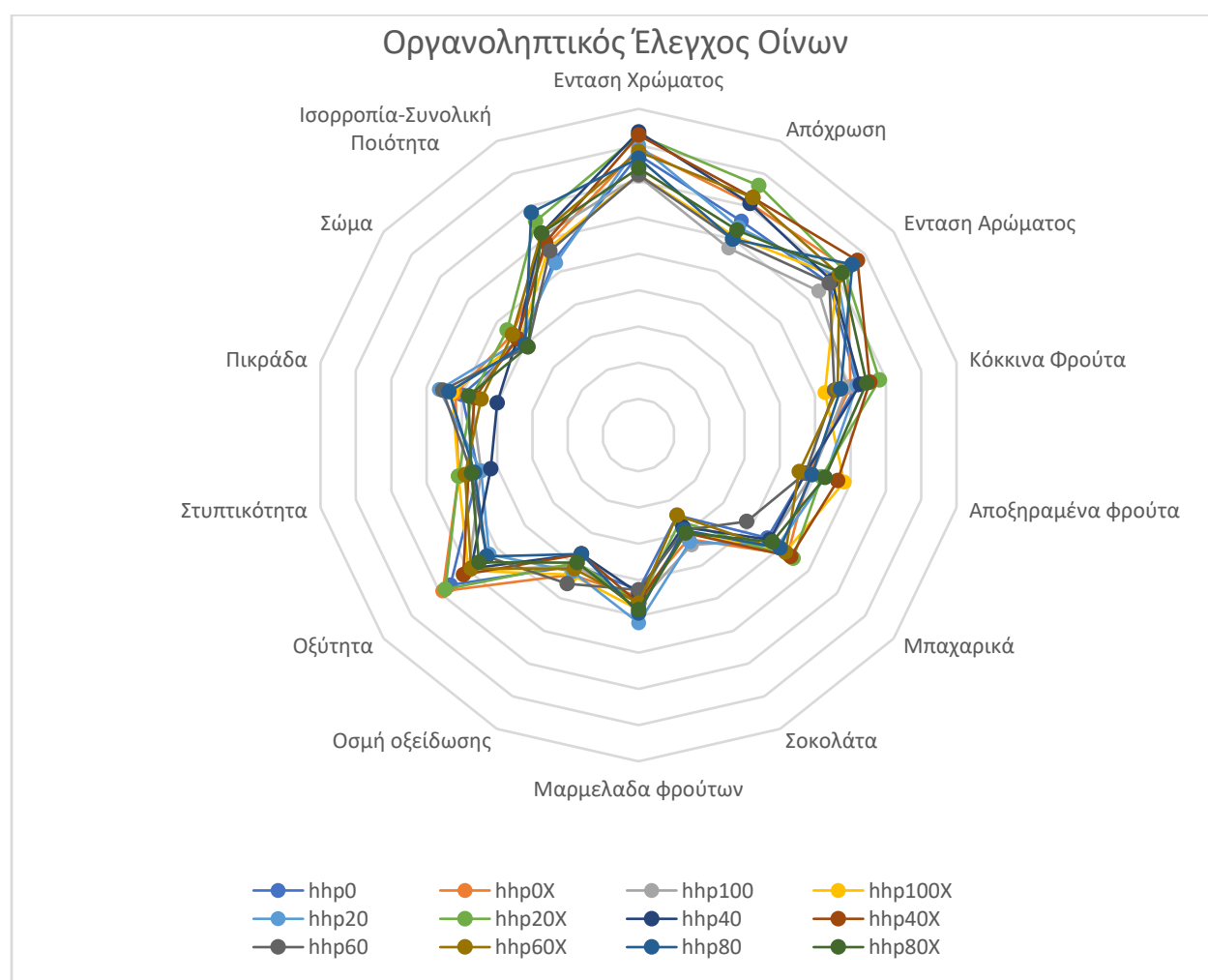


Διάγραμμα 41. Ποσοστό προδελφινιδινών (%P) στους «απίεστους» και «πιεσμένους» οίνους των διαφορετικών συγκεντρώσεων SO₂ στους 3 και στους 6 μήνες. Οι μπάρες δείχνουν το $\pm$ τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στους οίνους διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

Στο παραπάνω Διάγραμμα 41, παρατίθενται το ποσοστό προδελφινιδινών (%P) όλων των οίνων όπως καταγράφηκαν στους τρεις και στους έξι μήνες. Αρχικά, στους τρεις μήνες παρατηρείται

στατιστική ομοιογένεια σε όλα τα δείγματα. Στους έξι μήνες παρατηρείται το υψηλότερο ποσοστό στον «απίεστο» οίνο με 0ppm SO₂ ενώ το χαμηλότερο εμφανίζεται στον «πιεσμένο» οίνο με 60ppm ο οποίος διαφέρει στατιστικά από τον αντίστοιχο «απίεστο». Στην περίπτωση της επιγαλλοκατεχίνης (EGC), που αφορά το %P, οι περισσότερες μελέτες συμφωνούν ότι συσχετίζεται αρνητικά με την στυπτικότητα (Chira *et al.*, 2015 Kyraleou *et al.*, 2016, Quijada-Morin *et al.*, 2012, Vidal *et al.*, 2003).

Οργανοληπτικός Έλεγχος



Διάγραμμα 42. Αποτελέσματα οργανοληπτικού ελέγχου των «πιεσμένων» και «απίεστων» οίνων στους 6 μήνες.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα δείγματα τα οποία δεν υποβλήθηκαν σε υψηλή υδροστατική πίεση χαρακτηρίζονται με ένα X στο τέλος του κωδικοποιημένου ονόματός τους. Σύμφωνα με τους δοκιμαστές, η υψηλότερη ένταση χρώματος απαντά στον «απίεστο» οίνο hhp40X και η χαμηλότερη στον «απίεστο» οίνο hhp100X, χωρίς να εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά. Οι δοκιμαστές δεν κατάφεραν αν ανιχνεύσουν τις στατιστικές διαφορές που εμφάνισαν τα «πιεσμένα» και «απίεστα» δείγματα των συγκεντρώσεων 20 και 60rpm που φάνηκαν με την φωτομετρική μέθοδο Glories Y. (1984) (Διάγραμμα 15). Όσον αφορά την απόχρωση, ο οίνος hhp100 βαθμολογήθηκε χαμηλότερα ενώ ο οίνος hhp20X υψηλότερα με στατιστικά σημαντική διαφορά. Παράλληλα, στατιστικά σημαντικές διαφορές παρουσίασαν και τα δείγματα hhp60 και hhp80 με το δείγμα hhp20X, αποτέλεσμα που ταυτίζεται με το αποτέλεσμα της ανάλυσης της απόχρωσης στους έξι μήνες (Διάγραμμα 18). Ταυτόχρονα οι δοκιμαστές βαθμολόγησαν τον οίνο hhp20X με την υψηλότερη βαθμολογία στα κριτήρια «Κόκκινα Φρούτα» και «Μπαχαρικά» (χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά), ενώ η χαμηλότερη βαθμολογία και στα δύο αυτά κριτήρια απαντά στον οίνο hhp60. Σύμφωνα με το Διάγραμμα 42, στο κριτήριο «Αποξηραμένα Φρούτα» το δείγμα που βαθμολογήθηκε χαμηλότερα ήταν το hhp60X, ενώ εκείνο που βαθμολογήθηκε υψηλότερα ήταν το hhp100X. Το δείγμα hhp60X επίσης έλαβε την χαμηλότερη βαθμολογία στο κριτήριο «Σοκολάτα», με την υψηλότερη βαθμολογία να απαντά στον «πιεσμένο» οίνο hhp100. Για το χαρακτηριστικό «Μαρμελάδα Φρούτων» η χαμηλότερη βαθμολογία δόθηκε στους οίνους hhp0 και hhp60, ενώ για το συγκεκριμένο κριτήριο την υψηλότερη βαθμολογία έλαβε ο οίνος hhp20. Και τα τρία αυτά κριτήρια («Αποξηραμένα Φρούτα», «Σοκολάτα» και «Μαρμελάδα Φρούτων») δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων. Την υψηλότερη βαθμολογία στην οσμή οξείδωσης λαμβάνει ο οίνος hhp60 και τις χαμηλότερες βαθμολογίες έλαβαν τα δείγματα hhp40X, hhp40 και hhp80. Οι δοκιμαστές βρήκαν ως πιο όξινο τον «απίεστο» οίνο hhp0X, με στατιστικά σημαντική διαφορά, ενώ ως λιγότερο όξινο τον «πιεσμένο» οίνο hhp20. Τα τρία «απίεστα» δείγματα hhp0X, hhp20X και hhp100X παρουσιάστηκαν ως τα πιο στυπτικά, σύμφωνα με τους δοκιμαστές, και το δείγμα hhp40 ως το λιγότερο στυπτικό. Τα αποτελέσματα των δοκιμαστών ως προς το κριτήριο της στυπτικότητας, δεν συμφωνούν με αυτά της μεθόδου Harbertson (Διάγραμμα 32) που αποτελεί δείκτη της χημικής στυπτικότητας των οίνων. Επίσης το δείγμα hhp40 ξεχώρισε, λαμβάνοντας την μικρότερη βαθμολογία όσον αφορά την πικράδα, με την υψηλότερη πικράδα να απαντά στο δείγμα hhp20. Τα δείγματα hhp60 και hhp80X χαρακτηρίστηκαν με το πιο υδαρές σώμα, ενώ το πιο πλούσιο

σώμα σύμφωνα με τους δοκιμαστές εμφάνισε ο οίνος hhp20X. Τέλος, ως τον πιο ισορροπημένο γευστικά οίνο, οι δοκιμαστές επέλεξαν τον οίνο hhp80, ενώ για το συγκεκριμένο κριτήριο η χαμηλότερη βαθμολογία δόθηκε στον οίνο hhp20, έχοντας στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Με βάση την ανάλυση των πειραματικών αποτελεσμάτων προκύπτουν τα παρακάτω συμπεράσματα.

