



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS

**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΙΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: «ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΟΙΝΟΥ ΚΑΙ ΑΠΟΣΤΑΓΜΑΤΩΝ»

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Επίδραση της Υψηλής Υδροστατικής Πίεσης (HHP) στο
φυσικοχημικό προφίλ ερυθρού οίνου

Πολυξένη Π. Συρίου

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:

Σταματίνα Καλλίθρακα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΓΠΑ

Αθήνα
2020



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΙΝΟΛΟΓΙΑΣ

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Επίδραση της Υψηλής Υδροστατικής Πίεσης (HHP) στο
φυσικοχημικό προφίλ ερυθρού οίνου

“Affect of High Hydrostatic Pressure (HHP) at the physical and
chemical characteristics of red wine”

Πολυξένη Π. Συρίου

Εξεταστική Επιτροπή:

Σταματίνα Καλλίθρακα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΓΠΑ (επιβλέπουσα)

Χρήστος Παππάς, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Γεώργιος Κατσαρός, Ερευνητής Δ', ΙΤΑΠ, ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ

Επίδραση της Υψηλής Υδροστατικής Πίεσης (HHP) στο φυσικοχημικό προφίλ ερυθρού οίνου

*Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου
Εργαστήριο Οινολογίας*

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η υψηλή υδροστατική πίεση (HHP) είναι μια μη-θερμική φυσική μέθοδος επεξεργασίας, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων, ώστε να αυξηθεί η ασφάλεια και ο χρόνος ζωής των τροφίμων, μέσω απενεργοποίησης ανεπιθύμητων μικροοργανισμών. Στόχος της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής, είναι η αξιολόγηση της πιθανής χρήσης της HHP ως εναλλακτική τεχνική για την συντήρηση των οίνων, που θα μπορούσε να οδηγήσει και στη μείωση των χρησιμοποιούμενων ποσοτήτων SO₂. Για το σκοπό αυτό, δείγματα ερυθρού οίνου ποικιλίας Μούχταρο, με 40 ppm SO₂, υποβλήθηκαν σε υψηλή υδροστατική πίεση 200, 400 και 600 MPa για 0, 5 και 15 λεπτά στους 8 °C. Δείγμα στο οποίο δεν εφαρμόστηκε HHP χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας. Σε όλα τα δείγματα πραγματοποιήθηκαν οι ακόλουθες κλασικές αναλύσεις: pH, ολική και πτητική οξύτητα και αλκοολικός τίτλος. Ακολούθως, μελετήθηκαν οι παράμετροι χρώματος (ένταση, απόχρωση), ο μέσος βαθμός πολυμερισμού των ταννινών (mDP) με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) και η αντιοξειδωτική ικανότητα, και οι συγκεντρώσεις ακεταλδεϋδης, οξικού οξέος, ανθοκυανών, πολυφαινολών και προανθοκυανιδινών για περίοδο έξι μηνών. Τέλος, πραγματοποιήθηκε οργανοληπτικός έλεγχος, από πάνελ δώδεκα εκπαιδευμένων γευσιγνωστών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η εφαρμογή της HHP μπορεί να επιδράσει θετικά σε αρκετά χαρακτηριστικά του οίνου, όπως και στην πτητική οξύτητα, στην οποία τα πιεσμένα δείγματα ανταποκρίθηκαν θετικά στον χρόνο. Συνολικά, παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ δειγμάτων, με την εφαρμογή πίεσης στα 400 MPa για 15 λεπτά να εμφανίζεται ως η πιο αποτελεσματική. Συμπερασματικά, η HHP αποτελεί μια υποσχόμενη τεχνική για την μείωση των χρησιμοποιούμενων δόσεων SO₂ στον οίνο.

Επιστημονική περιοχή: Οινολογία

Λέξεις κλειδιά: Μούχταρο, Υψηλή Υδροστατική Πίεση, Θειώδης Ανυδρίτης, συντήρηση οίνου, φαινολικές ενώσεις, μέσος βαθμός πολυμερισμού

Affect of High Hydrostatic Pressure (HHP) at the physical and chemical characteristics of red wine

*Department of Food Science and Human Nutrition,
Laboratory of Oenology*

ABSTRACT

High hydrostatic pressure (HHP) is a non-thermal processing physical technology, which has been widely applied in the food industry in order to increase food safety and extend shelf life, by inactivation of undesired microorganisms. The aim of this work is to explore the possible use of HHP as an alternative method for wine preservation which could also lead to the production of wines with reduced amounts of SO₂. For this purpose, red wine samples containing 40 ppm of sulphur dioxide (SO₂) were subjected to pressure of 200, 400 and 600 MPa for 0, 5 and 15 min at 8 °C. A sample containing only SO₂ that was not subjected to HHP was used as control. The following classical analyses were performed in wine samples: pH, total and volatile acidity and alcoholic strength. Color parameters (intensity and hue), acetaldehyde, acetic acid, individual anthocyanin content, antioxidant activity and tannin mean polymerization degree (MDP) using high performance liquid polymerization (HPLC), were determined over a period of six months. Finally, a sensory analysis took place to evaluate the wines organoleptically, in which a panel of twelve trained wine tasters participated. The results indicated that HHP can have a positive impact on several characteristics of wine, such as volatile acidity, in which the samples that were pressed with HHP responded better during their storage. Overall, there were statistically significant differences between the samples, but the application of pressure at 400MPa for 15 minutes proved to be the most effective. In conclusion, HHP constitutes a promising technology for the reduction of the commonly used doses of SO₂ in wine.

Scientific area: Oenology

Key words: Mouhtaró, High Hydrostatic Pressure, HHP, SO₂, sulphur dioxide, phenolic compounds, wine preservation, mean degree of polymerization

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την ακαδημαϊκή μου σύμβουλο κα. Σταματίνα Καλλίθρακα που μου εμπιστεύτηκε την ανάθεση της συγκεκριμένης εργασίας, για τις πολύτιμες υποδείξεις της και τη συνεχή καθοδήγηση της, όπως επίσης για τη στήριξη, την υπομονή και τον πολύτιμο χρόνο που μου αφιέρωσε όποτε χρειαζόμουν την βοήθεια της. Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να πω και στο κ. Παππά Χρήστο για την βοήθειά του και τον κ. Κατσαρό Γεώργιο για την αξιολόγηση της παρούσας εργασίας.

Φυσικά δεν θα μπορούσα να παραλείψω την κα. Προξενιά Νίκη, για την ανεκτίμητη βοήθεια της και την ψυχολογική στήριξη που μου πρόσφερε όλο αυτό το διάστημα. Χωρίς την προθυμία και την υπομονή της να ενισχύσει την προσπάθεια επίλυσης των προβλημάτων που συναντήσαμε στη πορεία και τις συμβουλές της, η παρούσα διατριβή δε θα μπορούσε να ολοκληρωθεί. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις υποψήφιες διδάκτορες Ξενιά Μαριάννα και Χριστόφη Στεφανία, την διδάκτωρ Μπασαλέκου Μαριάνθη και τον μεταδιδακτορικό Μιλιόρδο Δημήτρη για την πολύτιμη βοήθεια τους και της χρήσιμες πληροφορίες καθ' όλη την διάρκεια των πειραμάτων μου.

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.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους συναδέλφους, την αδερφή μου Αλεξάνδρα, την φίλη μου Κάλλια αλλά και όλους τους φίλους και συγγενείς για την ηθική και όχι μόνο, στήριξή τους, κάνοντας αυτά τα χρόνια πιο εύκολα και όμορφα. Το μεγαλύτερο ευχαριστώ φυσικά στην οικογένειά μου και ιδιαίτερα στον πατέρα μου Παντελή, για την αγάπη και την στήριξη όλα αυτά τα χρόνια.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	3
Συντομογραφίες.....	9
Εισαγωγή.....	10
Συντήρηση Τροφίμων.....	10
Θειώδης ανυδρίτης (SO ₂).....	11
Χρήσεις θειώδους ανυδρίτη.....	13
Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα του Θειώδη Ανυδρίτη.....	14
Υποκατάστατα Θειώδους Ανυδρίτη - Εναλλακτικά Συντηρητικά.....	1
Αντιμικροβιακοί Παράγοντες.....	1
Δικαρβονικός διμεθυλεστερας (DMDC).....	1
Λυσοζύμη.....	2
Σορβικό Οξύ.....	4
Χιτοζάνη.....	5
Βακτηριοσίνες.....	6
Κολλοειδές σύμπλοκο αργύρου (CSC).....	6
Αντιοξειδωτικοί Παράγοντες.....	7
Γλουταθειόνη.....	7
Ασκορβικό Οξύ.....	8
Φαινολικές Ενώσεις.....	9
Φυτικά Εκχυλίσματα.....	11
Τεχνικές Υποκατάστασης SO ₂	12
Παλμικά ηλεκτρικά πεδία (PEF).....	12
Υπεριώδης Ακτινοβολία.....	13
Υπέρηχοι.....	14
Υψηλή Υδροστατική Πίεση (HHP).....	15
Εφαρμογές Υψηλής Υδροστατικής Πίεσης (HHP).....	16
Εφαρμογές HHP στον Οίνο.....	16
Εφαρμογές HHP στα Τρόφιμα.....	18

Μούχταρο	20
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	27
Σκοπός - Πειραματικός Σχεδιασμός	27
Οινοποίηση Σταφυλιών.....	28
Θείωση	28
Εφαρμογή Υψηλής Υδροστατικής Πίεσης (HHP)	29
Αναλύσεις Οίνων	30
Κλασικές Αναλύσεις.....	31
Προσδιορισμός της Ενεργούς Οξύτητας - pH	31
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 Ακεταλδεΐδης	32
Προσδιορισμός Ελεύθερου και Ολικού Θειώδη Ανυδρίτη	34
Ολικά Φαινολικά Συστατικά	34
Δείκτης Φαινολικών Ουσιών (ΔΦΟ).....	34
Μέθοδος Folin - Ciocalteu.....	35
Μέθοδος προσδιορισμού ταννινών με δέσμευση από πρωτεΐνες (BSA)	35
Προσδιορισμός Ολικών Ταννινών με τη μέθοδο Ribéreau - Gayon Stonestreet (1966).....	37
Μέτρηση της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας (DPPH).....	37
Προσδιορισμός Ανθοκυανών με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (HPLC)	38
Προσδιορισμός μέσου βαθμού πολυμερισμού (mDP) ταννινών με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)	39
Οργανοληπτικός έλεγχος οίνων	42
Στατιστική Επεξεργασία Αποτελεσμάτων.....	43
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	33
Κλασικές Αναλύσεις.....	33
Ελεύθερος και Ολικός Θειώδης Ανυδρίτης.....	36
Ελεύθερος SO ₂	36

Ολικός SO ₂	39
Ακεταλδεύδη.....	42
L-Μηλικό Οξύ	43
L-Γαλακτικό Οξύ.....	46
Ολικά Φαινολικά Συστατικά	49
Δείκτης Φαινολικών Ουσιών (ΔΦΟ).....	49
Μέθοδος Folin-Ciocalteu.....	52
Αντιοξειδωτική Ικανότητα (DPPH).....	54
Χρωματικά Χαρακτηριστικά των οίνων.....	57
Ένταση.....	57
Απόχρωση.....	61
Ανθοκυάνες με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC).....	64
Ολικές Τανίνες με τη μέθοδο Ribéreau-Gayon&Stonestreet (1966).....	70
Τανίνες με τη μέθοδο Harbertson (BSA).....	73
Μέσος βαθμός πολυμερισμού ταννινών (mDP) με μέθοδο υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)	76
Οργανοληπτικός Έλεγχος.....	81
ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	81
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	83
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ.....	83
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	88

Συντομογραφίες

%G	Ποσοστό εστεροποίησης
%P	Ποσοστό προδελφινιδινών
%vol	Αλκοολικοί βαθμοί
AU	Μονάδες Απορρόφησης
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
HHP	Υψηλή Υδροστατική Πίεση
HPLC	Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης
mDP	Μέσος βαθμός πολυμερισμού
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
PEF	Παλμικά Ηλεκτρικά Πεδία
Pn	3-O-μονογλυκοζίτης της παιονιδίνης
POD	Υπεροξειδάση
PPO	Πολυφαινολοξειδάση
Pt	3-O-μονογλυκοζίτης της πετουνιδίνης

Εισαγωγή

Συντήρηση Τροφίμων

Από τα αρχαία χρόνια εμφανίζεται το πρόβλημα της αλλοίωσης των τροφίμων να απασχολεί τους ανθρώπους. Με σκοπό την διατήρηση των ποιοτικών χαρακτηριστικών των τροφίμων αναλλοίωτων για όσο το δυνατόν μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, ο άνθρωπος ασχολήθηκε με την συντήρησή τους. Αρχικά, η συντήρηση των τροφίμων εξασφαλιζόταν αποκλειστικά με τη χρήση φυσικών προϊόντων, όπως ο υποκαπνισμός, η προσθήκη ζάχαρης, άλατος ή καρυκευμάτων, χωρίς όμως να εξασφαλίζεται ο ακριβής μηχανισμός της προστασίας που παρείχαν στα τρόφιμα (Dziezak, 1989).

Στις ημέρες μας, εμφανίζονται συνεχώς νέα προϊόντα στην αγορά, που αφορούν στην συντήρηση των τροφίμων και για τα οποία οι καταναλωτές ενδιαφέρονται ιδιαίτερα για την απόλυτη ασφάλεια τους από μικροβιολογικούς κινδύνους, θέλοντας παράλληλα να έχουν δεχθεί όσον το δυνατόν μικρότερη επεξεργασία. Επιπλέον, επιδιώκεται να μην περιέχουν συντηρητικά και να είναι υψηλής οργανοληπτικής αλλά κυρίως διατροφικής αξίας.

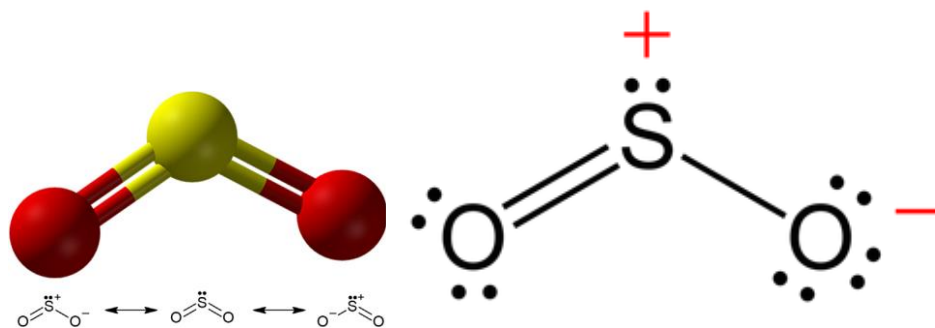
Η συμπεριφορά (ανάπτυξη/ επιβίωση/ θάνατος) των μικροοργανισμών στο περίπλοκο, θα λέγαμε, οικοσύστημα των τροφίμων είναι συνάρτηση πολλών παραγόντων. Η θερμοκρασία, η απουσία/παρουσία οξυγόνου, η υγρασία, το pH, τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά και η παρουσία τοξικών προϊόντων μικροβιακού μεταβολισμού, είναι μερικοί από τους κυρίαρχους ρυθμιστικούς παράγοντες της συμπεριφοράς των μικροοργανισμών. Οι 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. Έτσι, οι μέθοδοι συντήρησης αποσκοπούν στον έλεγχο των παθογόνων και τη διατήρηση των αλλοιογόνων μικροοργανισμών στο χαμηλότερο δυνατό επίπεδο.

Αναφορικά με τον οίνο, γνωρίζουμε ότι είναι ένα φυσικό προϊόν με υψηλή περιεκτικότητα σε αιθανόλη και χαμηλό pH, χαρακτηριστικά που συνήθως αποτελούν ανασταλτικούς παράγοντες

για την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών. Παρ' όλα αυτά, για την συντήρηση και την διατήρηση του οίνου, απαιτείται ένα πρόσθετο, ικανό να το προστατεύει από την οξείδωση και από την πιθανή ανάπτυξη μικροοργανισμών, οι οποίοι μπορούν να αναπτυχθούν στην συνθήκες του οίνου και να τον αλλοιώσουν. Παράλληλα, όμως, η τάση που επικρατεί στις ημέρες μας είναι η 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 αυτό έχει εντείνει την ανάγκη για εύρεση νέων τεχνολογιών ή φυσικών συντηρητικών ώστε να αποφευχθεί η χρήση των έως τώρα χρησιμοποιούμενων συντηρητικών.

Θειώδης ανυδρίτης (SO₂)

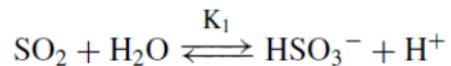
Ο θειώδης ανυδρίτης ή διοξείδιο του θείου (SO₂) (Εικόνα 1) χρησιμοποιείται από τα τέλη του 18^{ου} αιώνα ως συντηρητικό (Santos *et al.*, 2012), ενώ στην οινολογία αρχίζει να εφαρμόζεται από τον 19^ο αιώνα και μετά. Πριν όμως κι από εκείνη την περίοδο, για την καλύτερη συντήρηση του οίνου κατά την μεταφορά του, ήδη πραγματοποιούνταν θειώσεις των βαρελιών (Giacosa *et al.*, 2019). Σήμερα, ο θειώδης ανυδρίτης, αποτελεί το πιο σημαντικό και ευρέως χρησιμοποιούμενο συντηρητικό στην οينوποίηση και η πλήρης αντικατάσταση του καθίσταται σχεδόν αδύνατη, λόγω των πολλών ιδιοτήτων του. Επιπλέον, σπάνια υφίσταται ολική απουσία του SO₂ από τον οίνο, 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 προστίθεται στον οίνο, αποτελείται από τον ελεύθερο και τον δεσμευμένο θειώδη ανυδρίτη. Ο ελεύθερος θειώδης ανυδρίτης σε υδατικά διαλύματα

διίσταται (Σχήμα 1) και στο pH των οίνων (3,0 - 4,0) βρίσκεται σε τρεις μορφές: τη μοριακή (SO_2), η οποία είναι και περισσότερο δραστική, και τις ιοντικές, το όξινο θειώδες ανιόν (HSO_3^-) και το θειώδες ανιόν (SO_3^{2-}) (Fugelsang and Edwards, 2007).



Σχήμα 1: Αμφίδρομη αντίδραση του θειώδη ανυδρίτη.

Η παραπάνω διάσταση (Σχήμα 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. Ο ελεύθερος θειώδης ανυδρίτης προκύπτει από το άθροισμα των τριών μορφών (μοριακού και ιοντικών). 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, που είναι 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).

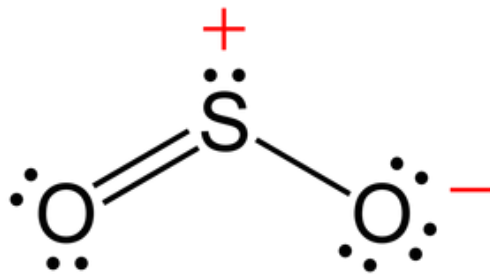
Επιπλέον, στον οίνο, ο θειώδης ανυδρίτης έχει την ιδιότητα να ενώνεται με ουσίες που διαθέτουν καρβονυλομάδες, παράγοντας ασταθείς ή σταθερές ενώσεις. Έτσι αντιδρά με σάκχαρα, πτητικές ουσίες, πρωτεΐνες και ανθοκυάνες δίνοντας ασταθείς ενώσεις και με την ακεταλδεΐδη σχηματίζοντας σταθερές ενώσεις. Ο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

Ο ελεύθερος θειώδης είναι αποκλειστικά υπεύθυνος για τις περισσότερες ιδιότητες του θειώδους ανυδρίτη. 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 (Stavroura Kourakou – Dragona, 1998, Θέματα Οινολογίας). Αντίθετα, ο ενωμένος SO_2 είναι ανενεργός και δεν έχει καμία από τις πολύτιμες ιδιότητες του ελεύθερου SO_2 για αυτό και θεωρείται "παθητικός". Αυξάνει τον ολικό θειώδη ανυδρίτη χωρίς να προσφέρει ουσιαστικές υπηρεσίες. Ωστόσο, οι

ασταθείς ενώσεις που σχηματίζει ο θειώδης ανυδρίτης είναι χρήσιμες, καθώς αποθηκεύουν τον θειώδη και όταν επέρχεται μείωση του ελεύθερου SO₂ στους οίνους, υδρολύονται απελευθερώνοντας τον (Ribereau-Gayon *et al.*, 2006).

Χρήσεις θειώδους ανυδρίτη

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



Εικόνα 1: Μοριακός θειώδης ανυδρίτης

Ο SO₂ χρησιμοποιείται ευρέως από διάφορες βιομηχανίες τροφίμων, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις τροφών με χαμηλό pH, όπως χυμοί φρούτων και αλκοολούχα ποτά. Στην οινική βιομηχανία έχει πρωταγωνιστικό ρόλο και προστίθεται ταυτόχρονα με την μεταφορά του σταφυλοπολτού σε δεξαμενές ή στο πιεστήριο για προστασία από ανεπιθύμητα βιολογικά και φυσικοχημικά φαινόμενα. Η αντισηπτική του δράση μπορεί να περιγραφεί γενικά ως αναστολή της ανάπτυξης όλων των τύπων μικροοργανισμών, όπως είναι οι ζύμες, τα γαλακτικά βακτήρια και τα οξικά βακτήρια. Επίσης, η ένωση αυτή εμποδίζει την ανεπιθύμητη έναρξη μηλογαλακτικής ζύμωσης, αναστέλλει την ανάπτυξη *Brettanomyces* και μικροδερμικών ζυμών, και προφυλάσσει τους οίνους από διάφορα ελαττώματα βακτηριακής προέλευσης (Bakker *et al.*, 1998; MacHado, Toledo, & Vicente, 2009). Σαν αντιοξειδωτικό, η ένωση αυτή μπορεί να δράσει άμεσα ή έμμεσα με διάφορους τρόπους. Άμεσα, αφού αντιδρά με το οξυγόνο και το

υπεροξειδίο του υδρογόνου, οξειδώνεται ο ίδιος και έτσι προφυλάσσει άλλα ευοξειδωτα συστατικά του οίνου. Δύναται ακόμη να ανάξει τις κινόνες που σχηματίζονται μέσω διεργασιών οξειδωσης πίσω στη φαινολική τους μορφή. Έμμεσα, δρα απενεργοποιώντας τις οξειδάσες, ένζυμα που καταλύουν αντιδράσεις οξειδωσης (Oliveira *et al.*, 2011). Απενεργοποίηση άλλων ενζύμων από το SO₂, όπως πολυφαινολοξειδάσες, περοξειδάσες και πρωτεάσες, όπως επίσης και αναστολή της αντίδρασης αμάβρωσης Maillard, προστατεύουν τους οίνους από το καφέτιασμα (Garde- Cerdan *et al.*, 2008; Mayen, Merida, & Medina, 1996). Παρουσία του επίσης, καθιζάνουν διάφορα κolloειδή και καθυστερεί η έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης, δίνοντας έτσι χρόνο για απολάσπωση του γλεύκους, με τελικό αποτέλεσμα ένα πιο διαυγές τελικό προϊόν.

Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα του Θειώδη Ανυδρίτη

Το SO₂ διευκολύνει την εκχύλιση πρωτογενών αρωματικών συστατικών, χρωστικών και φαινολικών ενώσεων από τον φλοιό των σταφυλιών και βοηθάει την σταθεροποίηση του χρώματος του οίνου 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 ακεταλδεΐδη (Ribereau-Gayon *et al.*, 2006), ενώ σε μικρότερο βαθμό αντιδρά με ανθοκυάνες, κινναμωμικά οξέα και ανάγοντα σάκχαρα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την μείωση του βαθμού πολυμερισμού των φαινολικών και απώλεια του χρώματος, που παρατηρείται συνήθως κατά την παλαίωση. 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, να αυξήσει την αίσθηση 'σκληρότητας' των οίνων λόγω σχηματισμού θειικών αλάτων, αλλά και σε μεγάλες συγκεντρώσεις 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 ποιότητα του οίνου. Επιπλέον, τα θειώδη που προέρχονται από την προσθήκη θειώδους ανυδρίτη στον οίνο έχουν συσχετιστεί με αλλεργικές αντιδράσεις ή και με δυσανεξία σε ορισμένους

καταναλωτές (Timbo et al., 2004; H. Vally, Misso, & Madan, 2009; Vally, & Thompson, 2003; Vally & Thompson, 2001). 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). Έντονα συμπτώματα σε μη-ασθματικά άτομα είναι σπάνια (H. Vally & Thompson, 2001), ενώ ασθματικά άτομα που είναι εξαρτημένα από στεροειδή ή με υπερδραστηριοποίηση των αεραγωγών, δύναται να έχουν μεγαλύτερο ρίσκο αλλεργικής αντίδρασης στα θειώδη.

Λόγω λοιπόν 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-Ruizetal., 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).

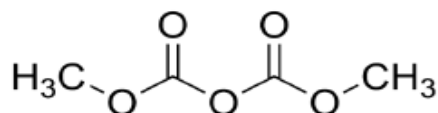
Συνεπώς, έχοντας επίγνωση όλων των παραπάνω, έχει γεννηθεί η ανάγκη για την ανεύρεση εναλλακτικών συντηρητικών ή καινοτόμων τεχνολογιών που να αντικαθιστούν, εν μέρει εάν όχι πλήρως, τον θειώδη ανυδρίτη ή να δρουν συνεργιστικά μαζί του ώστε να επιτευχθεί η μείωση της χρήσης του. Ωστόσο, η προϋπόθεση για την αντικατάσταση του είναι να παρέχεται παρόμοιο αντισηπτικό αποτέλεσμα και αντιοξειδωτική δράση, εξασφαλίζοντας ένα ποιοτικό τελικό προϊόν, αλλά χωρίς να υπάρχουν αρνητικές συνέπειες στην ανθρώπινη υγεία.

Υποκατάστατα Θειώδους Ανυδρίτη - Εναλλακτικά Συντηρητικά

Αντιμικροβιακοί Παράγοντες

Δικαρβονικός διμεθυλεστέρας (DMDC)

Ο δικαρβονικός διμεθυλεστέρας (DMDC) είναι μια οργανική ένωση (Εικόνα 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 2: Μοριακή δομή του Δικαρβονικού Διμεθυλεστέρα (DMDC).

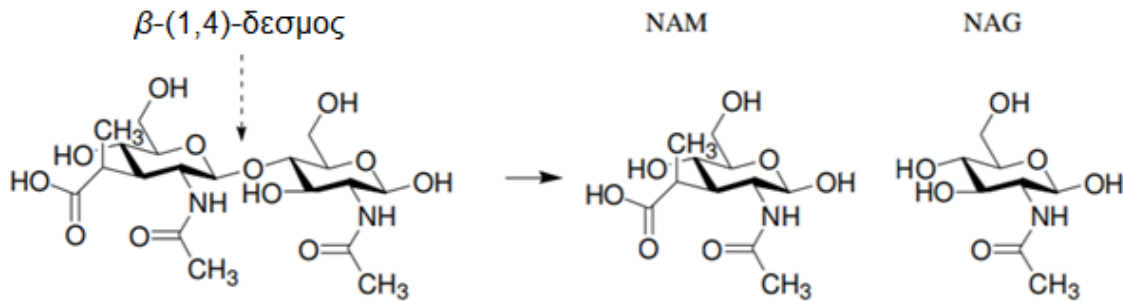
Βασικές του δράσεις του DMDC είναι η αναστολή συγκεκριμένων ενζύμων που εμπλέκονται στη γλυκόλυση των ζυμών, όπως η αλκοολική-αφυδρογονάση και η αφυδρογονάση της 3-φωσφογλυκεραλδεύδης, αλλά και μεθοξυκαρβονυλίωση πυρηνόφιλων ενώσεων (ιμιδαζόλια, αμίνες και θειόλες), με αποτέλεσμα την αναστολή της κυτταρικής αύξησης (Renouf *et al.* 2008). Η αποτελεσματικότητά του εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως τα στελέχη, η αρχική συγκέντρωση των κυττάρων (συνιστάται να χρησιμοποιείται σε μέγιστο αριθμό 500 βιώσιμων κυττάρων / mL οίνου), η θερμοκρασία, η περιεκτικότητα σε αιθανόλη και το pH (Daudt and Ough, 1980, Ough *et al.*, 1978, 1988, Porter and Ough, 1982, Threlfall and Morris, 2002). 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 *Dekkerabruxellensis* ή *Zygosaccharomycesbailii* (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), μια πολύ τοξική ένωση, επικίνδυνη 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 την διακοπή της ζύμωσης 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.

Λυσοζύμη

Η λυσοζύμη, γνωστή και ως μουραμιδάση, είναι μια πρωτεΐνη (υδρολάση γλυκοζιτών) 129 αμινοξέων που εμφανίζεται στο 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 χρήση της στην οινική βιομηχανία έχει μελετηθεί λόγω της μέγιστης σταθερότητας και ενεργότητας της σε pH 2.8 - 4.2 (Delfini *et al.*, 2004). 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) στην πεπτιδογλυκάνη (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).

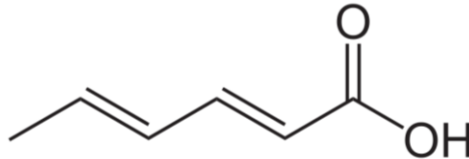


Σχήμα 2: Το ένζυμο υδρολύει τον 1-4 γλυκοσιδικό δεσμό μεταξύ εναλλασσόμενων άκρων N-ακετυλογλυκοσαμίνης (NAG) και N-ακετυλομουραμικού οξέος (NAM).

Συνεπώς, η λυσοζύμη χρησιμεύει για τον έλεγχο των γαλακτικών βακτηρίων στον οίνο (Gram θετικά βακτήρια). Βέβαια, δεν επιτυγχάνεται η τέλεια σταθεροποίηση του οίνου καθώς, ανεξάρτητα από την δόση η οποία θα προστεθεί, δεν καταστρέφει όλα τα βακτήρια (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). Μερικές ερευνητικές ομάδες, έχουν παρατηρήσει ότι η λυσοζύμη είναι πιο αποτελεσματική σε λευκούς οίνους σε σχέση με ερυθρούς (Bartowsky *et al.*, 2004). 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 (NiandZhong 2003, OIV 2009). Η προσθήκη λυσοζύμης αφήνει ανεπηρέαστο το αρωματικό προφίλ (Bartowsky *et al.*, 2004), διατηρώντας ταυτόχρονα χαμηλά επίπεδα πτητικής οξύτητας και βιογενών αμινών (Sonni *et al.*, 2009). Τέλος, αξίζει να αναφέρουμε ότι η λυσοζύμη, δεν μπορεί να αντικαταστήσει πλήρως το SO₂, διότι δεν έχει αντιοξειδωτική δράση και αυτό θα μπορούσε να προκαλέσει οξείδωση και αμαύρωση κυρίως στον λευκό οίνο (Pilatte *et al.*, 2000, Matito *et al.*, 2003, Pilatte 2005). Παρόλα αυτά, το προστιθέμενο κόστος στην οινοποίηση αλλά και το ρίσκο για αλλεργίες των καταναλωτών στα αυγά, έχουν περιορίσει το ενδιαφέρον των οινοπαραγωγών.

Σορβικό Οξύ

Το σορβικό οξύ (Εικόνα 3) 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).

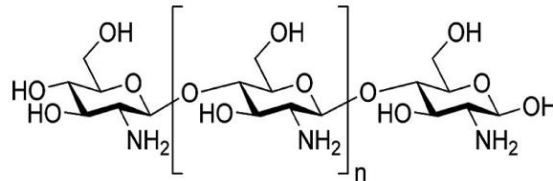


Εικόνα 3: Μοριακή δομή του 2,3-εξαδιενοϊκού οξέος (σορβικό οξύ).

Το σορβικό οξύ είναι ένας αντιμυκητιακός παράγοντας που μπορεί να προστεθεί ως σορβικό κάλιο. Το άλας καλίου χρησιμοποιείται συνήθως επειδή είναι πιο διαλυτό, σταθερό και εύκολο να παραχθεί. Η συνήθης χρήση του είναι 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, έχει 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 ουσίας 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.

Χιτοζάνη

Η χιτοζάνη είναι ένα γραμμικό πολυμερές *D*-γλυκοζαμίνης συνδεδεμένο με β-1,4 δεσμούς (Εικόνα 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

Η χιτοζάνη αποτελεί ένα μη τοξικό, βιοδιασπώμενο βιοπολυμερές με αξιοσημείωτη ισχύ χηλίωσης μετάλλων που λόγω της πολυκατιονικής του φύσης αλλά και της παρουσίας αμινοομάδων και υδροξυλομάδων στο μόριο του (Εικόνα 4), παρουσιάζει αντιμικροβιακή δράση. Αυτές οι δύο ιδιότητες προσελκύουν 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).

Οι Taillandier *et al.* (2015) ισχυρίστηκαν 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 εξάλειψή 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 πεπτιδία 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 δραστικότητα 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)

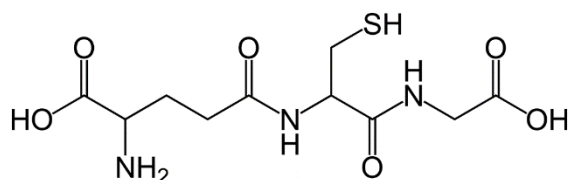
Οι Izquierdo-Cañas *et al.* (2012) χρησιμοποίησαν πειραματικά το σύμπλοκο κολλοειδούς αργύρου (CSC, CAgC) για την αντικατάσταση του SO₂ στην ερυθρή οινοποίηση. Οι ερευνητές παρατήρησαν ότι το σύμπλοκο CSC δρα παρόμοια με το SO₂ έναντι των μικροοργανισμών, μειώνοντας ταυτόχρονα την περιεκτικότητα σε αιθανόλη. 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-Cerda'n *et al.* (2014), σχετικά με την παραγωγή οίνου Tempranillo επιβεβαίωσε αυτή την τάση της μείωσης των ανθοκυανών. Ωστόσο, απαιτείται περαιτέρω μελέτη για την εφαρμογή αυτού του προσθέτου στους ερυθρούς οίνους που πρόκειται να παλαιωθούν σε δρύινα βαρέλια, λόγω της μείωσης της φαινολικής περιεκτικότητας των ερυθρών οίνων στους οποίους είχε προστεθεί CSC. 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, όπως και για τους ερυθρούς οίνους, απαιτείται περαιτέρω μελέτη και για την παραγωγή λευκών οίνων, εξετάζοντας 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

Η γλουταθειόνη αποτελεί ένα ελπιδοφόρο μόριο για την αντικατάσταση του SO₂, όσον αφορά την αντιοξειδωτική του δράση (GSH, Εικόνα 5). Η γλουταθειόνη είναι ένα τριπεπτιδίο αποτελούμενο από L-γλουταμινικό οξύ, L-κυστεΐνη και γλυκίνη. Αποτελεί ένα φυσικό αντιοξειδωτικό που περιέχεται στα σταφύλια και παίζει βασικό ρόλο στην οινοποίηση. 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 συμπαράγοντας για αρκετά αντιοξειδωτικά ένζυμα, όπως η υπεροξειδάση GSH, η αναγωγή 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 άχρωμες ορθοφαινόλες (Singleton *et al.*, 1985, Antoce, 2007). Με την προσθήκη της GSH, τα αρωματικά χαρακτηριστικά των οίνων κατά κύριο λόγο βελτιώνονται (duToit *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).

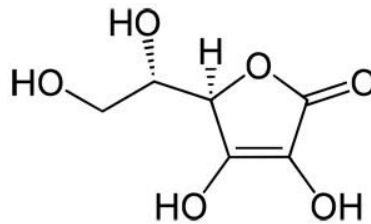
Ωστόσο, η γλουταθειόνη ως μια πηγή θείου μπορεί να δημιουργήσει ανεπιθύμητες οσμές. Πραγματοποιήθηκαν ορισμένες μελέτες που αφορούσαν την πιθανότητα της γλουταθειόνης να είναι πηγή υδρόθειου (H_2S). Αυτό είναι δυνατόν να συμβεί διότι η κυστεΐνη, ένα από τα αμινοξέα που την αποτελούν, μπορεί να αποικοδομηθεί 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 (Gambutì *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 (Εικόνα 6) είναι ένα άλλο αντιοξειδωτικό, μια ισχυρά αναγωγική ένωση, η οποία χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο κατά την λευκή 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 ασκορβικού οξέος μπορούν να αντιμετωπιστούν θολώματα σιδήρου, αφού σαν αναγωγική ένωση, μπορεί να μετατρέψει τα τρισθενή ιόντα σιδήρου (Fe^{+3}) σε δισθενή (Fe^{+2}) (Τσακίρης, 1998).

Παρουσία μεγάλης ποσότητας οξυγόνου, το ασκορβικό οξύ οξειδώνεται και σχηματίζεται υπεροξειδίο του υδρογόνου (ισχυρό οξειδωτικό) και μερικές φορές και άλλα υπεροξειδία, 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).