Η εφαρμογή HHP δύναται να επιφέρει αλλαγές στην συγκέντρωση του SO₂. Πιο συγκεκριμένα, τα «πιεσμένα» δείγματα σημείωσαν μεγαλύτερη μείωση στον ολικό και τον ελεύθερο θειώδη ανυδρίτη σε σχέση με τα «απίεστα» δείγματα. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με παλαιότερες μελέτες (Santos *et al.*, 2016, Santos *et al.*, 2018) και πιθανόν να σχετίζονται με τις πολύ δραστικές ρίζες που παράγονται κατά την εφαρμογή της HHP, λόγω της υψηλής ενσωμάτωσης οξυγόνου στον οίνο, το οποίο προωθεί τις αντιδράσεις μεταξύ του ελεύθερου SO₂ και των ριζών που σχηματίζονται (Tao *et al.*, 2012). Συνεπώς, η ποσότητα ελεύθερου SO₂ είναι πιθανό να μην καθίσταται επαρκής και οι απαιτήσεις των «πιεσμένων» οίνων για αντιοξειδωτική προστασία που προσφέρει ο SO₂ να αυξάνονται. Το γεγονός αυτό δε βοηθάει στην επίτευξη του τελικού στόχου για μείωση των συγκεντρώσεων του SO₂.

Όσον αφορά την συγκέντρωση των μονομερών ανθοκυανών, οι οίνοι με συγκεντρώσεις 0, 20 και 40ppm SO₂ τόσο στα «πιεσμένα» όσο και στα «απίεστα» δείγματα παρουσίασαν έντονη μείωση αυτής, μετά την πάροδο έξι μηνών. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, αυτό μπορεί να οφείλεται σε χημική οξείδωση των ανθοκυανών λόγω μειωμένης συγκέντρωσης SO₂, ο οποίος προστατεύει από την οξείδωση των φαινολικών. Οι οίνοι με συγκεντρώσεις 60, 80 και 100ppm, ανεξαρτήτου πίεσης, εμφάνισαν υψηλότερες συγκεντρώσεις μονομερών ανθοκυανών συγκριτικά με τις χαμηλές συγκεντρώσεις SO₂. Μια πιθανή εξήγηση αυτού, μπορεί να είναι οι αντιδράσεις που κάνει το SO₂ με τις ανθοκυάνες, και με πολλά άλλα συστατικά, μειώνοντας το ρυθμό πολυμερισμού των φαινολικών ενώσεων, που παρατηρείται συνήθως κατά την παλαίωση του οίνου (Santos *et al.*, 2012).

Ωστόσο, αυτή η διαφορά στην περιεκτικότητα των μονομερών ανθοκυανών μετά το διάστημα των έξι μηνών, που παρουσιάστηκε στους οίνους με χαμηλότερες συγκεντρώσεις SO₂, δεν έγινε αντιληπτή από την μέτρηση της έντασης του χρώματος αλλά αποτυπώθηκε στην μέτρηση της απόχρωσης. Τα συγκεκριμένα δείγματα εμφανίστηκαν με υψηλότερες τιμές έντασης χρώματος, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στο ελαφρώς μικρότερο pH αλλά και στα χαμηλότερα επίπεδα SO₂, ο οποίος αποχρωματίζει τις ανθοκυάνες (Ribéreau-Gayon and Stonestreet, 1965).

Η απόχρωση των «πιεσμένων» οίνων, επίσης στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις SO₂, εμφανίστηκε υψηλότερη, επιβεβαιώνοντας ότι η εφαρμογή της HHP επιταχύνει τις αντιδράσεις συμπύκνωσης των φαινολικών ενώσεων κατά την αποθήκευση του οίνου (Santos *et al.*, 2016). Αξίζει να σημειωθεί ότι η απόχρωση αποτελεί κριτήριο για την οργανοληπτική ποιότητα του οίνου, υποδεικνύοντας ότι ο συνδυασμός της HHP και των συγκεκριμένων συγκεντρώσεων SO₂ ίσως να μην μπορεί να ανταποκριθεί στις απαιτήσεις της αγοράς.

Επιπλέον, όλοι οι «πιεσμένοι» οίνοι, ανεξαρτήτου συγκέντρωσης SO₂, μετά από έξι μήνες αποθήκευσης παρουσίασαν μειωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα. Και πάλι η ερμηνεία του φαινομένου αυτού πιθανόν να εξηγείται μέσω του πολυμερισμού των φαινολικών ενώσεων, οι οποίες επιταχύνονται με την εφαρμογή της υψηλής υδροστατικής πίεσης, οδηγώντας στην μείωση των φαινολικών, και συνεπώς, της αντιοξειδωτικής ικανότητας (Santos *et al.*, 2012; Tao *et al.*, 2012). Με αυτό το δεδομένο, φαίνεται ότι οι οίνοι που έχουν υποβληθεί σε HHP «χάνουν» τη φυσική αντιοξειδωτική προστασία (φαινολικές ενώσεις) που διαθέτουν οι ερυθροί οίνοι και καθίστανται επιρρεπείς στην φυσικοχημική και οργανοληπτική υποβάθμισή τους.

Παρατηρήθηκε άμεση εξάρτηση του μέσου βαθμού πολυμερισμού προανθοκυανιδινών, με την συγκέντρωση του SO₂ και την HHP. Οι «πιεσμένοι» οίνοι με τις ενδιάμεσες συγκεντρώσεις SO₂ (40 και 60ppm) εμφανίζουν, μετά τους έξι μήνες αποθήκευσης, τις υψηλότερες τιμές μέσου βαθμού πολυμερισμού και τα μεγαλύτερα ποσοστά εστεροποίησης με γαλλικό οξύ. Αυτά τα δεδομένα πιθανόν να είναι ένδειξη για αυξημένη στυπτικότητα σε αυτούς τους οίνους (Chira *et al.*, 2011). Ταυτόχρονα οι οίνοι με τις χαμηλότερες (0 και 20ppm) και τις υψηλότερες (80 και 100ppm) συγκεντρώσεις SO₂ διατήρησαν σε χαμηλότερα επίπεδα τις τιμές του μέσου βαθμού πολυμερισμού και του ποσοστού εστεροποίησης χωρίς να παρουσιάσουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ «πιεσμένων» και «απίεστων» δειγμάτων.

Ένα πολύ ενθαρρυντικό αποτέλεσμα, σε σχέση με τη χρήση της υψηλής πίεσης, αποτελούν οι μειωμένες τιμές της πτητικής οξύτητας που εμφάνισαν οι «πιεσμένοι» οίνοι σε σχέση με τους «απίεστους» στους έξι μήνες αποθήκευσης. Μόνο οι «απίεστοι» οίνοι με 80 και 100ppm SO₂ προσέγγισαν τις χαμηλές τιμές των «πιεσμένων». Εν αντιθέσει, όλα τα υπόλοιπα «απίεστα» δείγματα (0, 20, 40 και 60ppm) εμφάνισαν πολύ υψηλές τιμές πτητικής οξύτητας, χαρακτηριστικό που αποτελεί σημαντική ποιοτική παράμετρο των οίνων.

Επιπλέον, αξίζει να επισημανθεί ότι το «πιεσμένο» και «απίεστο» δείγμα με 100ppm SO₂ δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά σε καμία από τις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν, με μικρή εξαίρεση τον ελεύθερο και ολικό SO₂ μετά τους τρεις μήνες. Ωστόσο, για να καταλήξουμε σε ασφαλέστερα συμπεράσματα σχετικά με το επίπεδο μείωσης της συγκέντρωσης του SO₂ με τη βοήθεια της HHP και της γλουταθειόνης, απαιτείται μελέτη σε εκτενέστερο χρονικό διάστημα, τόσο στο φυσικοχημικό όσο και στο οργανοληπτικό προφίλ του οίνου.

Τέλος, ενώ η HHP παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον όσον αφορά τη συντήρηση αλλά και την παλαίωση των οίνων (δύναται να επιταχύνει τις διαδικασίες παλαίωσης (Tao et al., 2012), άξια αναφοράς αποτελεί η διαπίστωση ότι η εγκατάσταση ενός μηχανήματος υψηλής υδροστατικής πίεσης σε ένα οινοποιείο θα φέρει ένα πρόσθετο κόστος στα έξοδα του.

Παράρτημα

Πίνακας Ι. Αποτελέσματα Οργανοληπτικής αξιολόγησης οίνων.

<i>Δείγμα</i>	<i>Ένταση χρώματος</i>	<i>Απόχρωση</i>	<i>Ένταση αρώματος</i>	<i>Αρώματα Κόκκινων φρούτων</i>	<i>Αρώματα αποξηραμέ νων φρούτων</i>	<i>Αρώματα Μπαχαρικό ν</i>
hhp0X	4.0±0.1 a	3.5±0.7 a,b,c	3.7±0.1 a	3.0±0.2 a	2.4±0.2 a	2.6±0.2 a
hhp20X	4.1±0.1 a	3.8±0.8 b	3.6±0.1 a	3.4±0.1 a	2.6±0.2 a	2.7±0.2 a
hhp40X	4.1±0.1 a	3.6±0.8 a,b	3.9±0.1 a	3.3±0.1 a	2.8±0.2 a	2.7±0.2 a
hhp60X	3.9±0.1 a	3.6±0.8 a,b,c	3.5±0.1 a	2.8±0.1 a	2.3±0.2 a	2.6±0.2 a
hhp80X	3.7±0.1 a	3.1±0.6 b,c	3.6±0.1 a	3.2±0.2 a	2.6±0.2 a	2.4±0.1 a
hhp100X	3.6±0.1 a	3.0±0.6 b,c	3.5±0.1 a	2.6±0.2 a	2.9±0.2 a	2.6±0.1 a
hhp0	3.9±0.1 a	3.3±0.5 a,b,c	3.4±0.1 a	3.0±0.1 a	2.4±0.2 a	2.3±0.2 a
hhp20	4.0±0.1 a	3.2±0.8 a,b,c	3.5±0.1 a	3.1±0.1 a	2.6±0.2 a	2.5±0.2 a
hhp40	4.2±0.1 a	3.5±0.7 a,b,c	3.4±0.1 a	3.1±0.1 a	2.4±0.1 a	2.3±0.1 a
hhp60	3.6±0.1 a	3.0±0.6 b,c	3.4±0.1 a	2.8±0.2 a	2.4±0.1 a	1.9±0.1 a
hhp80	3.8±0.1 a	3.0±0.6 b,c	3.8±0.1 a	2.9±0.1 a	2.5±0.1 a	2.5±0.2 a
hhp100	3.6±0.1 a	2.9±0.5 c	3.2±0.1 a	3.0±0.2 a	2.5±0.1 a	2.3±0.1 a