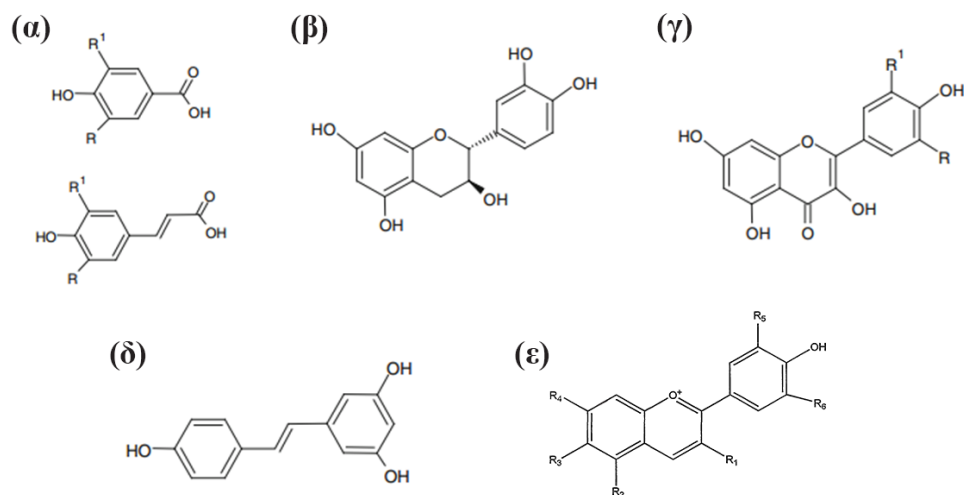
Επομένως, το ασκορβικό οξύ χρησιμοποιείται μόνο σε συνδυασμό με το SO₂ για να δεσμεύσει το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H₂O₂) που παράγεται από την οξείδωση του ασκορβικού οξέος (Bradshaw *et al.*, 2011). Η χρήση αυτού του αντιοξειδωτικού δεν συνιστάται χωρίς την παρουσία επαρκών δόσεων ελεύθερου SO₂. Στην ερυθρή οινοποίηση, η αφθονία των ταννινών και το χαμηλότερο ελεύθερο SO₂ που υφίσταται, αποτελεί σοβαρό εμπόδιο στη χρήση του ασκορβικού οξέος (Giacosa *et al.*, 2019).



Εικόνα 6: Μοριακή δομή ασκορβικού οξέος

Φαινολικές Ενώσεις

Οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν μια πολύ σημαντική ομάδα ενώσεων για τον οίνο, καθώς οι κύριες φαινολικές ενώσεις (Εικόνα 7), δηλαδή τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή, τα στυλβένια, οι τανίνες και οι ανθοκυάνες είναι υπεύθυνες για πολλά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου, όπως 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 υπεροξειδίο του υδρογόνου. Αυτή η διαδικασία καταλύεται από τον κύκλο οξειδοαναγωγής Fe³⁺ / Fe²⁺ 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) στιλβένια, ε) ανθοκυάνες

Τα τελευταία χρόνια, έχουν διεξαχθεί έρευνες για την πιθανή αντικατάσταση του SO₂ από τις φαινολικές ενώσεις, λόγω της αντιοξειδωτικής και αντιμικροβιακής τους δράσης. Έχει παρατηρηθεί ότι η προσθήκη οινολογικών ταννινών, μπορεί να επηρεάσει τα οξειδωτικά φαινόμενα στο γλεύκος και στον οίνο, πιθανόν μέσω ενός διπλού μηχανισμού ενζυμικής αναστολής, απεντοπισμού και σταθεροποίησης των ελευθέρων ριζών (Sonni *et al.*, 2009). Η προσθήκη ταννινών 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 ταννινών (γαλοταννινών και προκυανιδινών) δεν επέφερε καμία βελτίωση στα χρωματικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των ερυθρών οίνων, ενώ αντίθετα αύξησαν το κίτρινο χρώμα και μείωσαν την αρωματική ένταση (Cejudo-Bastante *et al.*, 2010).

Φαινολικά εκχυλίσματα που λήφθηκαν από οινολογικά προϊόντα παρουσίασαν αντιμικροβιακή δράση έναντι των στελεχών *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* και *Candida albicans* (Bartowsky *et al.*, 2009, Παπαδοπούλου *et al.*, 2005). Επίσης, τα φαινολικά οξέα και τα φλαβονοειδή δρουν αποτελεσματικά έναντι παθογόνων βακτηρίων (Garcia-Ruiz *et al.*, 2008, Bartowsky *et al.*, 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

και στην δημιουργία συμπλόκων με τις πρωτεΐνες (συμπεριλαμβανομένων των ενζύμων) των μικροοργανισμών (Campos *et al.*, 2009).

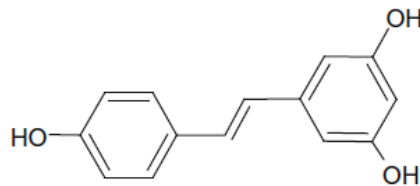
Οι διαφορετικές επιδράσεις των φαινολικών ενώσεων έχουν σχέση με τις διαφορές στη δομή τους, τον λιπόφιλο χαρακτήρα τους και ιδιαίτερα τη συγκέντρωση στην οποία προστίθενται (Campos *et al.*, 2009; Vaquero *et al.*, 2007). Έτσι σε μια μελέτη που διεξήχθη, οι φλαβανόλες και τα στυλβένια παρουσίασαν μεγαλύτερη 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 (ιζώδες) 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 τον πολυμερισμού των ανθοκυανών και εμφάνιζαν ελαφρώς υψηλότερη μείωση ταννινών. 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% στυλβένια (Εικ. 8) σε σύγκριση με ένα μάρτυρα που πρόσθεσαν SO_2 (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 (SO_2). 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 SO_2 . Τέλος, απαιτείται περαιτέρω έρευνα για να αξιολογηθούν και να πιστοποιηθούν αυτά τα προϊόντα ώστε να εισχωρήσουν στην οινική βιομηχανία.



Εικόνα 8: Μοριακή δομή στυλβενίου, η trans-ρεζερβατρόλη.

Τεχνικές Υποκατάστασης SO_2

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, Begumetal., 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 υπέρηχους, λαμβάνει χώρα κυρίως μέσω φυσικών ή/και χημικών φαινομένων (O'Donnell *et al.*, 2010; Riyasena *et al.*, 2003; Tiwari *et al.*, 2009b). Πιο συγκεκριμένα, οι υπέρηχοι 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 υπέρηχου. 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 Jiranek *et al.* (2008) αναφέρουν επίσης ότι η επεξεργασία με υπέρηχους 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 αυτόλυση ζυμών και να προωθήσει την μηλογαλακτική ζύμωση. Επίσης, οι υπέρηχοι 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)

Η υψηλή υδροστατική πίεση (HHP) αποτελεί 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 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, SmeltJ., 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, καθίσταται 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 οινικό τομέα, η χρήση της υψηλής υδροστατικής πίεσης έχει ήδη δοκιμαστεί για τη διατήρηση της ποιότητας του χυμού σταφυλιών, του γλεύκου (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 (*Leuconostocoenos*, *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 δραστικότητα 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 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, DelPozo-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 οξειδωσης 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 ΗΗΡ 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 ΗΗΡ απενεργοποιεί τους μικροοργανισμούς *Salmonella*, *E. Coli* και *L. monocytogenes* σε ρευστά και ημίρρευστα 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).

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 (Stavrakaki και Biniari, 2017) και σχετικά πρόσφατα αποδείχθηκε ότι σχετίζεται στενά με την ποικιλία Μαύρη Κουντούρα (Merkourouros *et al.*, 2015). Χαρακτηριστικό της ποικιλίας είναι οι χαμηλές αποδόσεις, με αποτέλεσμα να είχε εγκαταλειφθεί για αρκετά χρόνια από τους οινοπαραγωγούς. Τα τελευταία



Εικόνα 10α: Ποικιλία Μούχταρο

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 ταννίνες και αρώματα μαύρων και κόκκινων φρούτων, βοτάνων και φυτικότητα. Απαντάται επίσης με τα ονόματα: Μουχτούρι, Μοχτάρι, Μαύρο Αραχωβίτικο, Μουχτάρμα και Μούχτουρο.

Αμπελογραφικά χαρακτηριστικά:



Εικόνα 10β: Ποικιλία Μούχταρο

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

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

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

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

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.

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.

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 και 40mg/L SO_2 και υποβλήθηκαν σε HHP (0, 200 και 400 MPa για 0, 5 και 15 λεπτά).

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 και για διάστημα έξι μηνών (0, 3 και 6 μήνες) από την οινοποίηση, ώστε να αξιολογηθεί η εφαρμογή της Υψηλής Υδροστατικής Πίεσης σε συνδυασμό με τον 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. Στις 17 Σεπτεμβρίου 2018, έγινε η συγκομιδή των σταφυλιών και έπειτα 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 κρυσταλλοποίηση 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). Δύο με τρεις φορές ημερησίως γινόταν σπάσιμο του καπέλου (punch down). Η παρακολούθηση της πορείας της αλκοολικής ζύμωσης έγινε με καθημερινές μετρήσεις των βαθμών Brix^o και της θερμοκρασίας (T) ενώ παράλληλα έγινε η απαραίτητη προσθήκη οργανικού και ανόργανου αζώτου στα μέσα περίπου της αλκοολικής ζύμωσης (24.09.2018) 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 (27.09.2018) ο οίνος παραλήφθηκε με μετάγγιση και απολασπώθηκε και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μηλογαλακτική ζύμωση.

Θείωση

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) 0.8g/L ώστε ο τελικός ολικός θειώδης ανυδρίτης να βρίσκεται σε συγκέντρωση 40ppm. Η κωδικοποίηση που χρησιμοποιήθηκε για τα διαφορετικά δείγματα φαίνεται παρακάτω στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1: Κωδικοποίηση Δειγμάτων.

Κωδικός	SO ₂	Πίεση		Χρόνος Πίεσης (min)
Control	40 ppm	X	X	
0'/200	40 ppm	✓	200MPa	0'
0'/400	40 ppm	✓	400MPa	0'
0'/600	40 ppm	✓	600MPa	0'
5'/200	40 ppm	✓	200MPa	5'
5'/400	40 ppm	✓	400MPa	5'
5'/600	40 ppm	✓	600MPa	5'
15'/200	40 ppm	✓	200MPa	15'
15'/400	40 ppm	✓	400MPa	15'
15'/600	40 ppm	✓	600MPa	15'

Εφαρμογή Υψηλής Υδροστατικής Πίεσης (HHP)

Ο μισός όγκος κάθε δεκάλιτρου περιέκτη (5L) μεταφέρθηκε σε περιέκτες πολυαιθυλενίου (Εικόνα 11), οι οποίοι τοποθετήθηκαν μέσα σε δοχεία κατάλληλα για το όργανο εφαρμογής υψηλής υδροστατικής πίεσης (Εικόνα 12). Τα δείγματα υποβλήθηκαν σε πίεση 400 MPa για πέντε λεπτά σε θερμοκρασία 20°C.



Εικόνα 11: Τα δείγματα οίνου συσκευασμένα στους κατάλληλους περιέκτες πολυαιθυλενίου.



Εικόνα 12: Τα δείγματα οίνου συσκευασμένα σε περιέκτες πολυαιθυλενίου και μέσα στο δοχείο για το όργανο εφαρμογής ΗΗΡ

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 ακεταλδεΐδης, L-μηλικού οξέος και L-γαλακτικού οξέος για όλα τα δείγματα με την βοήθεια του ημιαυτόματου αναλυτή 'ONE Analyzer' από την εταιρία

STEROGLASS. 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

Ως 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 HANNAHI 112.

Προσδιορισμός Ολικής ή Ογκομετρούμενης Οξύτητας

Ως 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 CO_2 και το SO_2 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 απορρόφησης τους παρουσιάζουν ένα μέγιστο στα 520 nm, το οποίο ελαττώνεται με την παλαιώση 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 ταννίνες 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 (I) 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 (H) προκύπτει από τον λόγο της απορρόφησης του γλεύκου ή του οίνου στα 420 nm, προς την απορρόφηση στα 520 nm (Glories 1984, Sudraud 1958).

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

Προσδιορισμός Ακεταλδεΐδης

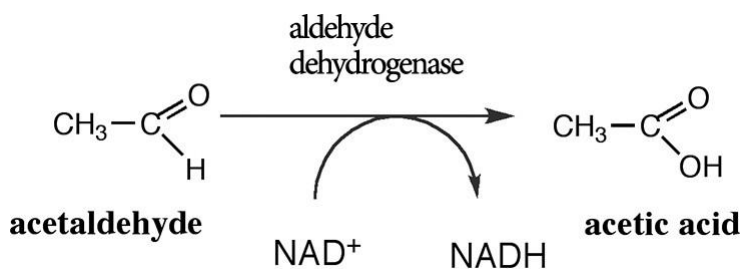
Η ακεταλδεΐδη (CH₃CHO) είναι μια από τις σημαντικότερες καρβονυλικές ενώσεις που παράγονται κατά την ζύμωση, για το οργανοληπτικό προφίλ των οίνων. Τα επίπεδα ακεταλδεΐδης στον οίνο ποικίλλουν, με τον μέσο όρο για τους ερυθρούς οίνους να ανέρχεται στα 30 mg/L, ενώ για λευκούς και γλυκείς οίνους η τιμή αυτή ανέρχεται στα 80mg/L και 300mg/L αντίστοιχα. Χαρακτηριστικά, η ακεταλδεΐδη αποτελεί το 90% περίπου των αλδεΐδικών ενώσεων που υπάρχουν στους οίνους (McCloskey & Mahaney, 1981). Σε χαμηλά επίπεδα δίνει ένα ευχάριστο φρουτώδες άρωμα, αλλά σε υψηλές συγκεντρώσεις έχει αρνητική επίδραση στο οργανοληπτικό προφίλ των οίνων και θεωρείται

ανεπιθύμητη (Miyake & Shibamoto, 1993). Τα όρια ανίχνευσής της στους οίνους είναι 100-125 mg/L (Zoecklein, *et al.*, 1995). Η ακεταλδεΐδη λόγω υψηλής δραστηριότητας, αντιδρά με τα αμινοξέα και σχηματίζονται έτσι διάφορες αρωματικές ενώσεις (Griffith & Hammond, 1989).

Η προέλευσή της μπορεί να είναι είτε χημική, είτε μικροβιολογική. Μικροβιολογικά μπορεί να παραχθεί ως παραπροϊόν κατά την ζύμωση, με τα επίπεδα να ποικίλλουν ανάλογα το στέλεχος που χρησιμοποιείται (Margalith, 1981). Αν και τα σάκχαρα σε αυτή την περίπτωση θεωρούνται το βασικότερο υπόστρωμα για τον σχηματισμό της, ο μεταβολισμός αμινοξέων, όπως η αλανίνη, συνεισφέρει επίσης στην αύξηση των επιπέδων της κατά την ζύμωση (Henschke, P.A. & Jinarek, 1993). Οι παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή ακεταλδεΐδης από ζύμες είναι η θερμοκρασία, το pH και οι συγκεντρώσεις σακχάρων, διοξειδίου του θείου και οξυγόνου (Ough & Amerine, 1958). Χημικά, η ακεταλδεΐδη μπορεί να παραχθεί μέσω οξείδωσης της αιθανόλης από το οξυγόνο ή από ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό, όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂). Το H₂O₂ μπορεί να παραχθεί στους οίνους, τόσο από οξείδωση του ασκορβικού οξέος, όσο και από οξείδωση φαινολικών ουσιών.

Εκτός από την επίδραση που μπορεί να έχει στο αρωματικό προφίλ των οίνων, η ακεταλδεΐδη επηρεάζει σημαντικά το χρώμα και την σταθερότητά του. Σε μικρές συγκεντρώσεις, επιταχύνει τις αντιδράσεις πολυμερισμού μεταξύ ανθοκυανών και ταννινών, που οδηγεί σε μεγαλύτερη ένταση χρώματος, σταθερότητα, μείωση της πικράδας και της στυπτικότητας. Επίσης, μπορεί να δεσμεύσει το SO₂, το οποίο είναι υπεύθυνο για τον αποχρωματισμό των ανθοκυανών, ενισχύοντας έμμεσα την σταθερότητα του οίνου (Ribereau-Gayon, Paul & Glories, 1983). Αντίθετα, περαιτέρω αντίδρασή της με πολυμερισμένες ταννίνες, μπορεί να οδηγήσει στην αποσταθεροποίησή τους, σε σχηματισμό θολώματος, καταβύθισή τους ή και μείωση της έντασης (Somers, 1972). Τέλος, η εξωγενής προσθήκη ακεταλδεΐδης, αναστέλλει την ανάπτυξη ζυμών και την αλκοολική ζύμωση (Stanley & Pamment, 1993).

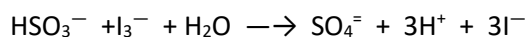
Ο προσδιορισμός της ακεταλδεΐδης πραγματοποιήθηκε ενζυμικά. Το ένζυμο Al-DH (aldehyde dehydrogenase) καταλύει της οξείδωση της ακεταλδεΐδης σε οξικό οξύ παρουσία NAD. Το NAD μετατρέπεται σε NADH αυξάνοντας έτσι την απορρόφηση στα 340nm. Η αύξηση αυτή είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της ακεταλδεΐδης στο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



Εικόνα 13: Ενζυμική μετατροπή της ακεταλδεΐδης σε οξικό οξύ από την Al-DH.

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 : $\text{SO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HSO}_3^- + \text{H}^+$ 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, αλδεΐδες 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)

Για τον υπολογισμό των ολικών φαινολικών ουσιών, εφαρμόστηκε η μέθοδος ΔΦΟ όπως περιγράφεται από τους Flanzly M. και Roux C. (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, ταννίνες), 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

Η μέθοδος Folin – Ciocalteu που ακολουθήσαμε, είναι η επίσημη μέθοδος του ΟΙV και πρόκειται για φωτομετρική μέθοδο που βασίζεται στην οξειδωση των φαινολικών ενώσεων του οίνου, από το αντιδραστήριο Folin - Ciocalteu. Χρησιμοποιείται για την μέτρηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου χωρίς να γίνεται διάκριση μεταξύ μονομερών, διμερών ή μεγαλύτερων φαινολικών συστατικών. Το κύριο αντιδραστήριο της μεθόδου, το αντιδραστήριο Folin - Ciocalteu, είναι διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων, που σχηματίζονται από φωσφο-μολυβδαινικά ($H_3PMo_{12}O_{40}$) και φωσφο-βολφραμικά ($H_3PW_{12}O_{40}$) ετεροπολυμερή οξέα. Τα φαινολικά ιόντα, οξειδώνονται με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων. Κατά την οξειδωση των φαινολών, το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu ανάγεται προς μείγμα κυανών οξειδίων του βολφραμίου (W_8O_{23}) και του μολυβδαινίου (Mo_8O_{23}). Το σχηματιζόμενο κυανό χρώμα παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση περίπου στα 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 ταννινών με δέσμευση από πρωτεΐνες (BSA)

Η μέθοδος προσδιορισμού των ταννινών των δειγμάτων οίνου, έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται από τους Harbertson *et al.* (2002). Η συγκεκριμένη μέθοδος μετράει το σύνολο των ταννινών δείγματος οίνου ή ράγας και βασίζεται στην συγκάθιση της αλβουμίνης του ορού βοοειδών (Bovineserum albumin BSA) και του ενζύμου αλκαλική φωσφατάση (Harberston και Adams, 1999). Οι ταννίνες 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 μ L 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 μ L μη πρωτεϊνικού διαλύματος, χωρίς να διαταραχθεί το ίζημα. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 min στις 13500 rpm και στη συνέχεια το υπερκείμενο απομακρύνεται. Στο ίζημα προστίθενται 875 μ L 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 μετριέται η απορρόφηση στα 510 nm (A1) με κυψελίδα στένωσης. Στη συνέχεια προστίθενται 125 μ L διαλύματος FeCl_3 και μετά από 15 min μετριέται 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: $A_{510}: A_2 - A_1$.

Στη συνέχεια από την καμπύλη αναφοράς υπολογίζεται η συγκέντρωση των ταννινών του αραιωμένου δείγματος, έστω C1, και εκφράζονται σε ισοδύναμα κατεχίνης. Για την τελική συγκέντρωση ταννινών, 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 (μ L)	Διάλυμα TEA-SDS (μ L)	Διάλυμα FeCl_3 (μ L)
10	10	865	125
25	25	850	125
50	50	825	125
100	100	775	125
150	150	725	125

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

Για τον προσδιορισμό των ταννινών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των Ribéreau-Gayon and Stonestreet (1966) και στηρίζεται στην ιδιότητα των ταννινών 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 ταννινών (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, μετρώνται οι οπτικές πυκνότητες των δύο δειγμάτων στα 550 nm, σε πλαστικές κυψελίδες με μάρτυρα το νερό. Η συγκέντρωση των ταννινών 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:

$$\text{Ταννίνες (g/L)} = (d_2 - d_1) * 19.35$$

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

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 dH_2O σε αναλογία 1:10) και 1950 μL διαλύματος DPPH. Ακολουθείται ανάδευση σε vortex και μέτρηση της απορρόφησης στα 515 nm με μάρτυρα dH_2O σε χρόνο $t=0$. Το δείγμα επιστρεφόταν στο σωλήνα και επαναλαμβανόταν 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; JascoMD-910). Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν Pinnacle II C_{18} (250 x 4.0 mmx, 5 μm) από την εταιρία Restek.

- Αντλία: Jasco PU-2089 Plus
- Στήλη: Pinnacle II C_{18} (d=5 μm , 4.6x250mm) (Restek)
- Ανιχνευτής: υπεριώδους-ορατού πολλαπλής δέσμης (diode array). Jasco M.D 910
- Διαλύτες: (A) 10% formic acid in H_2O (B) MeOH
- Ροή: 1mL/min
- Όγκος έγχυσης: 10 μL

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 μ L 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) ταννινών με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)

Για τον προσδιορισμό του μέσου βαθμού πολυμερισμού των ταννινών 10 mL δείγματος οίνου εξατμίζονται υπό κενό (rotary evaporation) (Εικόνα 13), 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



Εικόνα 13: Εξάτμιση οίνου υπό κενό (Rotary Evaporation)

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 κατάψυξή του. Σε γυάλινα φιαλίδια προστίθενται 100 μL δείγματος και 100 μL διαλύματος ρηθορογλυσίνης. 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; JascoMD-910). Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν XTerraRP18 (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 Διαλυτών	ροής 1 mL/min
Ανιχνευτής	diode array (DAD; Jasco MD-910)

Μήκος κύματος	280nm		
ανίχνευσης			
Ποσότητα ένεσης	40μL		
Διαλύτες	A: 0.1% οξικό οξύ σε νερό καθαρότητας HPLC B: μεθανόλη καθαρότητας HPLC		
Πρόγραμμα HPLC	Χρόνος (min)	Διαλύτης A (0.1% οξικό οξύ σε dH ₂ O)	Διαλύτης B (MeOH)
	Αρχικές Συνθήκες	95	5
	1	84	16
	7	78	22
	8	65	35
	15	58	42
	16	0	100
	23	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	$y=2E+06x-25718$ ($R^2 = 0,9989$)
Ce	$y=722711x-11801$ ($R^2 = 1$)
ECe	$y=754229x+17702$ ($R^2 = 0,9997$)
EGCe	$y=197495x+10392$ ($R^2 = 0,9999$)
ECCe	$y=159155x-26232$ ($R^2 = 0,9989$)

Έκφραση αποτελεσμάτων

όπου εμβαδόν κάθε κορυφής που ποσοτικοποιείται

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

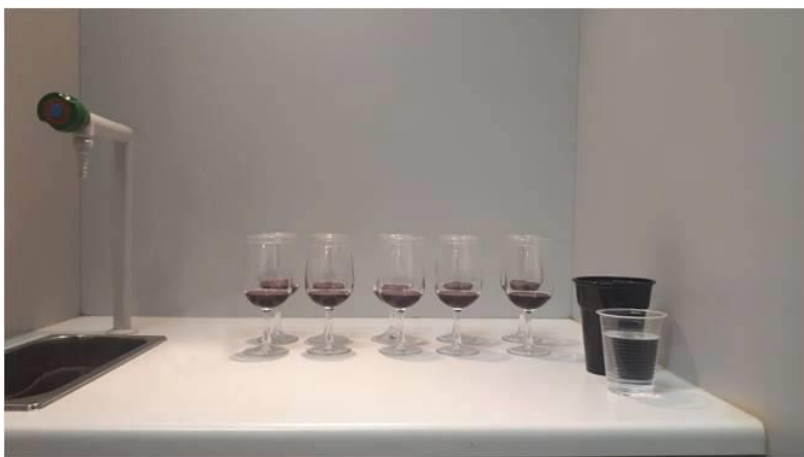
$\%G = 100 * (ECCe + ECGt) / \Sigma (\text{επεκτατικές} + \text{τερματικές υπομονάδες})$, σε μmol

$\%P = 100 * (EGCe + EGCt) / \Sigma (\text{επεκτατικές} + \text{τερματικές υπομονάδες})$, 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 πεπαισμένων και των απείστων οίνων σε διάστημα αποθήκευσης έξι μηνών, από πάνελ δώδεκα εκπαιδευμένων δοκιμαστών. Όλοι ήταν φοιτητές του μεταπτυχιακού προγράμματος Τεχνολογίας Οίνου και Αποσταγμάτων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και είχαν ήδη εκπαιδευτεί σχετικά με τον οργανοληπτικό έλεγχο οίνου. Η εκπαίδευση αλλά και ο οργανοληπτικός έλεγχος έγιναν σύμφωνα με τη μέθοδο *Kallithraka et al. (2015)*. Η εξέταση πραγματοποιήθηκε από τις 10.00π.μ έως τις 13.00μ.μ στην Αίθουσα Οργανοληπτικού Ελέγχου του Εργαστηρίου Οινολογίας. Οι δοκιμαστές δοκίμασαν τα δέκα δείγματα (Εικόνα 14), τα οποία ήταν σε θερμοκρασία δωματίου (18-20°C). 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 15). 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 15).



Εικόνα 14: 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 Οξειδωσης					
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 15: 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 (One Way ANOVA) με επίπεδο εμπιστοσύνης 95% ($p < 0.05$) και για όσα δείγματα παρουσιάστηκαν στατιστικά 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 διαφορετικά γράμματα (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 στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Κλασικές Αναλύσεις

Στους παρακάτω πίνακες (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 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 σημαντικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

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

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 0.0047	6.9 \pm 0.0577	0.681 \pm 0.0032	14 \pm 0.0107	2.6 \pm 0.0211

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

Πίνακας 6: Κλασικές αναλύσεις στα δείγματα στην 2^η δειγματοληψία (3 μήνες)

Δείγμα	pH	Ολική Οξύτητα (g τρυγικού οξέος/L)	Πτητική Οξύτητα (g οξικού οξέος/L)
Control	4.06 \pm 0.0009 a	5.78 \pm 0.0433 b	0.886 \pm 0.001 b
0'/200	3.97 \pm 0.002 h	5.70 b	1.101 \pm 0.003 a
5'/200	4.00 e	5.97 \pm 0.0333 a	0.852 \pm 0.014 c
15'/200	4.04 \pm 0.0006 b	5.97 \pm 0.0333 a	0.436 \pm 0.001 f
0'/400	3.98 \pm 0.0012 g	5.80 \pm 0.0577 b	0.428 \pm 0.004 f
5'/400	4.02 \pm 0.0003 c	5.67 \pm 0.0333 b	0.430 \pm 0.003 f
15'/400	4.00 e	5.67 \pm 0.0333 b	0.435 f
0'/600	3.99 \pm 0.0012 f	6.00 a	0.536 \pm 0.005 e
5'/600	4.01 \pm 0.0012 d	5.40 c	0.590 \pm 0.001 d
15'/600	4.00 \pm 0.0006 e	6.00 a	0.438 f

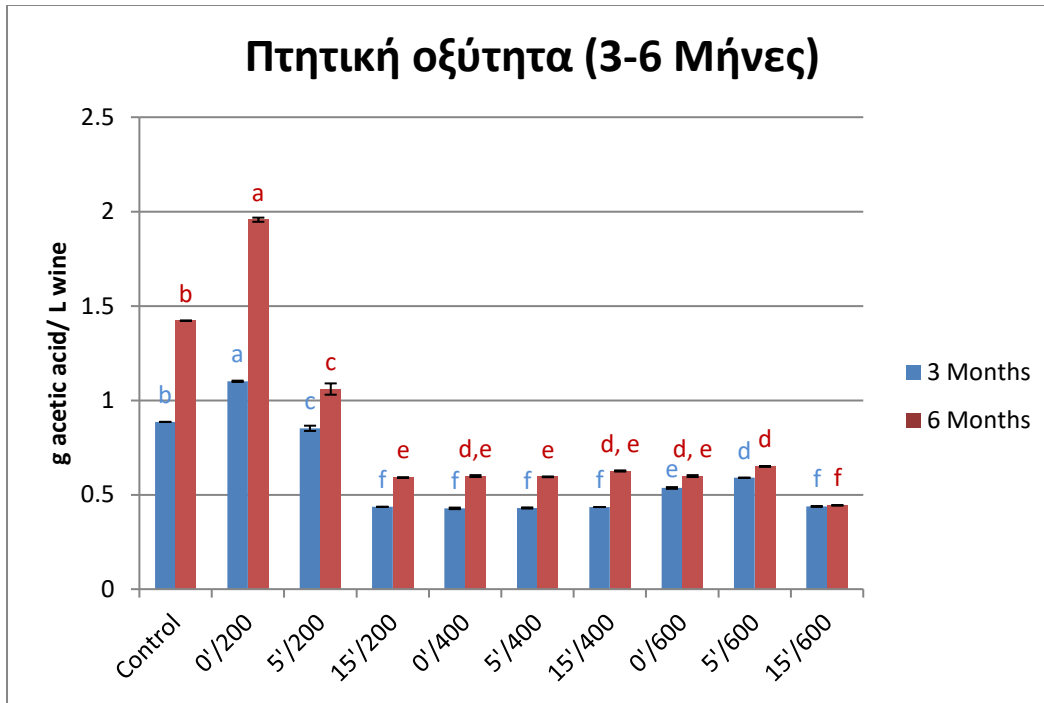
Το pH των οίνων κυμαίνεται σε σχετικά υψηλές τιμές.

Στην 2^η δειγματοληψία (Πίνακας 6) η υψηλότερη τιμή σημειώνεται στον οίνο Control και η χαμηλότερη στους οίνους 0'/200, 0'/400 και 0'/600. Από τον Πίνακα 6 φαίνεται επίσης η ολική οξύτητα των οίνων. Το δείγμα 5'/600 παρουσιάζει την χαμηλότερη τιμή ολικής οξύτητας, ενώ την υψηλότερη τιμή την παρουσιάζουν τα δείγματα 0'/600 και 15'/600. Μετά από τρεις μήνες παλαίωσης, η πτητική οξύτητα εμφανίζεται πολύ υψηλή στο δείγμα 0'/200, ενώ στο δείγμα 0'/400 καταγράφεται η χαμηλότερη πτητική οξύτητα.

Πίνακας 7: Κλασικές αναλύσεις στα δείγματα στην 3^η δειγματοληψία (6 μήνες)

Δείγμα	pH	Ολική Οξύτητα (g τρυγικού οξέος/L)	Πτητική Οξύτητα (g οξικού οξέος/L)
Control	4.12±0.0006 a	7.60±0.0577 a	1.422±0.0003 b
0'/200	4.11±0.006 a	7.30±0.0577 b	1.957±0.011 a
5'/200	4.09±0.0035 b	7.10 b	1.060±0.030 c
15'/200	4.07±0.002 c	5.47±0.0882 c	0.591 e
0'/400	4.05±0.0017 d	5.30 c, d	0.599±0.005 d, e
5'/400	4.04±0.0006 d,e	5.37±0.0833 c, d	0.595±0.002 e
15'/400	4.03 e	5.20±0.0577 d	0.626±0.003 d, e
0'/600	4.02±0.0017 e,f	5.30 c, d	0.599±0.005 d, e
5'/600	4.01±0.0017 f,g	5.37±0.0333 c, d	0.650±0.001 d
15'/600	4.01 g	5.20±0.0577 d	0.444 f

Στην 3^η δειγματοληψία (Πίνακας 7) τα δείγματα 5'/600 και 15'/600 εμφανίζουν την χαμηλότερη τιμή pH, ενώ η υψηλότερη εμφανίζεται στα δείγματα Control και 0'/200. Μετά από τους έξι μήνες, οι τιμές pH όλων των δειγμάτων παρουσίασαν μικρή μείωση. Η υψηλότερη τιμή ολικής οξύτητας, καταγράφεται στο δείγμα Control, ενώ η χαμηλότερη στους οίνους 15'/400 και 15'/600. Όσον αφορά την πτητική οξύτητα παρατηρήθηκε αύξηση τιμών σε όλα τα δείγματα, με την υψηλότερη να απαντά στον δείγμα 0'/200 και η χαμηλότερη στο δείγμα 15'/600.



Διάγραμμα 1: Εξέλιξη της πτητικής οξύτητας το διάστημα τριών έως έξι μηνών.

Το παραπάνω διάγραμμα (Διάγραμμα 1) απεικονίζει την πτητική οξύτητα στις δύο δειγματοληψίες, τριών και έξι μηνών, στα δείγματα βάσει του συνδυασμού χρόνου πίεσης και της πίεσης που εφαρμόστηκε. Παρατηρείται αύξηση της πτητικής οξύτητας στους 6 μήνες, με την μικρότερη αύξηση να παρατηρείται στο δείγμα 15'/600. Τα διαφορετικά γράμματα δείχνουν τα δείγματα που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΗΗΡ ΣΤΗΝ ΟΞΥΤΗΤΑ

Η μείωση του pH που παρατηρείται στο διάστημα των έξι μηνών, με την ταυτόχρονη αύξηση της ολικής οξύτητας, σχετίζεται με την αύξηση της πτητικής οξύτητας, όπως παρατηρούμε και στο παραπάνω διάγραμμα (Διάγραμμα 1) αλλά και με την αύξηση του οξικού οξέος.

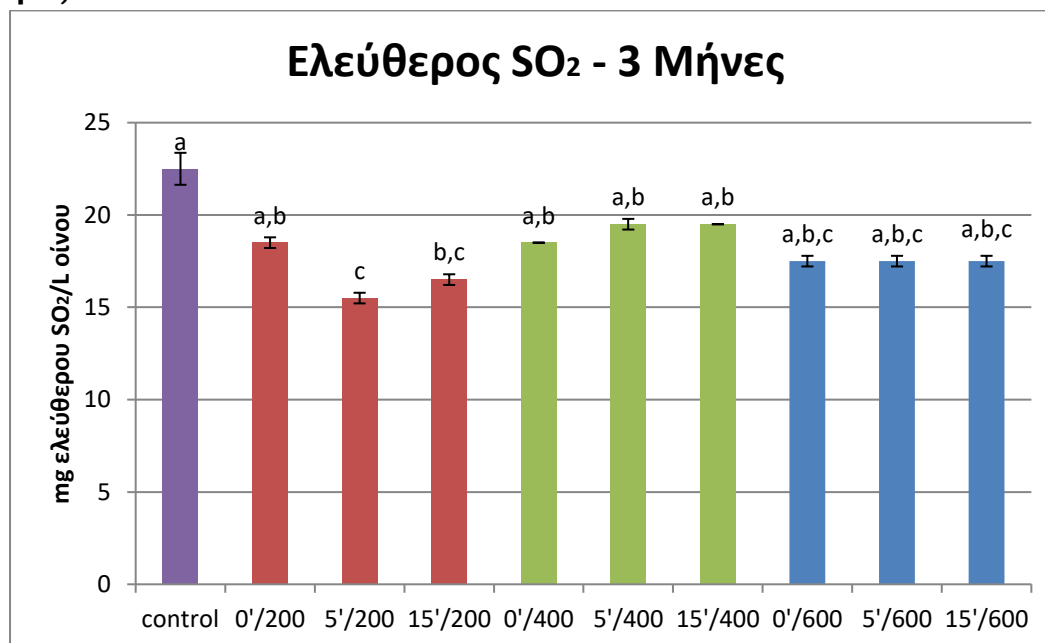
Το γεγονός ότι η αύξηση της συγκέντρωσης του οξικού οξέος από τους τρεις έως τους έξι μήνες είναι μικρή, αποτελεί θετική ένδειξη για την ενδεχόμενη χρήση της ΗΗΡ, για επιτάχυνση της παλαίωσης του οίνου.

Οι μειωμένες τιμές της πτητικής οξύτητας που εμφάνισαν οι 'πιεσμένοι' οίνοι στα 400 και 600MPa ύστερα από τους έξι μήνες αποθήκευσης, είναι αρκετά θετικό αποτέλεσμα αναφορικά με την χρήση

της ΗΗΡ. Αντιθέτως, τα υπόλοιπα δείγματα εμφάνισαν υψηλότερες τιμές πτητικής οξύτητας, χαρακτηριστικό που αποτελεί σημαντική ποιοτική παράμετρο των οίνων.