<i>Δείγμα</i>	<i>Αρώματα Σοκολάτας</i>	<i>Αρώματα Μαρμελάδ ας φρούτων</i>	<i>Οσμή Οξείδωσης</i>	<i>Οξύτητα</i>	<i>Στυπτικότητα</i>	<i>Πικράδα</i>	<i>Σώμα</i>	<i>Ισορροπία- Συνολική Εκτίμηση</i>
hhp0X	2.2±0.2 a	2.1±0.1 a	3.5±0.2 a	2.5±0.1 a	2.6±0.2 a	2.2±0.2 a	2.9±0 a	2.9±0.1 a,b
hhp20X	1.3±0.1 a	2.3±0.1 a	2.0±0.1 a	3.4±0.1 a,b	2.5±0.2 a	2.4±0.2 a	2.3±0.1 a	3.3±0.1 a,b
hhp40X	1.5±0.1 a	2.3±0.2 a	1.8±0.1 a	3.1±0.1 a,b	2.4±0.1 a	2.3±0.1 a	2.1±0 a	3.0±0.1 a,b
hhp60X	1.2±0.1 a	2.3±0.2 a	2.0±0.1 a	3.0±0.1 a,b	2.5±0.2 a	2.2±0.1 a	2.2±0.1 a	3.1±0.1 a,b
hhp80X	1.5±0.1 a	2.4±0.2 a	2.0±0.1 a	2.8±0.1 a,b	2.4±0.2 a	2.4±0.2 a	2.0±0.1 a	3.1±0.1 a,b
hhp100X	1.5±0.2 a	2.4±0.2 a	2.1±0.1 a	3.0±0.1 a,b	2.5±0.1 a	2.6±0.2 a	2.1±0 a	2.9±0.1 a,b
hhp0	1.2±0.1 a	2.1±0.2 a	2.0±0.1 a	3.3±0.2 a,b	2.3±0.1 a	2.5±0.1 a	2.0±0 a	2.7±0.1 a,b
hhp20	1.6±0.1 a	2.6±0.1 a	2.1±0.1 a	2.6±0.1 b	2.2±0.2 a	2.8±0.2 a	2.1±0.1 a	2.6±0.1 b
hhp40	1.4±0.2 a	2.2±0.1 a	1.8±0.1 a	3.0±0.2 a,b	2.1±0.1 a	2.0±0.1 a	2.1±0.1 a	3.1±0.1 a,b
hhp60	1.5±0.1 a	2.1±0.1 a	2.3±0.2 a	2.7±0.1 a,b	2.4±0.2 a	2.8±0.1 a	2.0±0 a	2.8±0.1 a,b
hhp80	1.5±0.1 a	2.5±0.1 a	1.8±0.1 a	2.7±0.1 a,b	2.3±0.1 a	2.7±0.1 a	2.0±0 a	3.4±0.1 a
hhp100	1.7±0.1 a	2.3±0.1 a	2.0±0.1 a	3.0±0.1 a,b	2.2±0.1 a	2.4±0.1 a	2.1±0.1 a	3.0±0.1 a,b

Πίνακας II. Αντιοξειδωτική Ικανότητα οίνων

Δείγμα	Αντιοξειδωτική Ικανότητα-3 μήνες	Αντιοξειδωτική Ικανότητα 6 μήνες	
hhp0X	5.10±0.05 f	5.77±0.06 b,c,d	
hhp20X	5.26±0.04 d,e,f	5.75±0.00 b,c,d	
hhp40X	5.70±0.04 b,c,d,e,f	6.25±0.02 a,b	
hhp60X	6.17±0.30 b,c	5.90±0.01 a,b,c	
hhp80X	6.01±0.12 b,c,d,e	6.35±0.14 a	
hhp100X	6.08±0.12 b,c,d	6.31±0.06 a,b	
hhp0	5.20±0.12 e,f	5.63±0.08 c,d	
hhp20	5.44±0.11 c,d,e,f	5.26±0.03 d	
hhp40	5.90±0.05 b,c,d,e,f	5.46±0.18 c,d	
hhp60	5.86±0.08 b,c,d,e,f	5.67±0.12 c,d	
hhp80	7.13±0.37 a	5.65±0.24 c,d	
hhp100	6.46±0.09 a,b	5.96±0.02 a,b,c	
Δείγματα	Αντιοξειδωτική Ικανότητα 0 μήνες	Αντιοξειδωτική Ικανότητα 3 μήνες	Αντιοξειδωτική Ικανότητα 6 μήνες
απίεστα	5.13±0 a	5.73±0.02 b,c	6.06±0 d
πιεσμένα	5.13±0 a	6.00±0.09 a,b	5.61±0.10 c

Πίνακας III. Προσδιορισμός φαινολικών συστατικών

Δείγμα	Ολικά φαινολικά (Folin) (mg γαλλικού οξέος/ L) -3 μήνες	Ολικά φαινολικά (Folin) (mg γαλλικού οξέος/ L) -6 μήνες	Δείκτης Φαινολικών Ουσιών -3 μήνες (AU)	Δείκτης Φαινολικών Ουσιών -6 μήνες (AU)
hhp0X	1572.95±82.53 b	1129.55±78.99 b	43.26±0.14 g	37.17±0.38 d
hhp20X	1558.64±29.92 b	1212.27±6.04 a,b	44.52±0.49 e,f	38.16±0.45 c,d
hhp40X	1705.23±51.31 b	1326.36±26.77 a,b	46.09±0.20 a,b,c	40.83±0.52 b,c,d
hhp60X	2379.77±154.44 a	1527.73±8.14 a	46.78±0.13 a	40.53±0.58 b,c,d
hhp80X	1861.14±83.58 b	1109.77±127.67 b	46.22±0.19 a,b,c	45.56±0.36 a
hhp100X	1745.45±56.95 b	1149.09±93.95 b	46.42±0.05 a,b	43.17±0.39 a,b
hhp0	1584.32±14.04 b	1177.27±1.57 b	44.77±0.03 d,e,f	42.05±2.22 a,b,c
hhp20	1744.77±15.88 b	1020±104.97 b	44.23±0.17 f,g	41.76±0.87 a,b,c
hhp40	1805.91±67.97 b	1240.45±83.19 a,b	44.62±0.21 e,f	40.59±0.36 b,c,d
hhp60	1785.91±31.75 b	1081.36±40.68 b	45.24±0.10 c,d,e	41.48±0.82 b,c,d
hhp80	1629.09±42.51 b	1204.09±34.90 a,b	45.63±0.03 b,c,d	41.30±0.44 b,c,d
hhp100	1754.32±13.25 b	1247.27±37.79 a,b	46.34±0 a,b,c	41.99±0.13 a,b,c

<i>Δείγματα</i>	<i>Δείκτης Φαινολικών Ουσιών -0 μήνες (AU)</i>	<i>Δείκτης Φαινολικών Ουσιών -3 μήνες (AU)</i>	<i>Δείκτης Φαινολικών Ουσιών -6 μήνες (AU)</i>
<i>απίεστα</i>	43.53±0 b	45.54±0 a	40.90±0.17 c
<i>πιεσμένα</i>	43.53±0 b	45.14±0.07 a	41.53±0.49 c

Πίνακας IV. Προσδιορισμός ολικού και ελεύθερου θειώδους ανυδρίτη

<i>Δείγμα</i>	<i>Ολικός SO₂ (mg/L)-3 μήνες</i>	<i>Ολικός SO₂ (mg/L)-6 μήνες</i>	<i>Ελεύθερος SO₂ (mg/L)-3 μήνες</i>	<i>Ελεύθερος SO₂ (mg/L)-6 μήνες</i>
<i>hhp0X</i>	22.00±0.57 f,g	20.00±0 e	12.00±0 f	17.50± 0.28 d,e,f
<i>hhp20X</i>	27.50±0.28 f	25.50± 3.17 e	18.75± 0.43 d,e,f	17.75± 0.43 d,e,f
<i>hhp40X</i>	45.00±3.46 e	37.00± 2.30 d	22.50± 2.59 d,e	21.50± 0.86 c,d
<i>hhp60X</i>	57.25± 0.72 d	44.50± 1.44 c	33.90± 0.63 b,c	21.00± 2.30 c,d,e
<i>hhp80X</i>	71.5± 0.28 b	69.25± 0.14 a	39.25± 1.87 b	40.50± 0.86 a
<i>hhp100X</i>	87.25± 0.14 a	76.50± 0.86 a	48.00± 0.28 a	42.00± 0 a
<i>hhp0</i>	20.75± 0.72 g	20.00± 0.57 e	15.75± 1.87 e,f	16.50± 0 e,f
<i>hhp20</i>	19.00± 0.57 g	22.00± 0 e	17.00± 1.15 d,e,f	15.50± 0.28 f
<i>hhp40</i>	28.00± 0.57 f	25.25± 0.43 e	18.50± 0.28 d,e,f	20.00± 0.57 c,d,e,f
<i>hhp60</i>	43.00± 1.44 e	45.00± 0.57 c	22.75± 1.01 d	24.00± 1.15 c
<i>hhp80</i>	64.50± 0.86 c	58.25± 1.87 b	30.00± 2.30 c	30.25± 0.72 b
<i>hhp100</i>	74.25± 1.01 b	69.75± 1.58 a	38.25± 0.43 b	38.00± 1.15 a

<i>Δείγματα</i>	<i>Ολικός SO₂ (mg/L)-0 μήνες</i>	<i>Ολικός SO₂ (mg/L)-3 μήνες</i>	<i>Ολικός SO₂ (mg/L)-6 μήνες</i>
<i>απίεστα</i>	52.83± 0 a	51.75±0.57 a	45.46±1.03 b
<i>πιεσμένα</i>	52.83±0 a	41.58±0.43 c	40.04±0.07 c

<i>Δείγματα</i>	<i>Ελεύθερος SO₂ (mg/L)- 0 μήνες</i>	<i>Ελεύθερος SO₂ (mg/L)-3 μήνες</i>	<i>Ελεύθερος SO₂ (mg/L)-6 μήνες</i>
<i>απίεστα</i>	52.83± 0 a	51.75±0.57 a	45.46±1.03 b
<i>πιεσμένα</i>	52.83±0 a	41.58±0.43 c	40.04±0.07 c

Πίνακας V. Χρωματικά χαρακτηριστικά οίνων.

Δείγμα	Ένταση (AU)-3 μήνες	Ένταση (AU)-6 μήνες	Απόχρωση (AU)-3 μήνες	Απόχρωση (AU)-6 μήνες
hhp0X	12.50± 0.13 a,b,c	11.25± 0.21 a,b,c	0.98±0 a	0.90±0 d
hhp20X	12.03± 0.06 a,b,c,d	10.17± 0.21 d,e	0.92±0 e	0.86±0 e
hhp40X	11.51± 0 c,d	10.71± 0.01 b,c	0.91±0 e	0.85±0 e
hhp60X	12.22± 0.05 a,b,c,d	10.64± 0.04 c,d	1.02±0 c	0.86±0 e
hhp80X	12.37± 0.02 a,b,c	9.18± 0.03 f,g	1.00±0 c,d	0.97±0 c
hhp100X	11.87± 0.08 c,d	8.66± 0.25 g	1.01±0 c	0.99±0 b
hhp0	13.05± 0 a,b	11.53± 0.02 a	1.14±0 a	1.02±0 a
hhp20	13.07± 0.01 a	11.46± 0.03 a,b	1.12±0 a	1.00±0 b
hhp40	11.72± 0.25 c,d	10.66± 0.04 c,d	1.05±0 b	0.98±0 c
hhp60	10.89± 0.70 a,b,c	9.59± 0.24 e,f	1.02±0 c	0.97±0 c
hhp80	12.02± 0 a,b,c,d	9.24± 0.21 f,g	1.01±0 c	0.97±0 c
hhp100	11.90± 0.15 b,c,d	9.14± 0.03 f,g	1.02±0 c	1.00±0 b

Δείγματα	Ένταση (AU)-0 μήνες	Ένταση (AU)-3 μήνες	Ένταση (AU)-6 μήνες
απίεστα	10.74±0.05 b	12.08±0 a	10.10±0.11 c
πιεσμένα	10.74±0.05 b	12.11±0.18 a	10.27±0.07 c

Δείγματα	Απόχρωση (AU)-0 μήνες	Απόχρωση (AU)-3 μήνες	Απόχρωση (AU)-6 μήνες
απίεστα	1.02±0.01 b	0.98±0 c	0.91±0 d
πιεσμένα	1.02±0.01 b	1.06±0 a	0.99±0 c

Πίνακας VI. Προσδιορισμός μηλικού και γαλακτικού οξέος.

Δείγμα	L-μηλικό οξύ (g/L)-3 μήνες	L-μηλικό οξύ (g/L)-6 μήνες	L-γαλακτικό οξύ (g/L)-3 μήνες	L-γαλακτικό οξύ (g/L)-6 μήνες
hhp0X	0.03± 0.01 d	0±0 b	2.38±0.04 a	2.85±0.02 a
hhp20X	0.1± 0 b,c	0±0 b	2.28±0.04 a	2.6±0.05 a
hhp40X	0.09±0 b,c,d	0.03± 0 a,b	1.85±0.05 b	2.6±0.05 a
hhp60X	0.06± 0 c,d	0.03± 0b	1.83±0.01 b	2.6±0 a
hhp80X	0.1± 0 b,c	0±0 b	1.73±0.01 b	2.25±0.08 b
hhp100X	0.06± 0.01 c,d	0.05± 0.02 a,b	1.73±0.04 b	1.8±0 c
hhp0	0.07± 0 c,d	0.03± 0.01 a,b	1.7±0.02 b	1.85±0.02 c
hhp20	0.10± 0 b,c,d	0.07± 0 a,b	1.73±0.01 b	1.8±0.05 c
hhp40	0.14± 0.02 b	0.07± 0.04 a,b	1.7±0 b	1.6±0.05 c
hhp60	0.22± 0.01 a	0.09± 0.03 a,b	1,75±0 b	1.8±0.05 c

<i>hhp80</i>	0.09± 0.03 b,c,d	0.07± 0 a,b	1.75±0 b	1.65±0.02 c
<i>hhp100</i>	0.12±0 b,c	0.11± 0 a	1.73±0.04 b	1.75±0.08 c

<i>Δείγματα</i>	<i>L-μηλικό οξύ (g/L)-0</i> <i>μήνες</i>	<i>L-μηλικό οξύ (g/L)-3</i> <i>μήνες</i>	<i>L-μηλικό οξύ (g/L)-6</i> <i>μήνες</i>
<i>απίεστα</i>	0.38±0 a	0.07±0 c	0.01±0 d
<i>πιεσμένα</i>	0.38±0 a	0.12±0 b	0.07±0 c

<i>Δείγματα</i>	<i>L-γαλακτικό οξύ (g/L)-0</i> <i>μήνες</i>	<i>L-γαλακτικό οξύ (g/L)-3</i> <i>μήνες</i>	<i>L-γαλακτικό οξύ (g/L)-6</i> <i>μήνες</i>
<i>απίεστα</i>	1.72±0.04 c	1.96±0.01 b	2.45±0.03 a
<i>πιεσμένα</i>	1.72±0.04 c	1.73±0.01 c	1.74±0.03 c

Πίνακας VII. Μέτρηση της ακεταλδεϋδης

<i>Δείγμα</i>	<i>Ακεταλδεϋδη (mg/L)-3</i> <i>μήνες</i>	<i>Ακεταλδεϋδη (mg/L)-3</i> <i>μήνες 6 μήνες</i>
---------------	---	---

<i>hhp0X</i>	2.53± 0.70 c	0.45± 0.25 d,e
<i>hhp20X</i>	7.85± 0.02 a,b,c	0.1± 0 e
<i>hhp40X</i>	11.63± 0.38 a,b,c	4.1± 0.51 b,c,d,e
<i>hhp60X</i>	6.9± 0.23 a,b,c	6.75± 1.81 a,b,c,d
<i>hhp80X</i>	16.2± 0.05 a	1.55± 0.83 c,d,e
<i>hhp100X</i>	9.28± 2.06 a,b,c	7.5± 0.69 a,b,c
<i>hhp0</i>	5.1± 0.75 b,c	1.8± 1.03 c,d,e
<i>hhp20</i>	5.43± 0.21 b,c	11.4± 3.23 a
<i>hhp40</i>	11.8± 1.18 a,b,c	2.7± 1.55 b,c,d,e
<i>hhp60</i>	13.78± 2.46 a,b	7.15± 0.43 a,b,c
<i>hhp80</i>	13.88± 5.90 a,b	8.5± 0.63 a,b
<i>hhp100</i>	9.48± 0.88 a,b,c	8.1± 0.80 a,b,c

<i>Δείγματα</i>	<i>Ακεταλδεϋδη (mg/L)-0</i> <i>μήνες</i>	<i>Ακεταλδεϋδη (mg/L)-3</i> <i>μήνες</i>	<i>Ακεταλδεϋδη (mg/L)-6</i> <i>μήνες</i>
-----------------	---	---	---

<i>απίεστα</i>	0±0 c	9.06± 0.36 a	3.41± 0.37 b,c
<i>πιεσμένα</i>	0±0 c	9.91± 1.82 a	6.61± 1.01 a,b

<i>Δείγμα</i>	<i>Ολικές Τανίνες</i> <i>(g/L)-3 μήνες</i>	<i>Ολικές Τανίνες</i> <i>(g/L)-6 μήνες</i>	<i>Τανίνες (BSA)</i> <i>(mg/L)-3 μήνες</i>	<i>Τανίνες (BSA)</i> <i>(mg/L)-6 μήνες</i>
<i>hhp0X</i>	1.45±0.02 a,b,c	1.48±0.01 c	25.60± 0.84 a,b,c	28± 3.10 a,b
<i>hhp20X</i>	1.54±0.04 a	1.52±0.02 b,c	23.61± 0.24 c	28.64± 0.72 a,b
<i>hhp40X</i>	1.53±0 a	1.49±0.01 c	24.90± 1.35 b,c	19.93± 0.54 c
<i>hhp60X</i>	1.45±0.04 a,b,c	1.52±0 b,c	23.56± 0.88 c	23.25± 0.22 b,c

hhp80X	1.43±0 a,b,c	1.71±0.05 a	23.11± 1.06 c	23.44± 0.66 b,c
hhp100X	1.54±0.01 a	1.67±0.01 a,b	26.07± 1.74 a,b,c	27.51± 1.79 a,b
hhp0	1.32±0.01 c	1.51±0.02 b,c	35.67± 2.21 a,b	31.61± 1.04 a
hhp20	1.36±0.03 b,c	1.51±0.02 b,c	23.46± 0.44 c	30.11± 2.28 a,b
hhp40	1.52±0 a	1.48±0.01 c	22.13± 1.47 c	28.72± 0.41 a,b
hhp60	1.56±0.05 a	1.67±0.06 a,b	26.20± 0.88 a,b,c	26.69±0.53 a,b,c
hhp80	1.48±0.02 a,b	1.62±0.05 a,b,c	20.28± 0.95 c	26.54± 1.20 a,b,c
hhp100	1.50±0.02 a,b	1.60±0.02 a,b,c	36.89± 6.24 a	28.34± 0.78 a,b

Πίνακας VIII, Μετρήσεις τανινών οίνων

<i>Δείγμα</i>	<i>Ολικές Τανίνες (g/L)-3 μήνες</i>	<i>Ολικές Τανίνες (g/L)-6 μήνες</i>	<i>Τανίνες (BSA) (mg/L)-3 μήνες</i>	<i>Τανίνες (BSA) (mg/L)-6 μήνες</i>
hhp0X	1.45±0.02 a,b,c	1.48±0.01 c	25.60± 0.84 a,b,c	28± 3.10 a,b
hhp20X	1.54±0.04 a	1.52±0.02 b,c	23.61± 0.24 c	28.64± 0.72 a,b
hhp40X	1.53±0 a	1.49±0.01 c	24.90± 1.35 b,c	19.93± 0.54 c
hhp60X	1.45±0.04 a,b,c	1.52±0 b,c	23.56± 0.88 c	23.25± 0.22 b,c
hhp80X	1.43±0 a,b,c	1.71±0.05 a	23.11± 1.06 c	23.44± 0.66 b,c
hhp100X	1.54±0.01 a	1.67±0.01 a,b	26.07± 1.74 a,b,c	27.51± 1.79 a,b
hhp0	1.32±0.0150 c	1.51±0.02 b,c	35.67± 2.21 a,b	31.61± 1.04 a
hhp20	1.36±0.0378 b,c	1.51±0.02 b,c	23.46± 0.44 c	30.11± 2.28 a,b
hhp40	1.52±0.0096 a	1.48±0.01 c	22.13± 1.47 c	28.72± 0.41 a,b
hhp60	1.56±0.0575 a	1.67±0.06 a,b	26.20± 0.88 a,b,c	26.69±0.53 a,b,c
hhp80	1.48±0.0284 a,b	1.62±0.05 a,b,c	20.28± 0.95 c	26.54± 1.20 a,b,c
hhp100	1.50±0.0228 a,b	1.60±0.02 a,b,c	36.89± 6.24 a	28.34± 0.78 a,b

<i>Δείγματα</i>	<i>Ολικές Τανίνες (g/L)-0 μήνες</i>	<i>Ολικές Τανίνες (g/L)-3 μήνες</i>	<i>Ολικές Τανίνες (g/L)-6 μήνες</i>
απίεστα	1.39±0.04 c	1.49±0 a,b	1.56±0 a
πιεσμένα	1.39±0.04 c	1.46±0 b,c	1.55±0 a,b