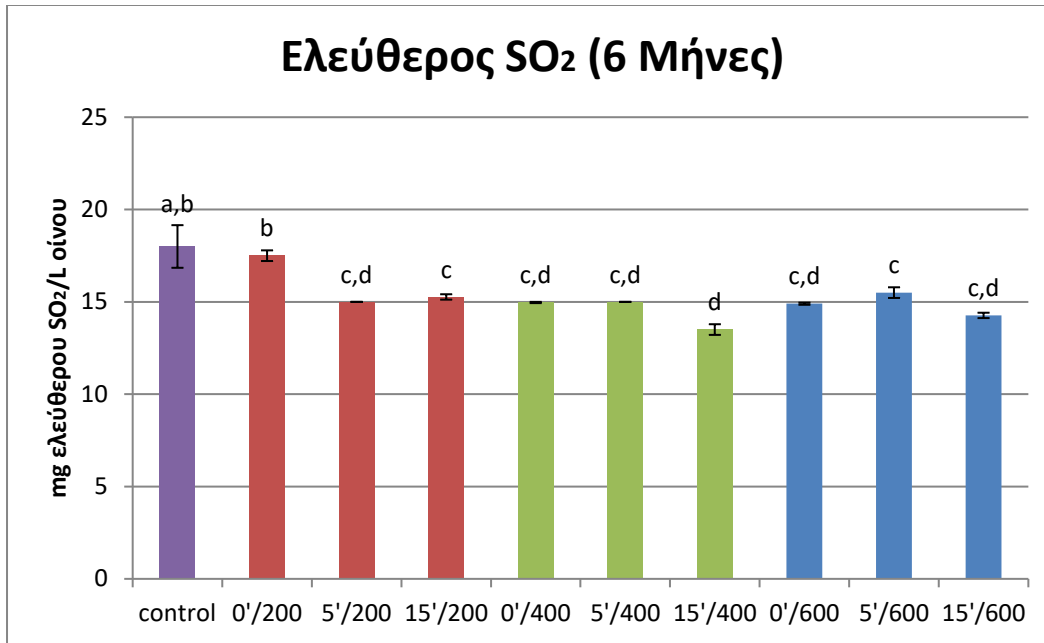
Ελεύθερος και Ολικός Θειώδης Ανυδρίτης

Ελεύθερος SO₂



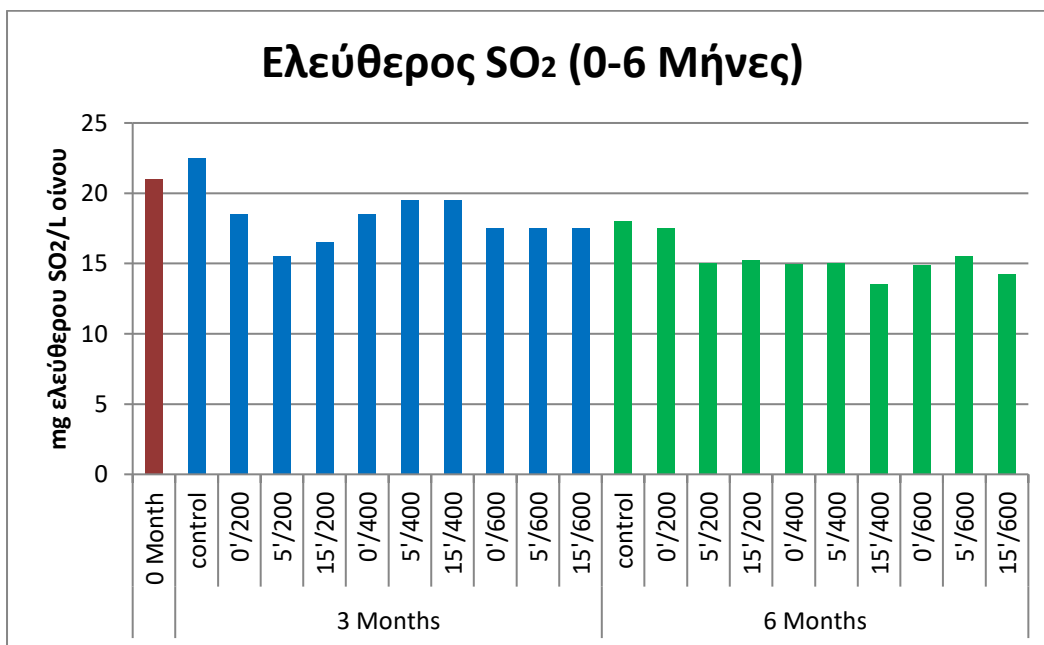
Διάγραμμα 2: Ελεύθερος SO₂ εκφρασμένος σε mg ανά L οίνου των οίνων με διαφορετικούς συνδυασμούς χρόνου και πίεσης στους 3 μήνες. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στα δείγματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

Στο Διάγραμμα 2 απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις του ελεύθερου SO₂ εκφρασμένου σε mg ανά λίτρο οίνου όλων των οίνων με τις διαφορετικές πιέσεις και διαφορετικά λεπτά πίεσης στους τρεις μήνες. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση εμφανίζεται στο δείγμα Control, ενώ η μικρότερη στο δείγμα 5'/200.

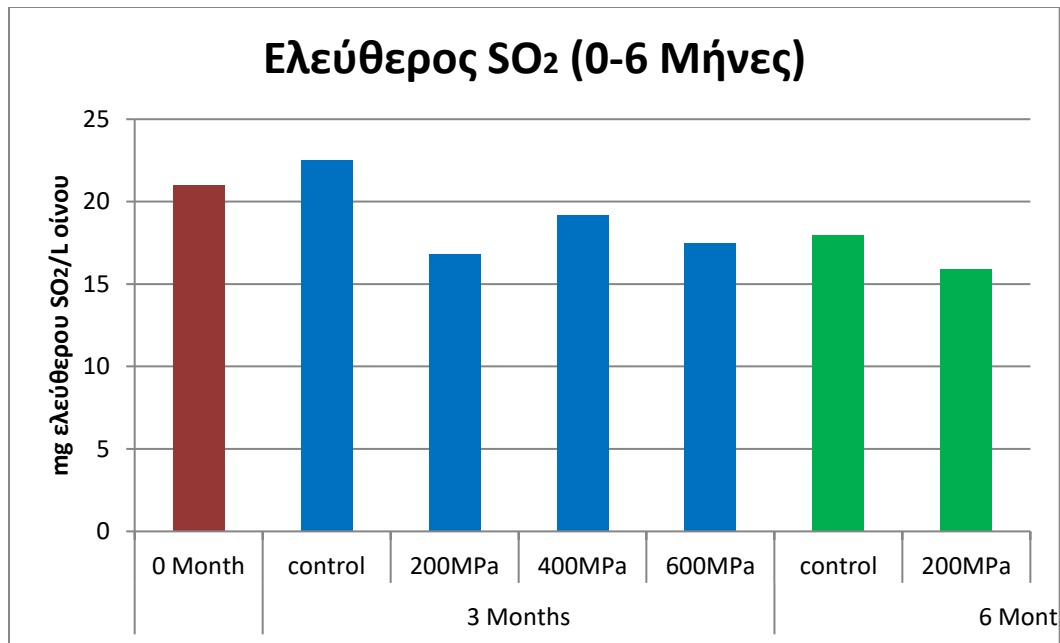


Διάγραμμα 3: Ελεύθερος SO₂ εκφρασμένος σε mg ανά L οίνου των οίνων με διαφορετικές πιέσεις και χρόνους πίεσης, στους έξι μήνες. Οι μπάρες δείχνουν το ± τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στα δείγματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$)

Στο Διάγραμμα 3 παρατίθενται οι συγκεντρώσεις του ελεύθερου SO₂ εκφρασμένο σε mg ανά λίτρο οίνου όλων των οίνων με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις SO₂ στους έξι μήνες.

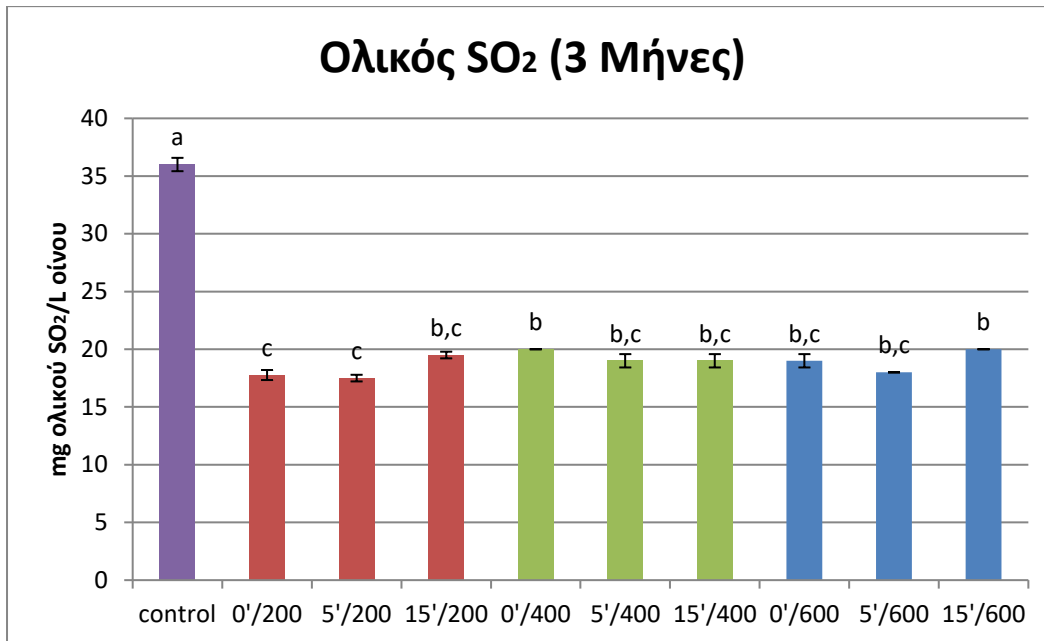


Διάγραμμα 4α: Εξέλιξη του ελεύθερου SO₂ στους οίνους μέσα στο διάστημα των έξι μηνών.



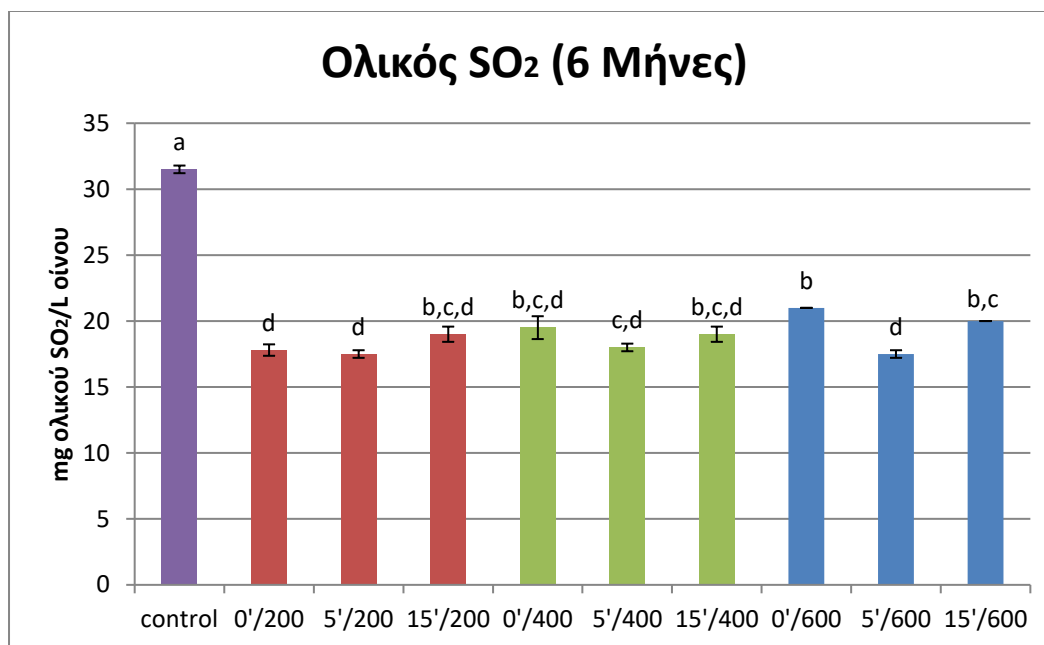
Διάγραμμα 4β: Εξέλιξη του ελεύθερου SO₂ στους οίνους σε διάστημα έξι μηνών, βάσει πίεσης.

Οι τιμές του ελεύθερου θειώδη των δειγμάτων, στις τρεις δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν, απεικονίζονται στα παραπάνω διαγράμματα (Διάγραμμα 4α και Διάγραμμα 4β). Ο ελεύθερος θειώδης μειώθηκε μέσα στο διάστημα των έξι μηνών. Η μείωση που σημείωσαν τα 'πιεσμένα' δείγματα ήταν 21.6%, ενώ το ποσοστό μείωσης του δείγματος 'Control' ήταν 3.6%.

Ολικός SO₂

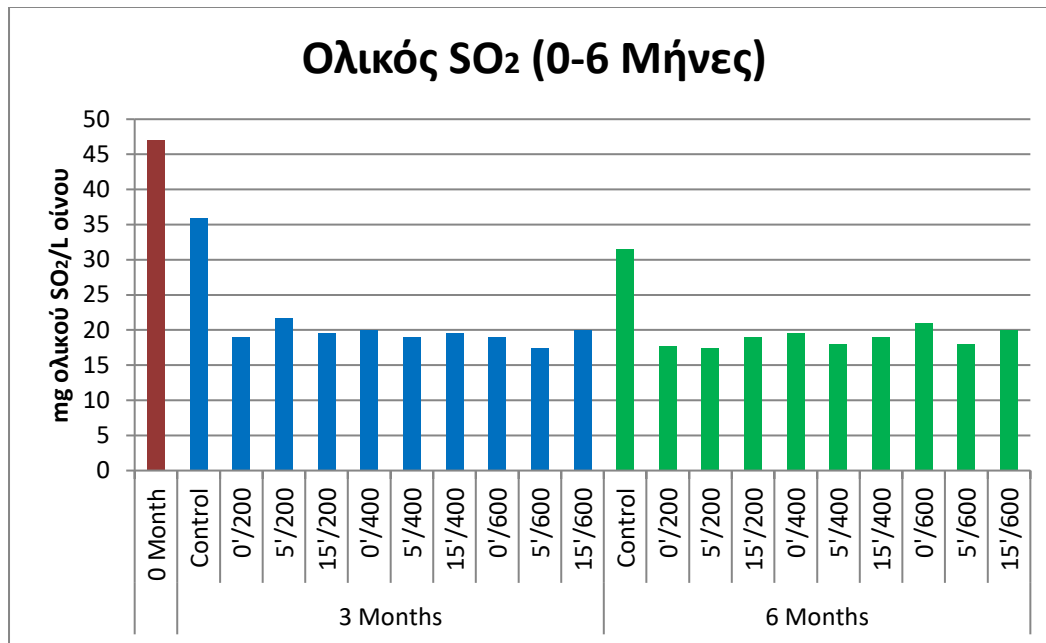
Διάγραμμα 5: Ολικός SO₂ εκφρασμένος σε mg ανά L οίνου των οίνων με διαφορετικές πιέσεις και χρόνους πίεσης, στους τρεις μήνες. Οι μπάρες δείχνουν το ± τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στα δείγματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$)

Στο Διάγραμμα 5, εμφανίζονται οι τιμές του ολικού θειώδη ανυδρίτη που μετρήθηκαν στα διαφορετικά δείγματα μετά από τρεις μήνες. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση εμφανίζεται στο δείγμα Control, ενώ η μικρότερη στα δείγματα 0'/200 και 5'/200, ενώ παρατηρούμε όλα τα δείγματα πλην του δείγματος βάσης, δεν παρουσιάζουν μεγάλες διαφορές, καθώς κυμαίνονται σε μέση συγκέντρωση σε ολικό θειώδη ανυδρίτη τα 19mg/L.

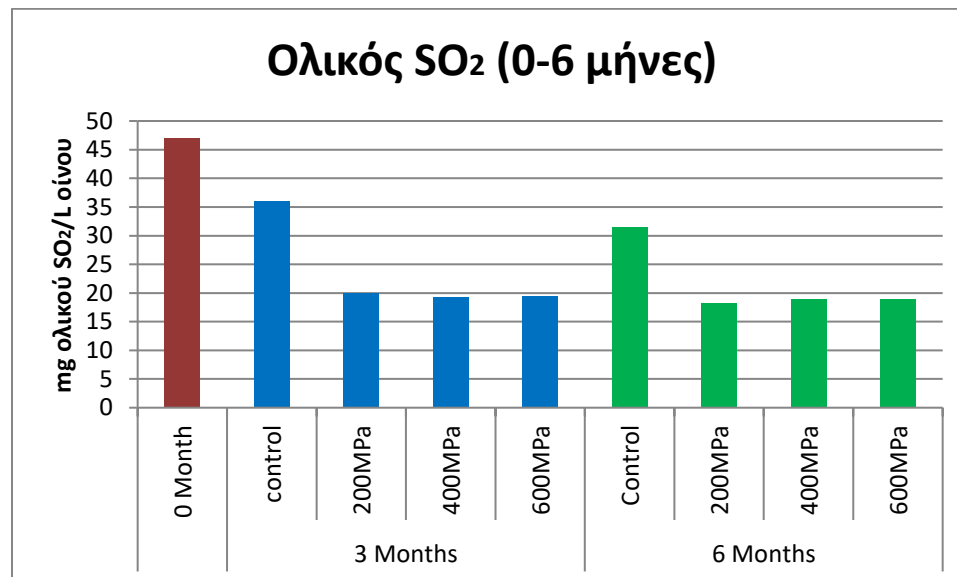


Διάγραμμα 6: Ολικό SO₂ εκφρασμένο σε mg ανά L οίνου των οίνων με διαφορετικές πιέσεις και χρόνους πίεσης στους έξι μήνες. Οι μπάρες δείχνουν το ± τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στα δείγματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$)

Στο Διάγραμμα 6, παρατίθενται τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν για τον ολικό θειώδη ανυδρίτη στα διαφορετικά δείγματα μετά από έξι μήνες. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση παρατηρείται κι εδώ, όπως στην προηγούμενη δειγματοληψία, στο δείγμα Control, ενώ η χαμηλότερη στα δείγματα 0'/200, 5'/200 και 5'/600.



Διάγραμμα 7α: Εξέλιξη του ολικού SO₂ στους οίνους σε διάστημα έξι μηνών.