<i>Δείγματα</i>	<i>Τανίνες (BSA) (mg/L)-0 μήνες</i>	<i>Τανίνες (BSA) (mg/L)-3 μήνες</i>	<i>Τανίνες (BSA) (mg/L)-6 μήνες</i>
απίεστα	33.35± 0.09 a	24.61±0.63 c	25.13±0.17 b,c
πιεσμένα	33.35± 0.09 a	27.44±1.54 b,c	28.67±0.32 b

Πίνακας ΙΧ. Ανθοκυάνες με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Δείγμα	Δελφινιδίνη ισοδύναμα Μαλβιδίνης (mg/L)-3 μήνες	σε	Πετουνιδίνη ισοδύναμα Μαλβιδίνης(mg/L)-3 μήνες	σε	Πεονιδίνη ισοδύναμα Μαλβιδίνης (mg/L)- 3 μήνες	σε	Μαλβιδίνη (mg/L)-3 μήνες
hhp0X	1.58±0 d,e		3.47±0.17 d,e		0±0 g		55.71±1.38 f
hhp20X	1.90± 0.04 d		3.91±0 d,e		1.53±0 c,d,e		69.68±0.57 e
hhp40X	4.29±0.08 a		8.65±0 a		1.57±0.02 c,d		103.21±1.26 a,b
hhp60X	4.20±0.03 a		7.80±0.27 b		1.67±0 b,c		105.41±0.81 a
hhp80X	3.71±0 b		7.67±0.05 b		1.79±0.04 a,b		108.42±0.66 a
hhp100X	3.50±0.04 b		7.39±0.10 b		1.87±0.04 a		108.62±0.27 a
hhp0	1.22±0.01 e		1.93±0.04 f		1.37±0 f		50.33±0.85 f
hhp20	1.05±0 f		1.60±0.06 f		1.42±0 f		67.23±0.50 f
hhp40	1.42±0 e,f		3.18±0 e		1.51±0.01 d,e,f		67.23±1.34 e
hhp60	1.89±0.01 d,e		4.20±0.04 d		1.62±0.01 c,d		78.92±0.35 d
hhp80	2.64±0.21 c,d		5.85±0.38 c		1.85±0.06 a		91.28±3.14 c
hhp100	2.71±0.05 c		6.15±0 c		1.82±0.03 a		97.16±0.05 b,c

Δείγμα	Οξικός εστέρας της Μαλβιδίνης σε ισοδύναμα Μαλβιδίνης (mg/L)-3 μήνες	Κουμαρικός εστέρας της Μαλβιδίνης σε ισοδύναμα Μαλβιδίνης (mg/L)-3 μήνες
hhp0X	1.98±0.01 c,d	4.49±0 e
hhp20X	2.08±0.12 c,d	5.15±0.07 d
hhp40X	2.55±0.04 b	5.83±0.20 c
hhp60X	3.20±0.08 a	6.50±0.05 b
hhp80X	3.13±0 a	7.26±0.04 a
hhp100X	3.27±0.03 a	6.77±0.28 a,b
hhp0	1.92±0.13 c,d	0.79±0 g
hhp20	1.87±0 d	0.79±0 g
hhp40	2.14±0 c,d	1.63±0.02 f
hhp60	2.20±0.35 a	1.76±0.01 f
hhp80	2.65±3.14 b	2.01±0.07 f
hhp100	2.81±0.05 b	1.94±0 f

Δείγμα	Δελφινιδίνη ισοδύναμα Μαλβιδίνης (mg/L)-6 μήνες	σε	Πετουνιδίνη ισοδύναμα Μαλβιδίνης(mg/L)-6 μήνες	σε	Πεονιδίνη ισοδύναμα Μαλβιδίνης (mg/L)- 6 μήνες	σε	Μαλβιδίνη (mg/L)-6 μήνες
hhp0X	0.0059±0.0059 f		0.2512±0.2512 g		0.0048±0.0048 e		4.0436±4.0436 g
hhp20X	0.0275±0.0275 f		0.1607±0.1607 h		0.0035±0.0035 e		1.7117±1.712 h
hhp40X	0.0749±0.0749 e		0.1902±0.1902 f		0.0070±0.0070 e		1.6166±1.6166 f

hhp60X	4.8295±0.2202 b	8.905±0.1077 c	1.2993±0.0818 c	95.927±1.2804 c
hhp80X	5.2941±0.0231 b	9.3058±0.0503 b	1.3805±0.0452 b,c	105.153±1.888 b,c
hhp100X	5.9462±0.1387 a	10.958±0.1849 a	1.7092±0.0472 a	120.518±2.7098 a
hhp0	0.0434±0.0434 f	0.0525±0.0525 g	0.0155±0.0155 d	0.9778±0.9778 e
hhp20	0.0028±0.0028 f	0.0057±0.0057 g	0.032±0.032 d	0.0025±0.0025 e
hhp40	0.0411±0.0411 d	0.1400±0.1400 e	0.0516±0.0516 c	1.3828±1.3828 d
hhp60	3.9837±0.0747 c	7.9876±0.1176 d	1.5814±0.0312 a,b	98.775±0.7309 c
hhp80	5.0564±0.0168 b	9.7125±0.0218 b	1.6315±0.0315 a	111.072±0.2165 b
hhp100	5.8886±0.1491 a	11.2136±0.2337 a	1.7450±0.0628 a	124.236±1.3809 a

Δείγμα *Οξικός εστέρας της Μαλβιδίνης σε ισοδύναμα Μαλβιδίνης (mg/L)-6 μήνες* *Κουμαρικός εστέρας της Μαλβιδίνης σε ισοδύναμα Μαλβιδίνης (mg/L)-6 μήνες*

hhp0X	0.0130±0.0130 f	0.01±0.01 f,g
hhp20X	0.0132±0.0132 g	0.0043±0.0043 h
hhp40X	0.0726±0.0726 f	0.0050±0.005 g
hhp60X	2.7736±0.1096 c	1.7249±0.027 c
hhp80X	3.4754±0.1145 a,b	2.0102±0.0097 b
hhp100X	3.5487±0.0809 a,b	2.2469±0.0073 a
hhp0	0.0074±0.0074 e	0.0152±0.0152 f,g
hhp20	0.0572±0.0572 e	0.0154±0.0154 f
hhp40	0.0170±0.0170 d	0.0430±0.0430 e
hhp60	2.8101±0.0088 c	1.4855±0.0227 d
hhp80	3.2488±0.0512 b	1.8389±0.0329 c
hhp100	3.7652±0.0594 a	2.1494±0.0647 a,b

Πίνακας X. Μέσος βαθμός πολυμερισμού τανινών (mDP), ποσοστό εστεροποίησης (G%) και ποσοστό προδελφινιδινών (P%) με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

<i>Δείγμα</i>	<i>mDP 3 μήνες</i>	<i>G%- 3 μήνες</i>	<i>P%-3 μήνες</i>
hhp0X	1.67±0.15 d	33.83±7.20 c	15.94±6.74 a
hhp20X	2.01±0.01 c,d	47.45±0.06 b,c	17.83±1.20 a
hhp40X	2.74±0.17 a,b	60.19±2.23 a,b	14.52±7.40 a
hhp60X	2.92±0.08 a,b	62.04±1.10 a	15.66±0.66 a
hhp80X	3.10±0 a	65.19±0.18 a	15.69±0.59 a
hhp100X	2.71±0.07 a,b,c	59.68±0.67 a,b	17.70±0.86 a
hhp0	2.25±0.09 b,c,d	53.39±2.43 a,b	12.16±1.49 a
hhp20	2.82±0.19 a,b	61.61±1.84 a	8.47±0.097 a
hhp40	2.31±0.12 b,c,d	52.37±3.10 a,b	14.67±1.41 a
hhp60	3.06±0.08 a	64.35±1.17 a	18.86±2.27 a
hhp80	2.81±0.04 a,b	61.52±0.02 a	17.11±0.84 a

hhp100	3.16±0.3194 a	66.26±3.3226 a	10.76±1.9974 a
--------	---------------	----------------	----------------

<i>Δείγμα</i>	<i>mDP 6 μήνες</i>	<i>G%- 6 μήνες</i>	<i>P%-6 μήνες</i>
hhp0X	1.63±0.12 g	33.55±4.23 f	22.33±1.52 a
hhp20X	2.35±0.09 f	53.33±1.95 d,e	17.75±0.81 a,b
hhp40X	2.61±0.02 f	57.91±0.15 c,d	16.02±0.03 b,c
hhp60X	3.57±0.09 d,e	68.82±0.74 b	12.75±0.35 c,d
hhp80X	4.15±0.01 b,c	72.66±0.14 b	10.77±0.28 d,e
hhp100X	3.33±0.04 e	66.27±0.49 b,c	11.67±1.68 c,d,e
hhp0	2.13±0.07 f,g	47.23±1.34 e	20.2±0.94 a,b
hhp20	2.21±0.18 f	49.83±3.10 d,e	19.33±1.28 a,b
hhp40	4.66±0.13 b	74.34±1.01 a,b	11.63±0.83 c,d,e
hhp60	7.16±0 a	82.51±0.12 a	7.64±0.29 e
hhp80	3.99±0.19 c,d	71.38±1.07 b	11.08±0.89 d,e
hhp100	3.71±0.04 c,d,e	69.99±0.39 b,c	12.08±0.27 c,d,e

Βιβλιογραφία

1. Adams, D.O., and J.F. Harbertson. (1999). Use of alkaline phosphatase for the analysis of tannins in grapes and red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 50:247-252
2. Antoce O.A., 2007. *Oenology. Chemistry and sensory analysis*. Universitaria Publishing House, Craiova.
3. Atanasova, V., Fulcrand, H., Cheynier, V., & Moutounet, M. (2002). Effect of oxygenation on polyphenol changes occurring in the course of wine-making. In *Analytica Chimica Acta* (Vol. 458, pp. 15–27).
4. Azzolini, M., E. Tosi, G. Veneri, and G. Zapparoli. 2010. Evaluating the efficacy of lysozyme against lactic acid bacteria under different winemaking scenarios. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 31:99.
5. Badea, G.A., Antoce, O.A., 2015. Glutathione as a possible replacement of sulfur dioxide in winemaking technologies: A review. *Agriculture for Life, Scientific Papers, Series B, Horticulture*, Vol. LIX, 2015, pages 123-140.
6. Bağder Elmacı, S., Güllüoğlu, G., Tokatlı, M., Erten, H., İsci, A., Özcelik, F., 2015. Effectiveness of chitosan against wine-related microorganisms. *Antonie Van Leeuwenhoek* 107, 675_686.
7. Bakker, J., & Timberlake, C. F. (1997). Isolation , Identification , and Characterization of New Color-Stable Anthocyanins Occurring in Some Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 258 8561(96), 35–43
8. 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 the Food and Agriculture*, 78, 297-307.
9. Bartowsky EJ (2009) Bacterial spoilage of wine and approaches to minimize it. *Lett Appl Microbiol* 48(2):149–156
10. Bauer R., Chikindas M. L. and Dicks L., M. (2005), ‘Purification, partial amino acid sequence and mode of action of pediocin PD-1, a bacteriocin produced by *Pediococcus damnosus* NCFB 1832’, *Int J Food Microbiol* **101**(1), 17–27.
11. Bautista-Ortin AB, Martinez-Cutillas A, Ros-Garcia JM, Lopez- Roca JM, Gomez-Plaza E (2005) Improving colour extraction and stability in red wines: the use of maceration enzymes and enological tannins. *Int J Food Sci Technol* 40(8):867–878
12. Begum M, Hocking AD, Di M (2009) Inactivation of food spoilage fungi by ultra violet (UVC) irradiation. *Int J Food Microbiol* 129(1):74–77
13. Bertrand A. and Guillou I. (1999) *Bull. OIV*, 72, 84.
14. Bornet, A., & Teissedre, P. L. (2008). Chitosan, chitin-glucan and chitin effects on minerals (iron, lead, cadmium) and organic (ochratoxin A) contaminants in wines. *European Food Research and Technology*, 226, 681–689.
15. Borthwick KAJ, Coakley WT, McDonnell MB, Nowotny H, Benes E, Groschl M (2005) Development of a novel compact sonicator for cell disruption. *J Microbiol Methods* 60(2):207–216
16. Brand-Williams, W Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity, 30, 25–30.
17. Burin, V.M., Freitas Costa, L.L., Rosier, J.P., & Bordignon-Luiz, M.T. (2011). Cabernet Sauvignon wines from two different clones, characterization and evolution during bottle ageing. *LWT - Food Science and Technology*, 44(9), 1931–1938.

18. Buzrul, S. (2012). High hydrostatic pressure treatment of beer and wine: A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 13, 1–12.
19. C Nunes, MC Santos, JA Saraiva, SM Rocha, MA Coimbra (2017) Influence of high hydrostatic pressure technology on wine chemical and sensorial characteristics: Potentialities and drawbacks. Chapter Six. *Advances in food and nutrition research* 82, 205-235
20. Campos FM, Couto JA, Figueiredo AR, Toth IV, Rangel A, Hogg TA (2009) Cell membrane damage induced by phenolic acids on wine lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* 135(2):144–151
21. Cao XM, Zhang Y, Zhang FS, Wang YT, Yi JY, Liao XJ (2011) Effects of high hydrostatic pressure on enzymes, phenolic compounds, anthocyanins, polymeric colour and colour of strawberry pulps. *J Sci Food Agric* 91(5):877–885
22. Castellari M, Matricardi L, Arfelli G, Rovere P, Amati A (1997) Effects of high pressure processing on polyphenoloxidase enzyme activity of grape musts. *Food Chem* 60(4):647–649
23. Castro Marín, A., Culcasi, M., Cassien, M., Stocker, P., Thétiot-Laurent, S., Robillard, B., Chinnici, F., Pietri, S., 2019 Chitosan as an antioxidant alternative to sulphites in oenology: EPR investigation of inhibitory mechanisms, *Food Chemistry*, 19, 30230-4
24. Castro SM, Saraiva JA, Domingues FMJ, Delgadillo I (2011) Effect of mild pressure treatments and thermal blanching on yellow bell peppers (*Capsicum annum* L). *LWT-Food Sci Technol* 44(2):363–369
25. Cejudo-Bastante MJ, Sonni F, Chinnici F, Versari A, Perez- Coello MS, 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 Sci Technol* 43(10):1501–1507
26. Charter, E., and G. Lagarde, (1999). Lysozyme and other proteins in eggs. Pp. 1582–1587 in C. A. Batt, R. K. Robinson, P. Patel, P. D. Petel, eds. *Encyclopaedia of Food Microbiology*. Academic Press: Adelaide
27. Chen, X., Li, L., You, Y. Y., Mao, B., Zhao, W., Zhan, J., et al. (2012). The effects of ultra-high pressure treatment on the phenolic composition of red wine. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 33(2), 203–213.
28. Chira, K., Pacella, N., Jourdes, M., & Teissedre, P. L. (2011). Chemical and sensory evaluation of Bordeaux wines (Cabernet-Sauvignon and Merlot) and correlation with wine age. *Food Chemistry*, 126(4), 1971–1977.
29. Chira, K., Zeng, L., Le Floch, A., Péchamat, L., Jourdes, M., & Teissedre, P. L. (2015). Compositional and sensory characterization of grape proanthocyanidins and oak wood ellagitannin. *Tetrahedron*, 71(20), 2999–3006.
30. 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.
31. Compendium of international methods of wine and must analysis. International organization of vine and wine. Volume I. Edition 2006. Paris
32. Correia I, Nunes A, Saraiva JA, Barros AS, Delgadillo I (2011) High pressure treatments largely avoid/revert decrease of cooked sorghum protein digestibility when applied before/after cooking. *LWT-Food Sci Technol* 44(4):1245–1249.
33. Costa A, Barata A, Malfeito-Ferreira M, Loureiro V (2008) Evaluation of the inhibitory effect of dimethyl dicarbonate (DMDC) against wine microorganisms. *Food Microbiol* 25(2):422–427
34. Ćurko, N., Kovačević Ganić, K., Gracin, L., Dapić, 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. *Food Chemistry*, 145, 15–22.

35. Daeschel M. A., Dong-Sun J. and Watson B. T. (1991), 'Controlling wine malolactic fermentation with nisin and nisin-resistant strains of *Leuconostoc oenos*', *Appl Environ. Microbiol* 57(2), 601–603.
36. Daoudi, L., Quevedo, J. M., Trujillo, A. J., Capdevila, F., Bartra, E., Mi'nguez, S., et al. (2002). Effects of high-pressure treatment on the sensory quality of white grape juice. *High Pressure Research*, 22(3–4), 705–709.
37. Daudt, C.E., Ough, C.S., 1980. Action of dimethyldicarbonate on various yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.* 31 (1), 21–23.
38. De Coninck, G., Jordão, A. M., Ricardo Da Silva, J. M., & Laureano, O. (2006). Evolution of phenolic composition and sensory properties in red wine aged in contact with portuguese and french oak wood chips. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 40(1), 25–34.
39. Del Pozo-Insfran D, Del Follo-Martinez A, Talcott ST, Brenes CH (2007) Stability of copigmented anthocyanins and ascorbic acid in muscadine grape juice processed by high hydrostatic pressure. *J Food Sci* 72(4):247–253
40. Delfini, C., Conterno, L., Carpi, G., Rovere, P., Tabusso, A., Cocito, C., et al. (1995). Microbiological stabilisation of grape musts and wines by high hydrostatic pressures. *Journal of Wine Research*, 6(2), 143–151.
41. Delfini, C., Gaia, P., Schellino, R., Strano, M., Pagliara, A., Ambro` , S., (2002). Fermentability of grape must after inhibition with dimethyl decarbonate (DMDC). *J. Agric. Food Chem.* 50, 5605_5611.
42. du Toit W.J., Marais J., Pretorius I.S., du Toit, M., (2006). Oxygen in must and wine: A review. *S. Afr. J. Enol.Vitic.*, 27:76–94.
43. Dziezak, J.D. (1989) Spices. *Food Technol.*, **43**, 102-116
44. Edinger, W.D., Splittstoesser, D.F., (1986). Sorbate tolerance by lactic acid bacteria associated with grapes and wine. *J. Food. Sci.* 51, 1077_1078.
45. Es-Safi, N.-E., Le Guernevé, C., Cheynier, V., & Moutounet, M. (2000). New Phenolic Compounds Formed by Evolution of (+)-Catechin and Glyoxylic Acid in Hydroalcoholic Solution and Their Implication in Color Changes of Grape-Derived Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), 4233–4240.
46. Falguera V, Pagan J, Ibarz A (2011) Effect of UV irradiation on enzymatic activities and physicochemical properties of apple juices from different varieties. *LWT-Food Sci Technol* 44(1): 115–119
47. Ferreira EHD, Rosenthal A, Calado V, Saraiva J, Mendo S (2009) Byssochlamys nivea inactivation in pineapple juice and nectar using high pressure cycles. *J Food Eng* 95(4):664–669
48. Flanzky M. and Poux C., (1958), *Annals of Agricultural Sciences*, 1958:7, 377
49. Fredericks IN, du Toit M, Krugel M (2011) Efficacy of ultraviolet radiation as an alternative technology to inactivate microorganisms in grape juices and wines. *Food Microbiol* 28(3):510–517
50. Fugelsang K., Edwards C., (2007)., *Wine Microbiology, Practical Applications and Procedures*, Second edition.
51. Fugelsang, K., Edwards, C., 2007. *Wine Microbiology*. Springer Verlag, Berlin, Germany.
52. Gailunas KM, Matak KE, Boyer RR, Alvarado CZ, Williams RC, Sumner SS (2008) Use of UV light for the inactivation of *Listeria monocytogenes* and lactic acid bacteria species in recirculated chill brines. *J Food Prot* 71(3):629–633
53. Garcia-Ruiz A, Bartolome B, Cueva C, Martin-Alvarez PJ, Moreno-Arribas MV (2009) Inactivation of oenological lactic acid bacteria (*Lactobacillus hilgardii* and *Pediococcus pentosaceus*) by wine phenolic compounds. *J Appl Microbiol* 107(3):1042–1053