Διάγραμμα 7β: Εξέλιξη του ολικού SO₂ στους οίνους σε διάστημα έξι μηνών βάσει πίεσης.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΗΗΡ ΣΤΟ SO₂

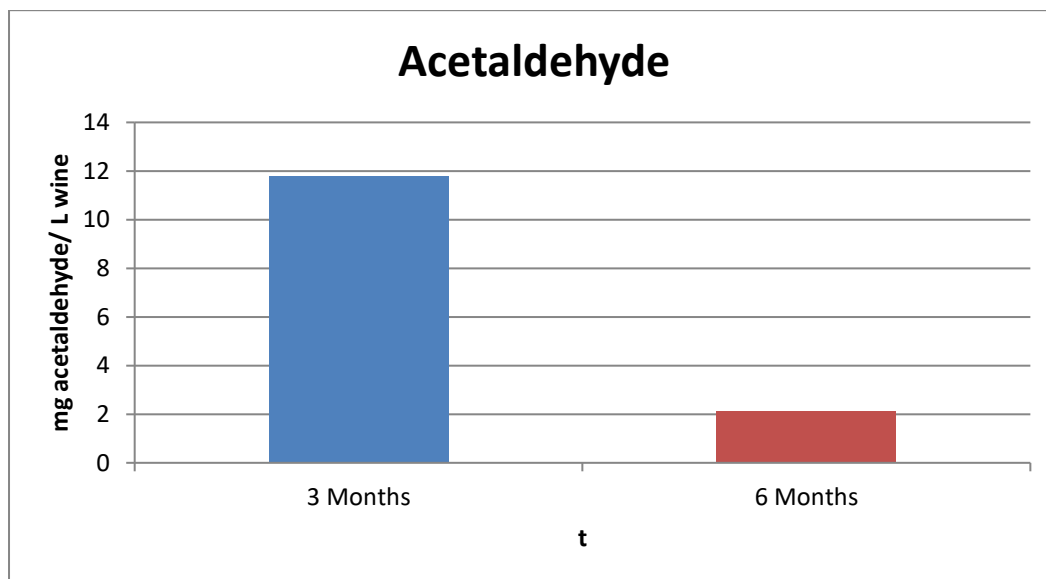
Όπως φαίνεται από τα παραπάνω διαγράμματα (Διάγραμμα 7α και Διάγραμμα 7β), ο ολικός θειώδης ανυδρίτης σημειώνει καθοδική τάση. Στις δειγματοληψίες που έλαβαν χώρα στους τρεις και στους έξι

μήνες οι οίνοι διαφέρουν μεταξύ τους με στατιστικά σημαντική διαφορά. Η συνολική μείωση που σημειώθηκε στους 'πιεσμένους' οίνους ήταν 58.58%, σε αντίθεση με την μείωση που επήλθε στο δείγμα 'Control', η οποία ήταν 33%.

Η εφαρμογή HHP δύναται να επιφέρει αλλαγές στην συγκέντρωση του SO₂, οι οποίες σχετίζονται με την πίεση που εφαρμόζεται στον οίνο, αλλά και τον χρόνο πίεσης. Πιο συγκεκριμένα, τα 'πιεσμένα' δείγματα σημείωσαν μείωση στον ολικό και τον ελεύθερο θειώδη ανυδρίτη. 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 μπορεί να μην είναι επαρκής και οι απαιτήσεις των 'πιεσμένων' οίνων για αντιοξειδωτική προστασία που προσφέρει ο SO₂ να αυξάνονται, γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με τον τελικό στόχο μείωσης της συγκέντρωσης του SO₂ στον οίνο.

Ακεταλδεΰδη

Στο παρακάτω Διάγραμμα (Διάγραμμα 8) απεικονίζονται τα αποτελέσματα από την μέτρηση της συγκέντρωσης της ακεταλδεΰδης με τον 'One analyser' σε διάστημα έξι μηνών. Για την μέτρηση της ακεταλδεΰδης με τη βοήθεια του 'One analyser' δεν χρειάστηκε η δημιουργία πρότυπης καμπύλης.



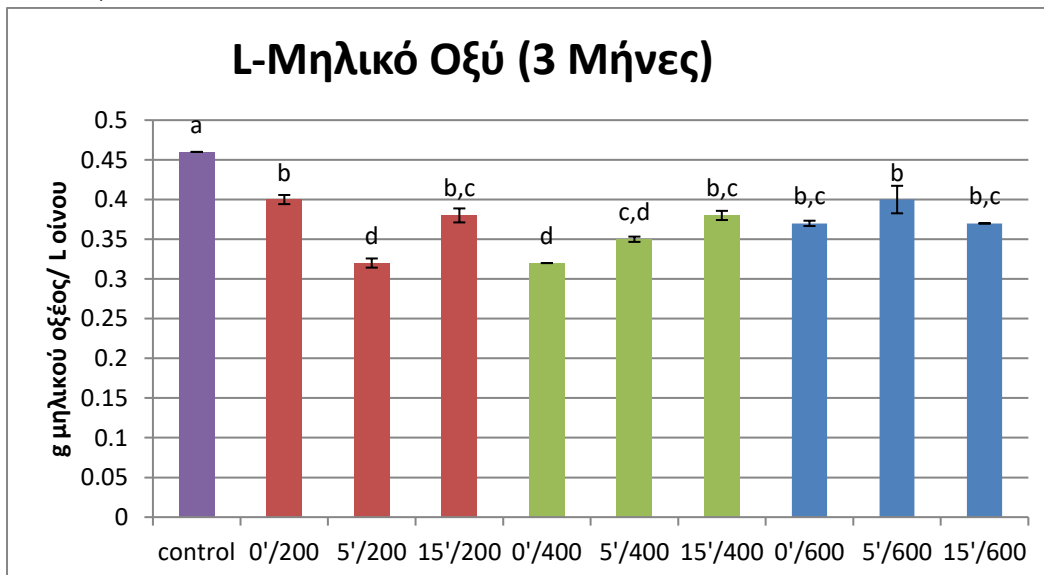
Διάγραμμα 8: Εξέλιξη της συγκέντρωσης ακεταλδεΐδης σε mg ανά L οίνου των 'πίεσμένων' οίνων σε χρονικό διάστημα έξι μηνών (Tukey's test, $p < 0.05$).

Στο Διάγραμμα 8 απεικονίζεται η εξέλιξη της συγκέντρωσης της ακεταλδεΐδης μέσα σε χρονικό διάστημα έξι μηνών. Η ακεταλδεΐδη εμφανίζεται μηδενική στην πρώτη δειγματοληψία και στη συνέχεια παρουσιάζει ανοδική πορεία μέχρι τους τρεις μήνες. Στους έξι μήνες φαίνεται ότι η συγκέντρωση της ακεταλδεΐδης μειώθηκε σε σχέση με τις μετρήσεις της προηγούμενης δειγματοληψίας (3 μήνες).

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΗΠΡ ΣΤΗΝ ΑΚΕΤΑΛΔΕΪΔΗ

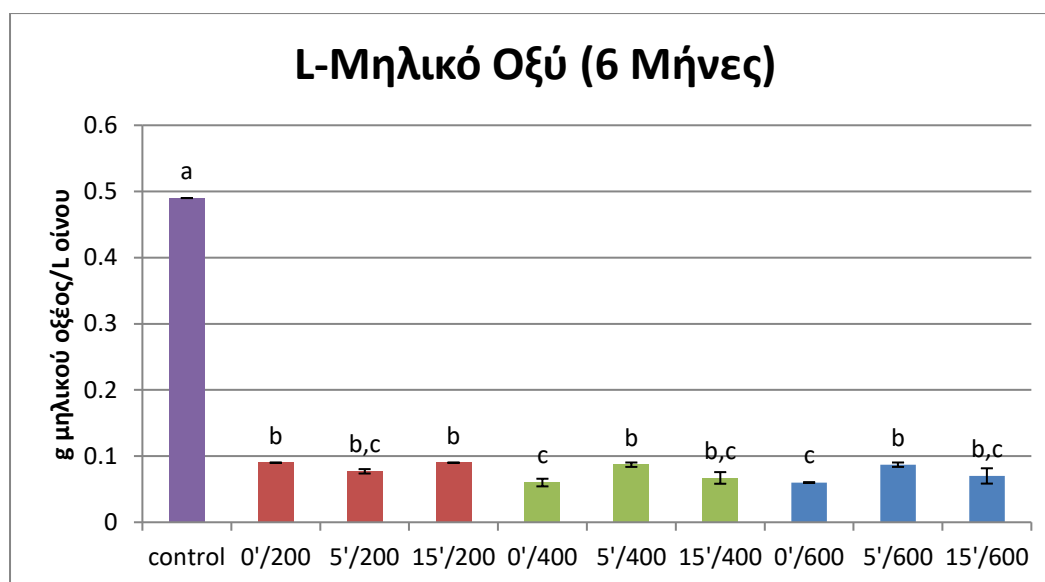
Η μείωση της ακεταλδεΐδης που παρατηρείται στους έξι μήνες αποθήκευσης, μπορεί να οφείλεται στις άμεσες αντιδράσεις της ακεταλδεΐδης με τον 3-O-γλυκοζίτη της μαλβιδίνης (Bakker&Timberlake, 1997), στην ένωση των φλαβονολών συνδεδεμένα με γλυοξυλικά οξέα (Es-Safi *et al.*, 2000), ή στη δημιουργία αιθυλο-γεφυρών μεταξύ ανθοκυανών και φλαβονολών (Atanasova *et al.*, 2002).

L-Μηλικό Οξύ



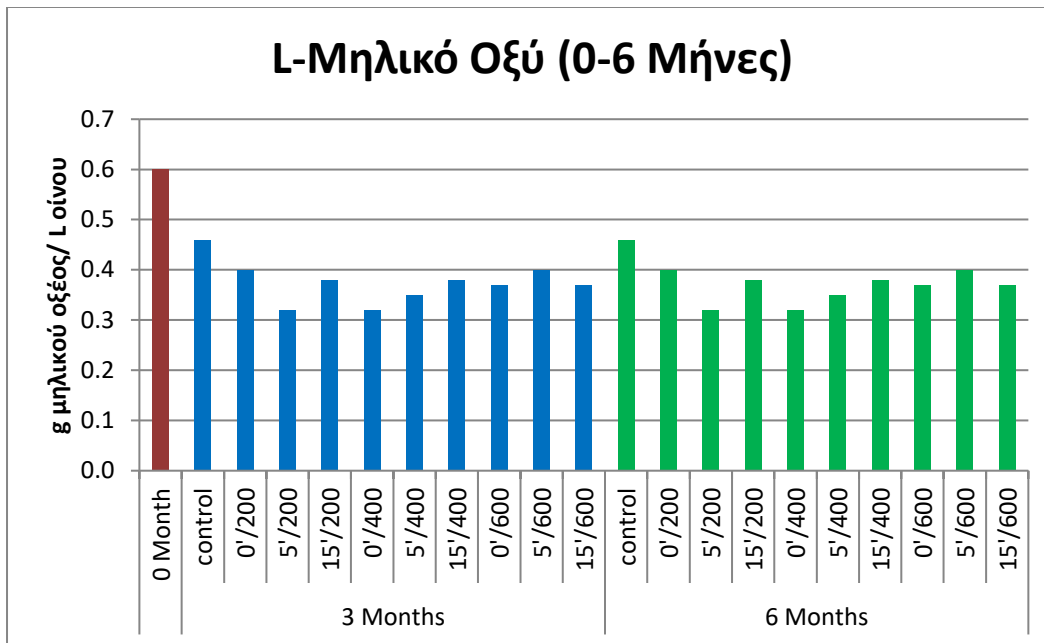
Διάγραμμα 9: L-μηλικό οξύ εκφρασμένο σε g ανά L οίνου των οίνων με διαφορετικές πιέσεις και χρόνους πίεσης, στους 3 μήνες. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

Στο Διάγραμμα 9 απεικονίζονται οι τιμές του L-μηλικού οξέος, εκφρασμένες σε g ανά λίτρο οίνου στα επιμέρους δείγματα μετά το διάστημα των τριών μηνών. Η συγκέντρωση του οίνου σε μηλικό οξύ στην πρώτη δειγματοληψία (Μήνας 0) ήταν 0.60g μηλικού οξέος/ L οίνου. Η υψηλότερη τιμή L-μηλικού οξέος ύστερα από 3 μήνες απαντά στον δείγμα Control, ενώ η χαμηλότερη απαντά στα δείγματα 5'/200 και 0'/400. Η πίεση 600MPa εμφανίζει λίγο υψηλότερες τιμές σε σχέση με εκείνες των 200 και 400MPa.

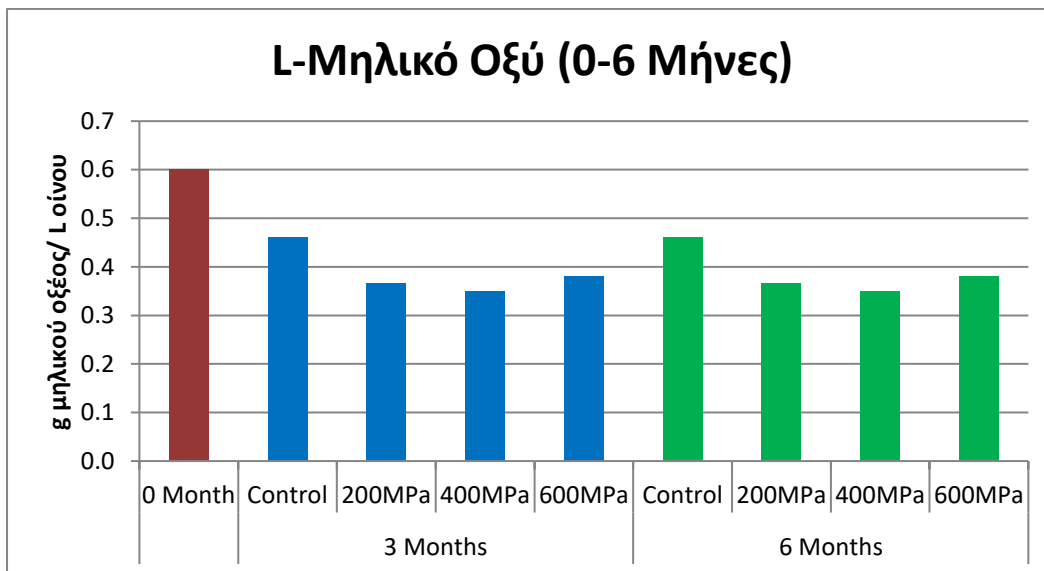


Διάγραμμα 10: L-μηλικό οξύ εκφρασμένο σε g ανά L οίνου των οίνων με διαφορετικό συνδυασμό πίεσης και χρόνου στους 6 μήνες. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

Στο Διάγραμμα 10 απεικονίζονται οι τιμές του L-μηλικού οξέος, εκφρασμένες σε g ανά λίτρο οίνου στα επιμέρους δείγματα μετά το διάστημα των έξι μηνών. Παρατηρούμε την μείωση της συγκέντρωσης μηλικού οξέως από την προηγούμενη δειγματοληψία. Το δείγμα Control εμφανίζει την υψηλότερη τιμή L-μηλικού οξέος και με στατιστικά σημαντική διαφορά από όλα τα άλλα δείγματα, ενώ η χαμηλότερη συγκέντρωση απαντά στα δείγματα 0'/400 και 0'/600.



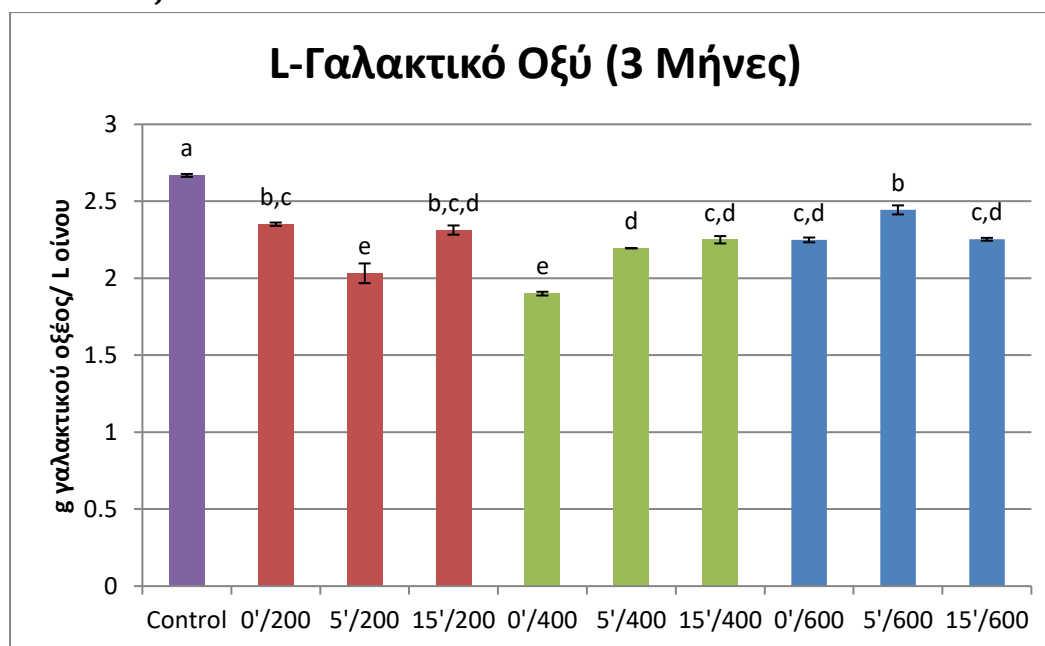
Διάγραμμα 11α: Εξέλιξη του L-μηλικού οξέος στο διάστημα έξι μηνών.



Διάγραμμα 11β: Εξέλιξη του L-μηλικού οξέος σε διάστημα έξι μηνών βάσει πίεσης.

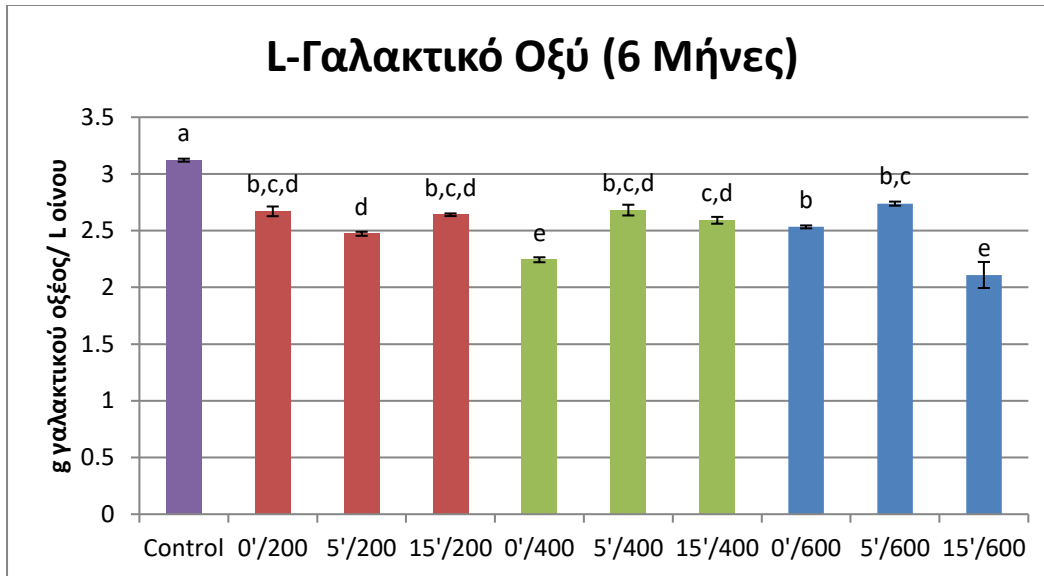
Η εξέλιξη της τιμής του L-μηλικού οξέος, μέσα στο διάστημα των έξι μηνών, απεικονίζεται στα παραπάνω διαγράμματα (Διάγραμμα 11α και Διάγραμμα 11β). Η τιμή του L-μηλικού οξέος παρουσιάζει καθοδική πορεία μέσα στο χρόνο. Επιπλέον, παρατηρείται ότι η μείωση στη συγκέντρωση του L-μηλικού οξέος μετά από έξι μήνες ήταν 87,3% για τους 'πιεσμένους' οίνους, ενώ για το δείγμα 'Control' το ποσοστό της μείωσης ήταν 20%.