54. Garcia-Ruiz A, Moreno-Arribas MV, Martin-Alvarez PJ, Bartolome B (2011) Comparative study of the inhibitory effects of wine polyphenols on the growth of enological lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* 145(2–3):426–431
55. Garcia-Ruiz, A., Bartolome, B., Martinez-Rodriguez, A. J., Pueyo, E., Martin-Alvarez, 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.
56. Garde-Cerdan, T., Marselles-Fontanet, A. R., Arias-Gil, M., Ancin-Azpilicueta, C., & Martin-Belloso, O. (2008). Effect of storage conditions on the volatile composition of wines obtained from must stabilised by PEF during ageing without SO₂. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(4), 469–476.
57. Gastaminza, G., Quirce, S., Torres, M., Tabar, A., Echechipía, S., Muñoz, D., et al. (1995). Pickled onion-induced asthma: a model of sulfite-sensitive asthma? *Clinical & Experimental Allergy*, 25, 698e703.
58. Gerbaux V., Villa A., Monamy C. and Bertrand A. (1997) *Am. J. Enol. Vitic.*, 48 (1), 49.
59. Gerland C., Gerbaux V. and Villa A. (1999) *Revue des Oenologues*, 93S, 44.
60. Giacosa S., Segade S. R., Cagnasso E., Caudana A., Gerbi L., R., Gerbi V., (2019) SO₂ in Wines: Rational Use and Possible Alternatives, *Red Wine Technology*, Chapter 21, 309-321
61. Glories, Y. (1984). La couleur des vins rouges. Mesure, origine et interprétation. Partie I. *Connaiss. Vigne Vin*, **18**, 195–217.
62. Golberg, A., & Rubinsky, B. (2013). Chapter 12 - Mass transfer phenomena in electroporation. In S. M. Becker, & A. V. Kuznetsov (Eds.). *Transport in biological media* (pp. 455–492). Boston: Elsevier.
63. González-Arenzana, L., Portu, J., López, R., López, N., Santamaría, P., Garde-Cerdán, T., & López-Alfaro, I. (2015). Inactivation of wine-associated microbiota by continuous pulsed electric field treatments. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 29, 187–192.
64. Grant C.M., (2001). Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions. *Molecular Microbiology*, 39:533–541.
65. Guerrero, R. F., & Cantos-Villar, E. (2015). Demonstrating the efficiency of sulphur dioxide replacements in wine: A parameter review. *Trends in Food Science & Technology*, 42(1), 27–43.
66. Guzzo, F., M. Cappello, M. Azzolini, E. Tosi, and G. Zapparoli. (2011). The inhibitory effects of wine phenolics on lysozyme activity against lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 148:184–190.
67. Harbertson, F. & Adams, J. A. (2002): Tannins in skins and seeds of Cabernet Sauvignon, Syrah and Pinot noir berries during ripening. *Am. J. Enol. Vitic.*, **53**, 54-59.
68. Harris V, Jiranek V, Ford CM, Grbin PR (2010) Inhibitory effect of hydroxycinnamic acids on *Dekkera* spp. *Appl Microbiol Biotechnol* 86(2):721–729
69. 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. *Biotechnol Lett* 30(1):1–6
70. Kallithraka S., Mohdaly A., Makris D. and Kefalas P., (2005), Determination of major anthocyanin pigments in Hellenic native grape varieties (*Vitis vinifera* sp.): association with antiradical activity. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2005:18, 375-386.
71. Karbowiak T, Gougeon RD, Alinc JB, Brachais L, Debeaufort F, Voilley A, Chassagne D (2010) Wine oxidation and the role of cork. *Crit Rev Food Sci Nutr* 50(1):20–52
72. Karbowiak, T., Gougeon, R. D., Alinc, J. B., Brachais, L., Debeaufort, F., Voilley, A., et al. (2010). Wine oxidation and the role of cork. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50(1), 20–52.

73. Keyser M, Muller IA, Cilliers FP, Nel W, Gouws PA (2008) Ultraviolet radiation as a non-thermal treatment for the inactivation of microorganisms in fruit juice. *Innov Food Sci Emerg Technol* 9(3):348–354
74. Kourakou–Dragona S., 1998, Θέματα Οινολογίας
75. Koutchma T (2009) Advances in ultraviolet light technology for non-thermal processing of liquid foods. *Food Bioprocess Technol* 2(2):138–155
76. Koutchma T., 2014, Adapting High Hydrostatic Pressure (HPP) for Food Processing Operations., Chapter 6 : Emerged HPP Commercial Applications
77. Kurata, K., Nomura, S., & Takamatsu, H. (2014). Three-dimensional analysis of irreversible electroporation: Estimation of thermal and non-thermal damage. *International Journal of Heat and Mass Transfer*, 72(0), 66–74
78. Kyraleou, M., Kotseridis, Y., Koundouras, S., Chira, K., Teissedre, P. L., & Kallithraka, S. (2016). Effect of irrigation regime on perceived astringency and proanthocyanidin composition of skins and seeds of *Vitis vinifera* L. cv. Syrah grapes under semiarid conditions. *Food Chemistry*, 203, 292–300.
79. Li, H., Guo, A., & Wang, H. (2008). Mechanisms of oxidative browning of wine. *Food Chemistry*, 108(1), 1–13.
80. López de Lerma, N., Peinado, J., Moreno, J., & Peinado, R. A. (2010). Antioxidant activity, browning and volatile Maillard compounds in Pedro Ximenez sweet wines under accelerated oxidative aging. *LWT—Food Science and Technology*, 43(10), 1557–1563.
81. Lopez-Alfaro, I., Gonzalez-Arenzana, L., Lopez, N., Santamaria, P., Lopez, R., Garde- Cerdan, T., & Garde-Cerdán, T. (2013). Pulsed electric field treatment enhanced stilbene content in Graciano, Tempranillo and Grenache grape varieties. *Food Chemistry*, 141(4), 3759–3765.
82. López-Giral, N., González-Arenzana, L., González-Ferrero, C., López, R., Santamaría, P., López-Alfaro, I., & Garde-Cerdán, T. (2015). Pulsed electric field treatment to improve the phenolic compound extraction from Graciano, Tempranillo and Grenache grape varieties during two vintages. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 28, 31–39.
83. Ludikhuyze L, Van Loey A, Denys S, Hendrickx MEG (2002) Effects of high pressure on enzymes related to food quality. *Ultra High Press Treat Foods* 5:115–166
84. Maarse, H., (1991). Volatile Compounds in Foods and Beverages. Marcel Dekker Inc, New York, NY.
85. 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.
86. Manuel Malfeito-Ferreira, (2019), Red Wine Technology, Chapter 15. Spoilage Yeasts in Red Wines Pages 219-235
87. Manzocco L, Quarta B, Dri A (2009) Polyphenoloxidase inactivation by light exposure in model systems and apple derivatives. *Innov Food Sci Emerg Technol* 10(4):506–511
88. Marsellés-Fontanet, À. R., Puig, A., Olmos, P., Mínguez-Sanz, S., & Martín-Belloso, O. (2009). Optimising the inactivation of grape juice spoilage organisms by pulse electric fields. *International Journal of Food Microbiology*, 130(3), 159–165.
89. Masuzawa N, Ohdaira E, Ide M (2000) Effects of ultrasonic irradiation on phenolic compounds in wine. *Jpn J Appl Phys* 39 (5B):2978–2979
90. Matito, C., F. Mastorakou, J. J. Centelles, J. L. Torres, and M. Cascante. (2003). Antiproliferative effect of antioxidant polyphenols from grape in murine Hepa-1c1c7. *Eur. J. Nutr.* 42:43–49.

91. Merkouropoulos G, Michailidou S, Alifragkis A, Zioziou E, Koundouras S, Argiriou A, Nikolaou N (2015). A combined approach involving ampelographic description, berry oenological traits and molecular analysis to study native grapevine varieties of Greece. *Vitis* 54:99-103.
92. Moerman F (2005) High hydrostatic pressure inactivation of vegetative microorganisms, aerobic and anaerobic spores in pork Marengo, a low acidic particulate food product. *Meat Sci* 69(2):225–232.
93. Mok, C., Song, K. T., Park, Y. S., Lim, S., Ruan, R., & Chen, P. (2006). High hydrostatic pressure pasteurization of red wine. *Journal of Food Science*, 71(8), M265–M269.
94. Monagas, M., Gómez-Cordovés, C., & Bartolomé, B. (2006). Evolution of the phenolic content of red wines from *Vitis vinifera* L. during ageing in bottle. *Food Chemistry*, 95(3), 405–412.
95. Morata, A., Benito, S., González, M. C., Palomero, F., Tesfaye, W., & Suárez-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.
96. Moreno, F. J., Molina, E., Olano, A., & López-Fandin˜o, R. (2003). High-pressure effects on Maillard reaction between glucose and lysine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(2), 394–400.
97. Ni, Y., and L.-R. Zhong. (2003). The application of Lysozyme in icewine processing. *Food Res. Dev.*, 24:162–163.
98. 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.
99. OIV, O. (2009). Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis. Edition.
100. 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.
101. Ough, C.S., (1975). Dimethyldicarbonate as wine sterilant. *Am. J. Enol. Vitic.* 26 (3), 130–133.
102. Papadopoulou C, Soulti K, Roussis IG (2005) Potential antimicrobial activity of red and white wine phenolic extracts against strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. *Food Technol Biotechnol* 43(1):41–46
103. Pataro, G., Senatore, B., Donsì, G., & Ferrari, G. (2011). Effect of electric and flow parameters on PEF treatment efficiency. *Journal of Food Engineering*, 105(1), 79–88.
104. Petrova, B., Cartwright, Z.M., Edwards, C.G., (2016). Effectiveness of chitosan preparations against *Brettanomyces bruxellensis* grown in culture media and red wines. *J. Int. Sci. Vigne Vin* 50, 49_56.
105. Pilatte, E. (2005). Gestion de la micro-oxygénation et de la fermentation malolactique des vins rouges. *Revue des oenologues et des techniques vitivinicoles et oenologiques: magazine trimestriel d'information professionnelle* 32:24–28.
106. Pilatte, E., M. Nygaard, Y. Cai Gao, S. Krentz, J. Power, and G. Lagarde. (2000). Etude de l'effet du lysozyme sur différentes souches d'*Oenococcus oeni*. Applications dans la gestion de la fermentation malolactique. *Rev. Fr. Oenol.*, 185:26–29.
107. Piyasena, P., Mohareb, E., & McKellar, R. C. (2003). Inactivation of microbes using ultrasound: A review. *International Journal of Food Microbiology*, 87(3), 207–216.
108. Porter, L.J., Ough, C.S., (1982). The effects of ethanol, temperature, and dimethyldicarbonate on viability of *Saccharomyces cerevisiae* Montrachet nr 522 in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 33 (4), 222–225.
109. 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.

110. Puig, A., Olmos, P., Quevedo, J. M., Guamis, B., & Mínguez, S. (2008). Microbiological and sensory effects of musts treated by high-pressure homogenization. *Food Science and Technology International*, 14(5 Suppl.), 5–11.
111. Puig, A., Vilavella, M., Daoudi, L., Guamis, B., & Mínguez, S. (2003). Microbiological and biochemical stabilization of wines using the high pressure technique. *Bulletin de l'OIV*, 76, 569–617.
112. Quijada-Morín, N., Regueiro, J., Simal-Gándara, J., Tomás, E., Rivas-Gonzalo, J. C., & Escribano-Bailón, M. T. (2012). Relationship between the sensory-determined astringency and the flavanolic composition of red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(50), 12355–12361.
113. Ramirez R, Saraiva J, Lamela CP, Torres JA (2009) Reaction Kinetics Analysis of Chemical Changes in Pressure-Assisted Thermal Processing. *Food Eng Rev* 1(1):16–30
114. Raposo R., Chinnici F., Ruiz-Moreno M. J., Puertas B., Francisco J. Cuevas F., Carbú M., Guerrero R., Ortiz-Somovilla V., Moreno-Rojas J. M., Cantos-Villar E., (2017). Sulfur free red wines through the use of grapevine shoots: Impact on the wine quality. *Food Chemistry*, 23, 453-460.
115. Raposo, R., Ruiz-Moreno, M. J., Garde-Cerdán, T., Puertas, B., Moreno-Rojas, J. M., Gonzalo-Diago, A. et al. (2016). Grapevine-shoot stilbene extract as a preservative in red wine. *Food Chemistry*, 197, Part, 1102–1111.
116. Raso, J., Calderón, M. L., Góngora, M., Barbosa-Cánovas, G., & Swanson, B. G. (1998). Inactivation of mold ascospores and conidiospores suspended in fruit juices by pulsed electric fields. *LWT - Food Science and Technology*, 31(7–8), 668–672.
117. Rastogi NK, Raghavarao K, Balasubramaniam VM, Niranjan K, Knorr D (2007) Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. *Crit Rev Food Sci Nutr* 47(1):69–112.
118. Renouf, V., Strehaiano, P., Lonvaud-Funel, A., (2008). Effectiveness of dimethyldicarbonate to prevent *Brettanomyces bruxellensis* growth in wine. *Food Control* 19, 208_216.
119. Ribéreau-Gayon P. and Stonestreet E. (1965) *Bull. Soc.Chim.*, 9, 2649.
120. Ribereau-Gayon, Dubourdieu P., Doneche D., Lonvaud B., A. (2006a). *Handbook of Enology The Microbiology of Wine and Vinifications* (2nd ed., Vol. 1). John Wiley & Sons, Ltd.
121. Ribéreau-Gayon, P. and Stonestreet, E. (1966). Le dosage des tannins du vin rouge et détermination de leur structure (Content of tannins in red wine and determination of their structure). *Chem. Anal.*, 48, 188-196.
122. Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A. and Dubourdieu, D. (2006), *Handbook of Enology*, volume 2, *The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments*, John Wiley & Sons Ltd.
123. Rojo-Bezares B., Sáenz Y., Zarazaga M., Torres C. and Ruiz-Larrea F.(2007b), ‘Antimicrobial activity of nisin against *Oenococcus oeni* and other wine bacteria’, *Int J. Food Microbiol* **116**(1), 32–36.
124. Saldaña, G., Puértolas, E., López, N., García, D., Álvarez, I., & Raso, J. (2009). Comparing the PEF resistance and occurrence of sublethal injury on different strains of *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in media of pH 4 and 7. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(2), 160–165.
125. Santos M., Cláudia N., Saraiva J., Coimbra M. (2012) Chemical and physical methodologies for the replacement/reduction of sulfur dioxide use during winemaking: review of their potentialities and limitations. *Eur Food Res Technol* 234:1–12
126. Santos M., Nunes C., Ferreira A., Jourdes M., Teissedre P. L., Rodrigues A., Amado O., J. Saraiva J., Coimbra M., (2018), Comparison of high pressure treatment with conventional red wine aging processes: impact on phenolic composition. *Frin*
127. Santos, M. C., Nunes, C., Cappelle, J., Gonçalves, F. J., Rodrigues, A., Saraiva, J. A., et al. (2013a). Effect of high pressure treatments on the physicochemical properties of a sulphur dioxide-free red wine. *Food Chemistry*, 141(3), 2558–2566.

128. 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.
129. Santos, M. C., Nunes, C., Rocha, M. A. M., Rodrigues, A., Rocha, S. M., Saraiva, J. A., et al. (2013b). Impact of high pressure treatments on the physicochemical properties of a sulphur dioxide-free white wine during bottle storage: Evidence for Maillard reaction acceleration. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 20, 51–58.
130. Santos-Buelga, C., Francia-Aricha, E. M., De Pascual-Teresa, S., & Rivas-Gonzalo, J. C. (1999). Contribution to the identification of the pigments responsible for the browning of anthocyanin–flavanol solutions. *European Food Research and Technology*, 209, 411–415.
131. Singleton V.L., (1987). Oxygen with phenols and related reactions in musts, wines, and model systems: observations and practical implications. *Amer. J. Enol. Vitic.*, 38:69–77.
132. Singleton V.L., Salgues J., Zaya J., Trousdale E., (1985). Caftaric acid disappearance and conversion to products of enzymatic oxidation in grape must and wine. *Amer. J. Enol. Vitic.*, 36:50–56.
133. Smelt J (1998) Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Trends Food Sci Technol* 9(4):152–158
134. 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.
135. Spagna, G., Pifferi, P. G., Rangoni, C., Mattivi, F., Nicolini, G., & Palmonari, R. (1996). The stabilization of white wines by adsorption of phenolic compounds on chitin and chitosan. *Food Research International*, 29, 241–248.
136. Stafford, P.A., Ough, C.S., (1976). Formation of methanol and ethyl methyl carbonate by dimethyl dicarbonate in wine and model solutions. *Am. J. Enol. Vitic.* 27, 7_11.
137. Stavrakaki M., Biniari K. (2017). Ampelographic and Genetic Characterization of Grapevine Varieties (*Vitis vinifera* L.) of the ‘Mavroudia’ Group Cultivated in Greece. *Not Bot Horti Agrobo*, 45(2):525-531
138. Sun, X., Chen, X., Li, L., Ma, T., Zhao, F., Huang, W., et al. (2015). Effect of ultra-high pressure treatment on the chemical properties, colour and sensory quality of young red wine. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 36, 393–401.
139. Sun, X., Li, L., Ma, T., Zhao, F., Yu, D., Huang, W., et al. (2016). High hydrostatic pressure treatment: An artificial accelerating aging method which did not change the region and variety non-colored phenolic characteristic of red wine. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 33, 123–134.
140. Tabilo-Munizaga, G., Gordon, T. A., Villalobos-Carvajal, R., Moreno-Osorio, L., Salazar, F. N., Pérez-Won, M., et al. (2014). Effects of high hydrostatic pressure (HHP) on the protein structure and thermal stability of Sauvignon blanc wine. *Food Chemistry*, 155, 214–220.
141. Taillandier, P., Joannis-Cassan, C., Jentzer, J.-B., Gautier, S., Sieczkowski, N., Granes, D., et al., (2015). Effect of a fungal chitosan preparation on *Brettanomyces bruxellensis*, a wine contaminant. *J. Appl. Microbiol.* 118, 123_131.
142. Talcott, S. T., Brenes, C. H., Pires, D. M., & Del Pozo-Insfran, D. (2003). Phytochemical stability and color retention of copigmented and processed muscadine grape juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(4), 957–963.
143. Tao, Y., Sun, D.-W., Go´recki, A., Błaszczak, W., Lamparski, G., Amarowicz, R., et al. (2016). A preliminary study about the influence of high hydrostatic pressure processing in parallel with oak

- chip maceration on the physicochemical and sensory properties of a young red wine. *Food Chemistry*, 194, 545–554.
144. Tao, Y., Sun, D.-W., Go´recki, A., Błaszczak, W., Lamparski, G., Amarowicz, R., et al. (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.
145. Thomas LV, Delves-Broughton J, 2014 ,*Encyclopedia of Food Microbiology*, Volume 3, Elsevier
146. Threlfall, R.T., Morris, J.R., (2002). Using dimethyldicarbonate to minimize sulfur dioxide for prevention of fermentation from excessive yeast contamination in juice and semi-sweet wine. *J. Food Sci.* 67 (7), 2758–2762.
147. Tiwari BK, Donnell CP, Muthukumarappan K, Cullen PJ (2009a) Effect of sonication on orange juice quality parameters during storage. *Int J Food Sci Technol* 44(3):586–595.
148. Tiwari BK, O’Donnell CP, Cullen PJ (2009b) Effect of non thermal processing technologies on the anthocyanin content of fruit juices. *Trends Food Sci Technol* 20(3–4):137–145
149. Tokuyama T., Kuraishi H., Aida K., Uemura T., (1973). Hydrogen sulfide evolution due to a pantothenic acid deficiency in the yeast requiring this vitamin, with special reference to the effect of adenosine triphosphate on yeast cysteine desulfhydrase. *Journal of General and Applied Microbiology*, 19:439–466.
150. 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.
151. Vally, H., Misso, N. L. A., & Madan, V. (2009). Clinical effects of sulphite additives. *Clinical and Experimental Allergy*, 39(11), 1643–1651.
152. Vaquero MJR, Alberto MR, de Nadra MCM (2007) Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control* 18(2):93–101
153. Vidal, S., Francis, L., Guyot, S., Marnet, N., Kwiatkowski, M., Gawel, Waters, E. J. (2003). The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(6), 564–573.
154. Welti-Chanes, J., Barbosa-Ca´novas, G. V., & Aguilera, J. M. (2002). Innovative fruit preservation methods using high pressure. In J. Welti-Chanes & J. M. Aguilera (Eds.), *Engineering and food for the 21st century* (pp. 715–725). Boca Raton, FL: CRC Press.
155. Wollmann, N., & Hofmann, T. (2013). Compositional and sensory characterization of red wine polymers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(9), 2045–2061.
156. Wuytack EY, Diels AMJ, Michiels CW (2002) Bacterial inactivation by high-pressure homogenisation and high hydrostatic pressure. *Int J Food Microbiol* 77(3):205–212
157. Κουράκου-Δραγώνα, Σ.,(1998), Θέματα Οινολογίας, Επιστήμη και Τεχνολογία στον τομέα της οινοποιητικής τεχνικής, Εκδόσεις Τροχαλία, Αθήνα
158. Σταύρακας Δ. Ε., 2010, Αμπελογραφία, Εκδόσεις ΖΗΤΗ
159. Χαρβαλιά Α. και Μπενά- Τζούρου Ε., (1982): Τα φαινολικά συστατικά και το χρώμα των ελληνικών οίνων, Ελληνικά Οινολογικά χρονικά, 2, 1-77, Ινστιτούτο Οίνου, Αθήνα