L-Γαλακτικό Οξύ



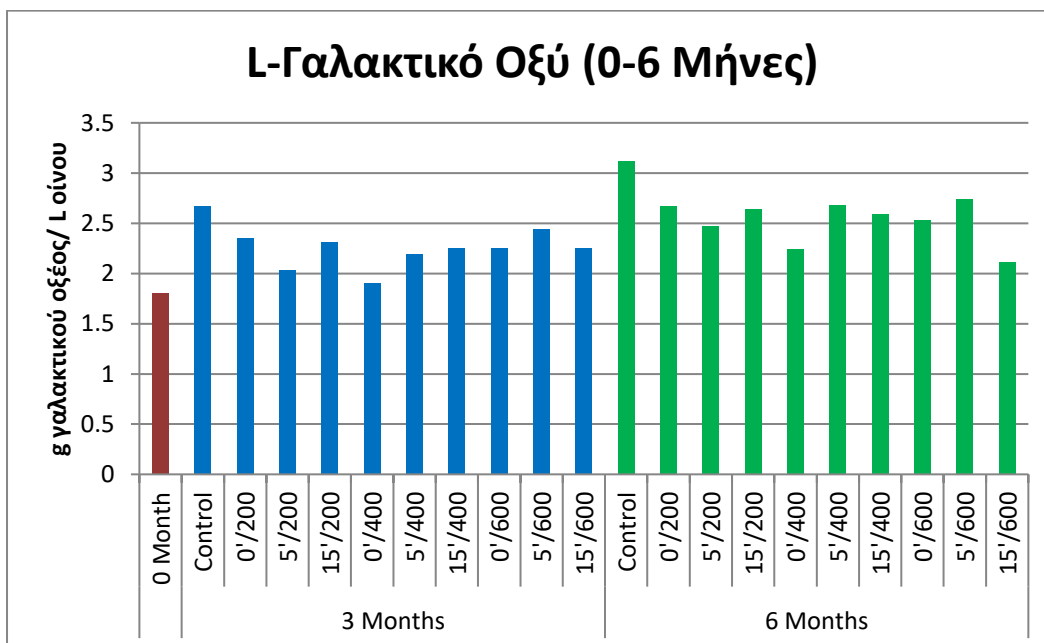
Διάγραμμα 12: L-γαλακτικό οξύ εκφρασμένο σε g ανά L οίνου των οίνων με διαφορετικές πιέσεις και χρόνους πίεσης, στους 3 μήνες. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

Στο Διάγραμμα 12 απεικονίζονται οι τιμές του L-γαλακτικού οξέος, εκφρασμένες σε g ανά λίτρο οίνου στα επιμέρους δείγματα μετά το διάστημα των τριών μηνών. Η συγκέντρωση του οίνου σε γαλακτικό οξύ τον μήνα 0 ήταν 1,8g/L. Η υψηλότερη τιμή L-γαλακτικού οξέος ύστερα από 3 μήνες απαντά στο δείγμα Control, ενώ η χαμηλότερη απαντά στον οίνο 0'/400.

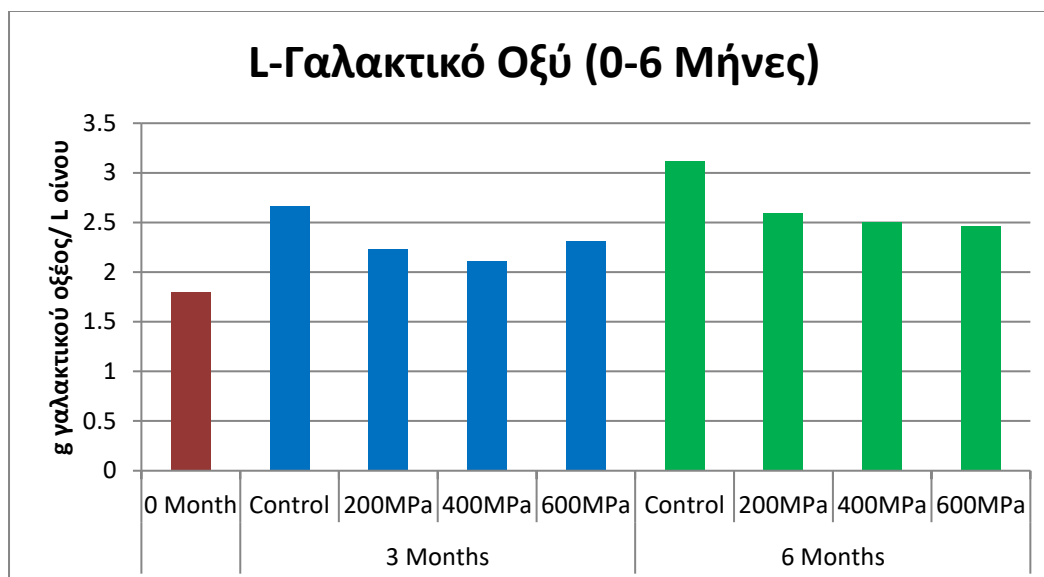


Διάγραμμα 13: L-γαλακτικό οξύ εκφρασμένο σε g ανά L οίνου των οίνων με διαφορετικούς συνδυασμούς πίεσης και χρόνου πίεσης, στους 6 μήνες. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στα δείγματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

Στο Διάγραμμα 13 απεικονίζονται οι τιμές του L-γαλακτικού οξέος, εκφρασμένες σε g ανά λίτρο οίνου στα επιμέρους δείγματα μετά το διάστημα των έξι μηνών. Το δείγμα Control εμφανίζει την υψηλότερη τιμή L-γαλακτικού οξέος, ενώ η χαμηλότερη συγκέντρωση απαντά στο δείγμα 15'/600.



Διάγραμμα 14α: Εξέλιξη του L-γαλακτικού οξέος στο διάστημα των έξι μηνών.



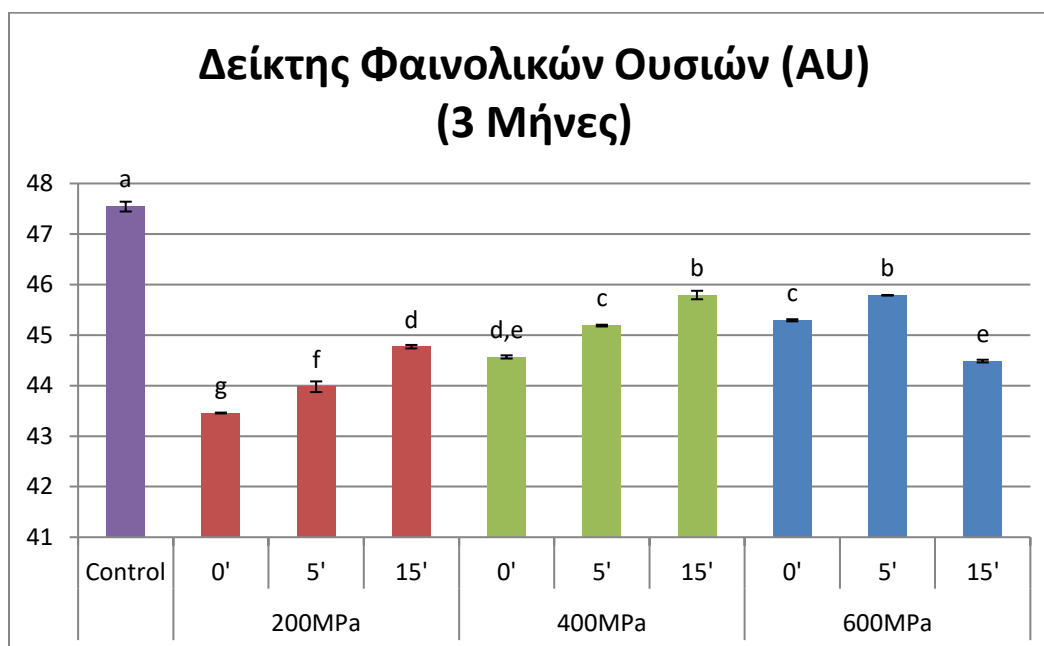
Διάγραμμα 14β: Εξέλιξη του L-γαλακτικού οξέος σε διάστημα έξι μηνών, βάσει πίεσης.

Η εξέλιξη της τιμής του L-γαλακτικού οξέος, μέσα στο διάστημα των έξι μηνών, απεικονίζεται στα παραπάνω διαγράμματα (Διάγραμμα 14α και Διάγραμμα 14β). Η μεταβολή στην αύξηση του L-γαλακτικού οξέος των 'πιεσμένων' οίνων μέσα στον χρόνο ήταν 28.6%, ενώ για το δείγμα 'Control' 42.3%.

Το αποτέλεσμα αυτό πιθανόν να φανερώνει μια συνέχεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης μέσα στη φιάλη, διότι υφίσταται και ταυτόχρονη μείωση του L-μηλικού οξέος (Διάγραμμα 10).

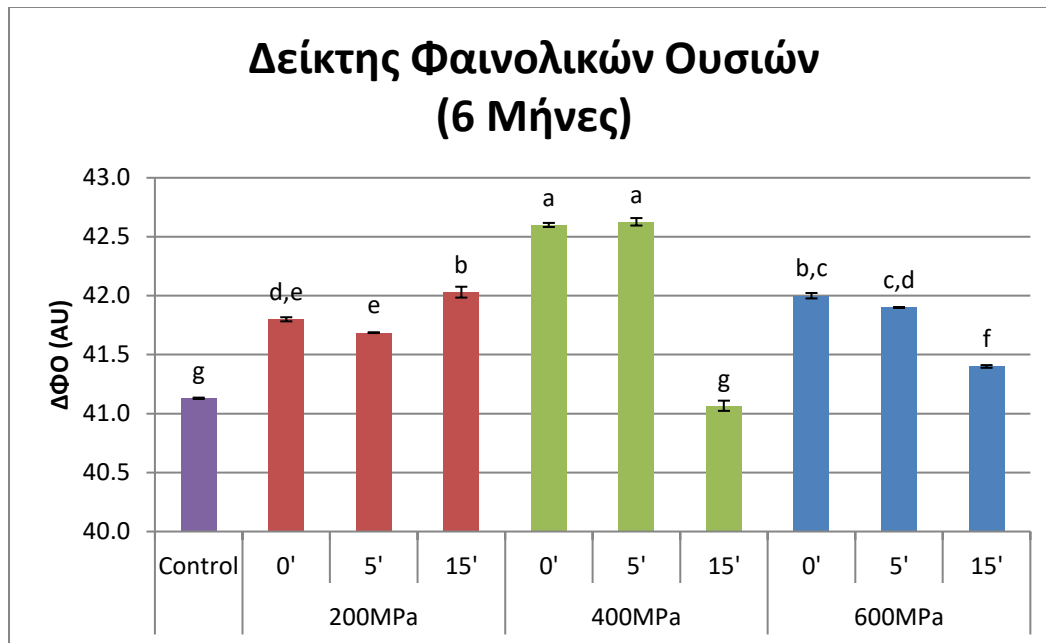
Ολικά Φαινολικά Συστατικά

Δείκτης Φαινολικών Ουσιών (ΔΦΟ)



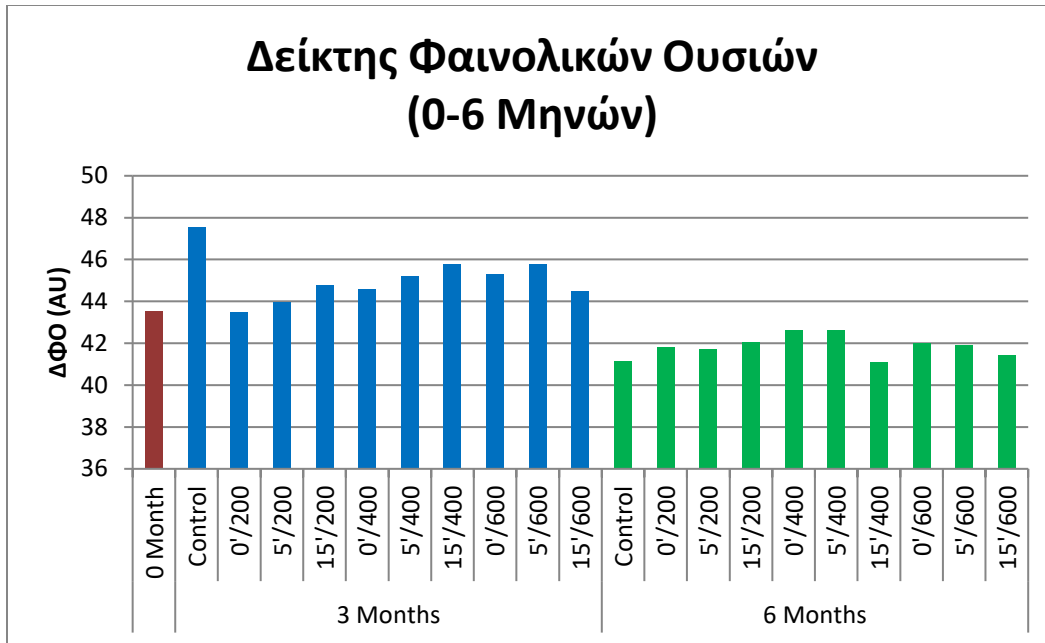
Διάγραμμα 15: Δείκτης Φαινολικών Ουσιών οίνων με διαφορετικές πιέσεις στους τρεις μήνες. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στα δείγματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

Στο Διάγραμμα 15 παρουσιάζονται οι τιμές του Δείκτη Φαινολικών Ουσιών (ΔΦΟ) μετά το διάστημα των τριών μηνών. Η υψηλότερη τιμή Δ.Φ.Ο. απαντά στο δείγμα Control με στατιστικά σημαντική διαφορά από όλα τα άλλα δείγματα. Η χαμηλότερη τιμή του ΔΦΟ εμφανίζεται στο δείγμα 0'/200.

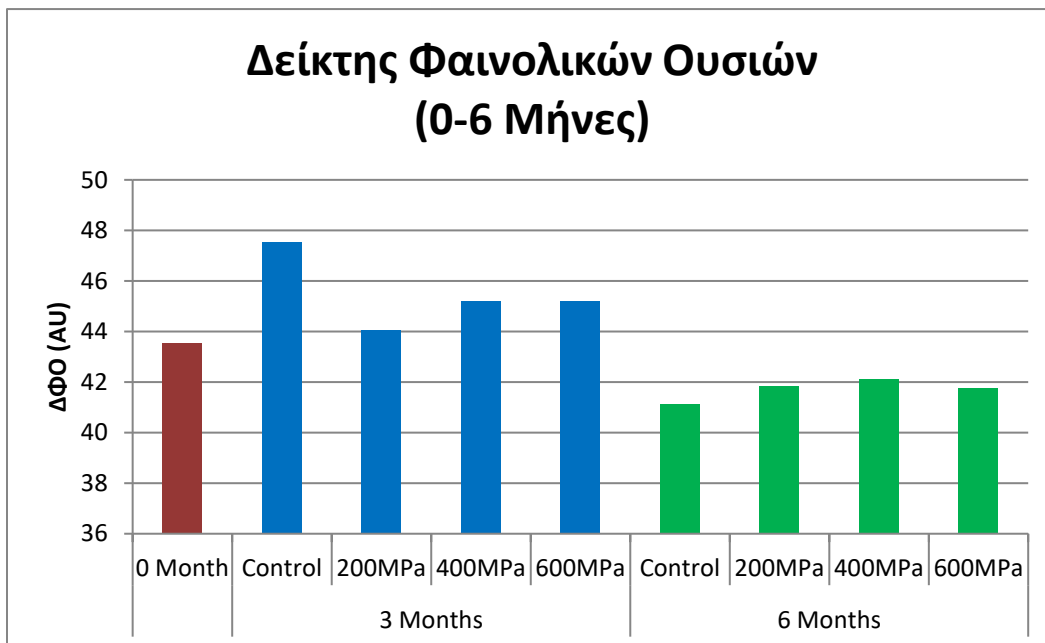


Διάγραμμα 16: Δείκτης Φαινολικών Ουσιών οίνων με διαφορετικές πιέσεις στους τρεις μήνες. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στα δείγματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

Οι τιμές του Δείκτη Φαινολικών Ουσιών (Δ.Φ.Ο.) όλων των δειγμάτων μετά από έξι μήνες παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 16. Η υψηλότερη τιμή ΔΦΟ εμφανίζεται στα δείγματα 0'/400 και 5'/400, ενώ η χαμηλότερη στα δείγματα Control και 15'/400.



Διάγραμμα 17α: Εξέλιξη του Δείκτη Φαινολικών Ουσιών μεταξύ σε διάστημα έξι μηνών.

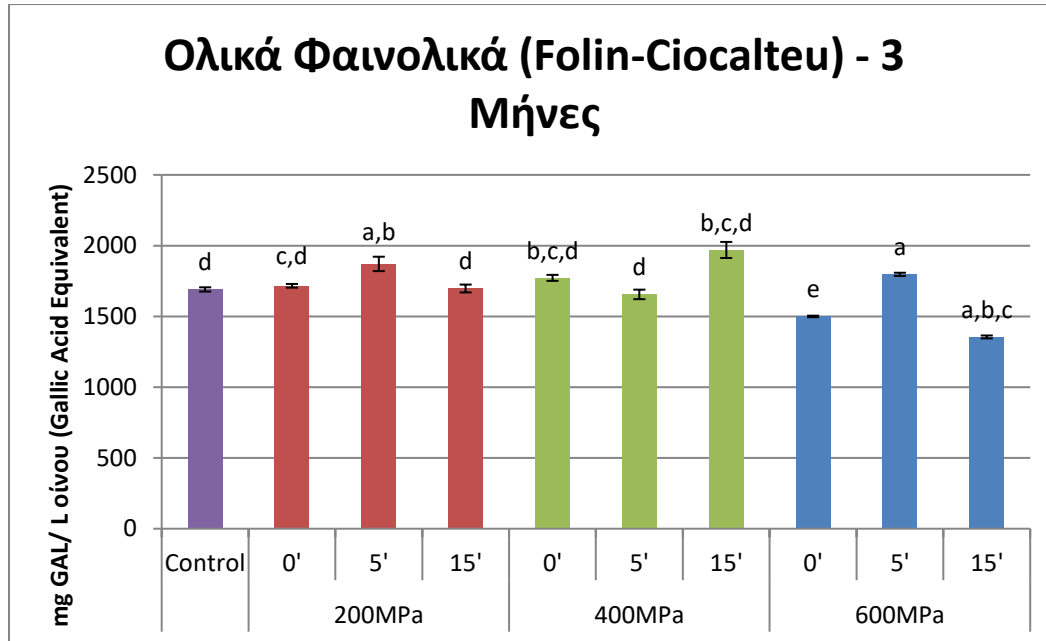


Διάγραμμα 17β: Εξέλιξη του Δείκτη Φαινολικών Ουσιών των δειγμάτων σε διάστημα έξι μηνών, βάσει πίεσης.

Στο Διάγραμμα 17α φαίνεται η εξέλιξη των τιμών του Δείκτη Φαινολικών Ουσιών σε διάστημα έξι μηνών. Παρατηρείται μικρή αύξηση της τιμής του Δ.Φ.Ο. μετά από τρεις μήνες, ενώ στη συνέχεια μειώση.

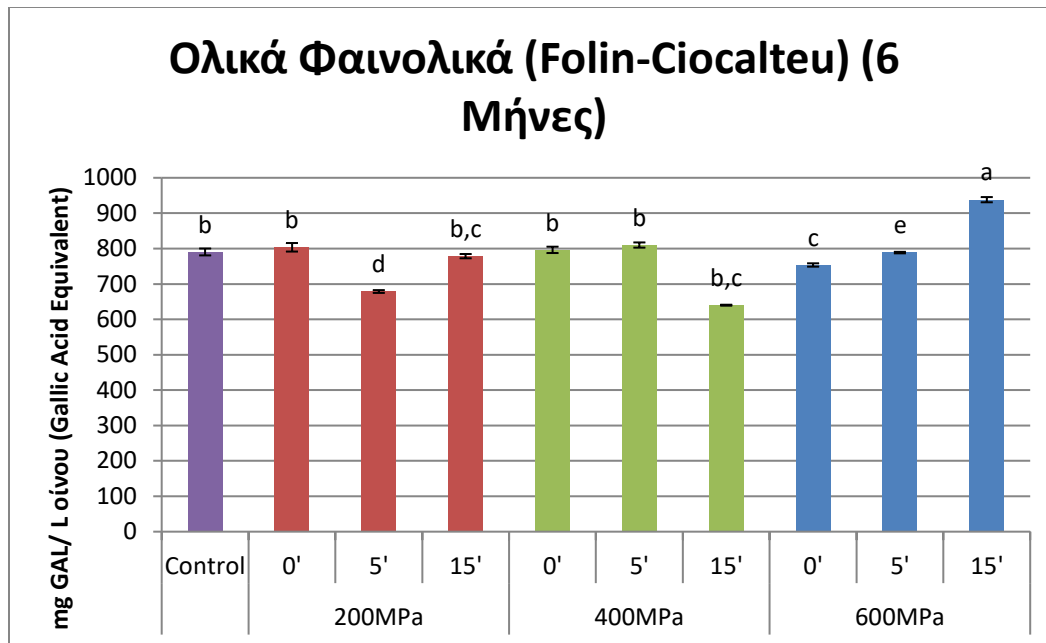
Η μείωση των ολικών φαινολικών που λαμβάνει χώρα στους έξι μήνες συγκριτικά με τις πρώτες μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν, μπορεί να οφείλεται στην χημική οξείδωση ή στον συγχρωματισμό των φαινολικών με ανθοκυάνες (Burin *et al.*, 2011; Monagas *et al.*, 2006).

Μέθοδος Folin-Ciocalteu

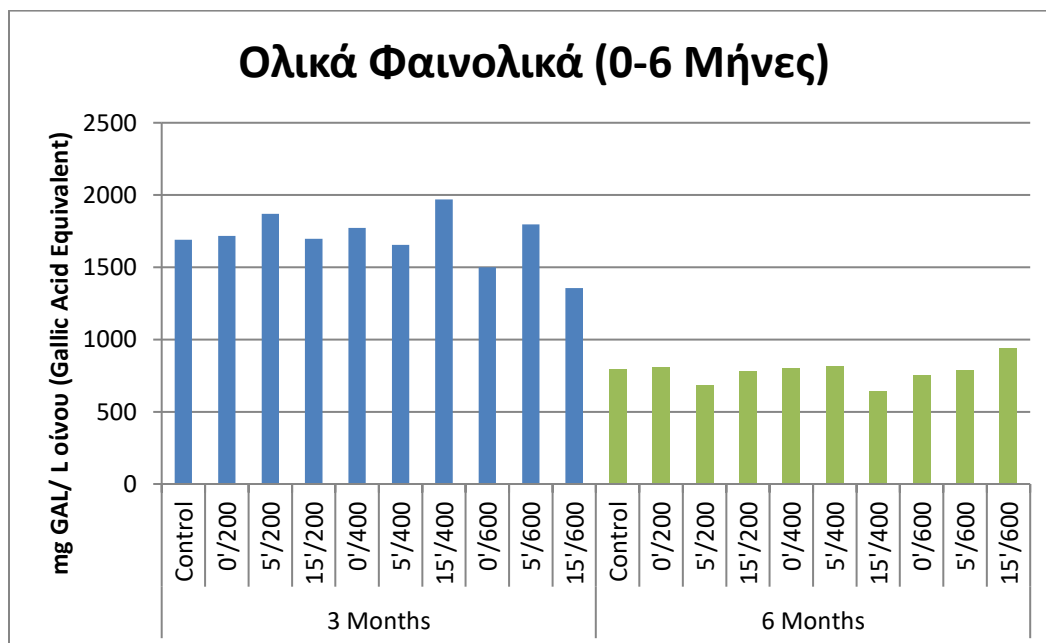


Διάγραμμα 18: Ολικά φαινολικά (μέθοδος Folin-Ciocalteu) οίνων με διαφορετικές πιέσεις στους τρεις μήνες. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στα δείγματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

Στο Διάγραμμα 18, παρατίθενται οι συγκεντρώσεις των ολικών φαινολικών των οίνων με τις διαφορετικές πιέσεις και χρόνους πίεσης, 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 $y = 0,0011 \cdot x + 0,0192$ ($R^2 = 0,999$). Η υψηλότερη συγκέντρωση απαντά στο δείγμα 5'/600, ενώ η χαμηλότερη στο 0'/600.



Διάγραμμα 19: Ολικά φαινολικά (μέθοδος Folin-Ciocalteu) οίνων με διαφορετικούς συνδυασμούς πίεσης και χρόνου πίεσης στους έξι 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, $p < 0.05$)

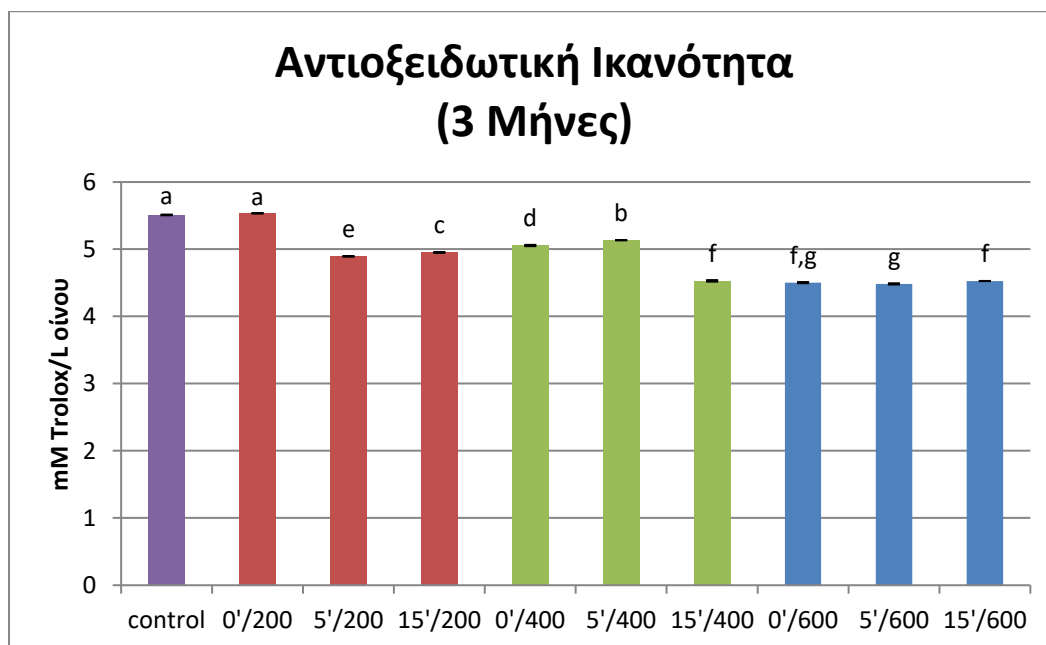


Διάγραμμα 20: Εξέλιξη των ολικών φαινολικών με την μέθοδο Folin-Ciocalteu σε διάστημα 3 μηνών.

Στο Διάγραμμα 19, παρατίθενται οι συγκεντρώσεις των ολικών φαινολικών των οίνων με τις διαφορετικές πιέσεις 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 $y = 0,0011 \cdot x + 0,0192$ ($R^2 = 0,999$). Παρατηρούμε πως η μεγαλύτερη συγκέντρωση εμφανίζεται στο δείγμα 15'/600, ενώ η μικρότερη στο 15'/400.

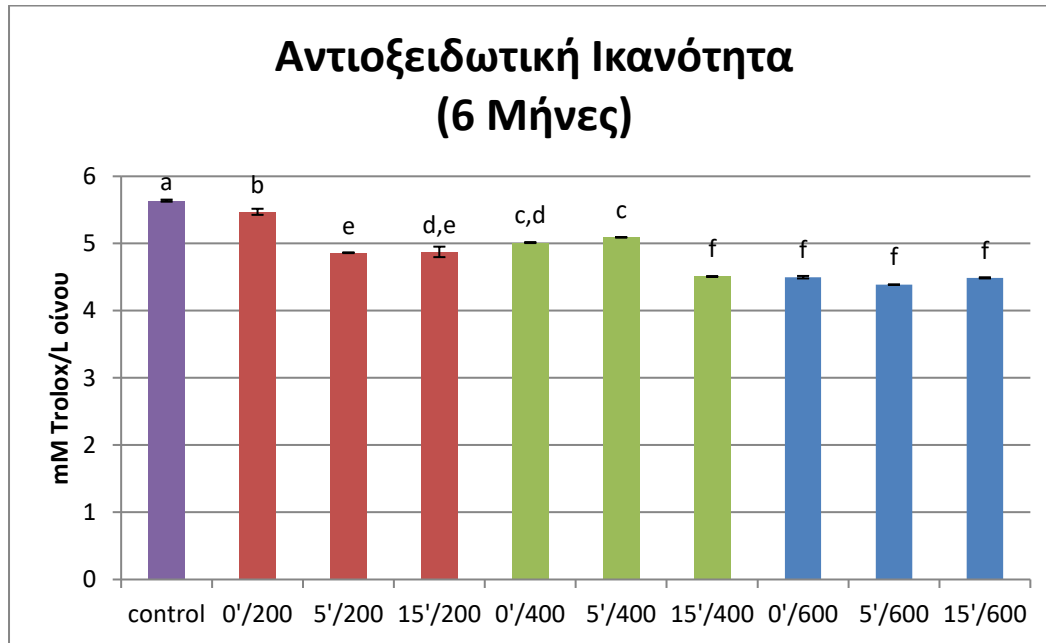
Τόσο με τη χρήση της μεθόδου Folin-Ciocalteu (Διάγραμμα 20) όσο και με την μέθοδο ΔΦΟ (Διάγραμμα 17α) παρατηρείται μείωση μετά από 6 μήνες, παρατηρούνται όμως και κάποιες διαφορές ως προς την κατάταξη των οίνων ανάμεσα στις δύο μεθόδους, τόσο στους τρεις όσο και στους έξι μήνες. Οι διαφορές αυτές μπορεί να οφείλονται σε ενώσεις όπως τα κινναμωμικά οξέα και οι χαλκόνες, που δεν παρουσιάζουν μέγιστη απορρόφηση στα 280nm (μέθοδος ΔΦΟ) και άρα δεν προσμετρούνται από την μέθοδο του ΔΦΟ, ενώ η μέθοδος του Folin-Ciocalteu υπολογίζει και τις συγκεκριμένες φαινολικές ενώσεις.

Αντιοξειδωτική Ικανότητα (DPPH)



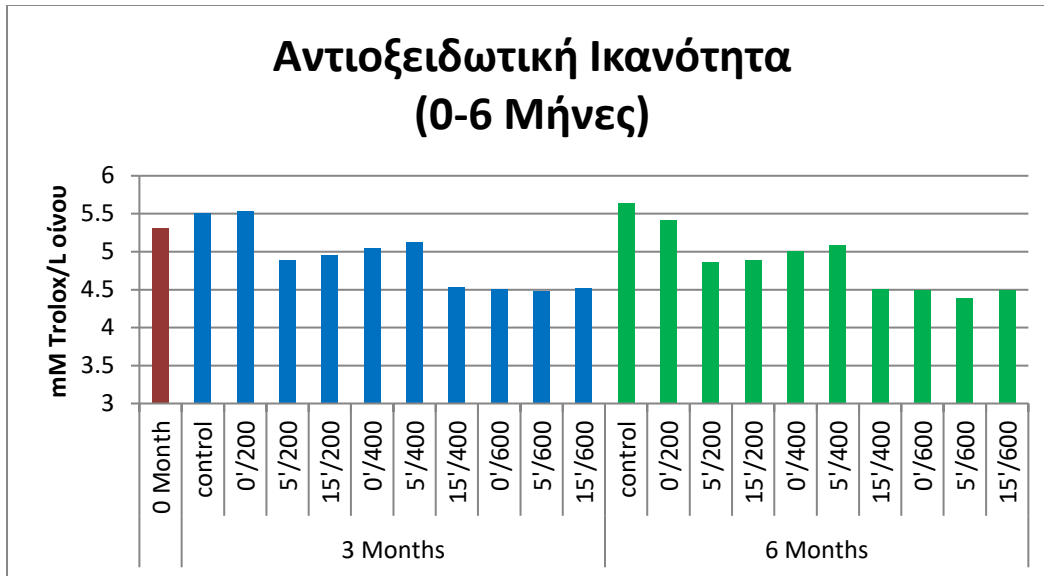
Διάγραμμα 21: Αντιοξειδωτική ικανότητα εκφρασμένη σε mM Trolox ανά L οίνου, των 'πιεσμένων' οίνων με διαφορετικές πιέσεις και χρόνους πίεσης, μετά από τρεις μήνες. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στα δείγματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

Στο Διάγραμμα 21 παρουσιάζονται οι μετρήσεις της αντιοξειδωτικής ικανότητας όλων των οίνων στους τρεις μήνες. Τα δείγματα Control και 0'/200 εμφανίζουν την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα για το συγκεκριμένο χρόνο μέτρησης, ενώ η χαμηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα απαντά στο δείγμα 5'/600.

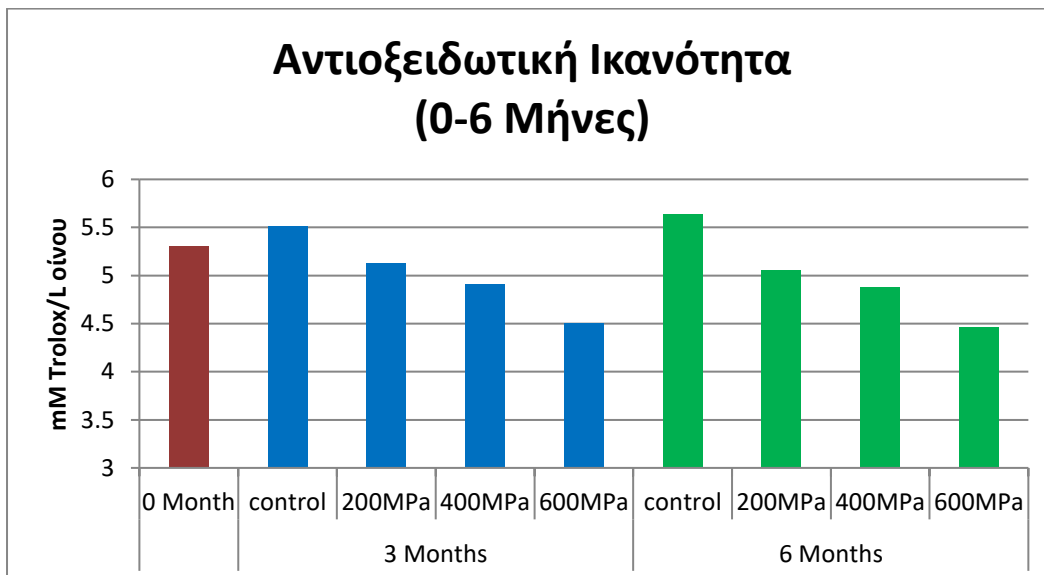


Διάγραμμα 22: Αντιοξειδωτική ικανότητα εκφρασμένη σε mM Trolox ανά L οίνου, των 'πιεσμένων' οίνων με διαφορετικές πιέσεις και χρόνους πίεσης, μετά από έξι μήνες. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στα δείγματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

Στην δειγματοληψία που έλαβε χώρα στους έξι μήνες, το δείγμα Control εμφανίζει κι εδώ την υψηλότερη τιμή αντιοξειδωτικής ικανότητας. Η χαμηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα απαντά στα δείγματα 15'/400, 0'/600, 5'/600 και 15'/600.



Διάγραμμα 23α: Η πορεία της αντιοξειδωτικής ικανότητας, εκφρασμένη σε mM Trolox ανά L οίνου του 'πιεσμένου' οίνου στο διάστημα των έξι μηνών.



Διάγραμμα 23β: Η πορεία της αντιοξειδωτικής ικανότητας, εκφρασμένη σε mM Trolox ανά L οίνου των 'πιεσμένων' δειγμάτων οίνου βάσει πίεσης, στο διάστημα των έξι μηνών.

Στα παραπάνω διαγράμματα (Διάγραμμα 23α και Διάγραμμα 23β) απεικονίζεται πως κυμαίνονται οι τιμές της αντιοξειδωτικής ικανότητας στις τρεις δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν στο διάστημα των έξι μηνών. Η αντιοξειδωτική ικανότητα των 'πιεσμένων' οίνων δεν παρουσιάζει σημαντική μεταβολή μέσα στον χρόνο. Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, η μικρή μείωση που

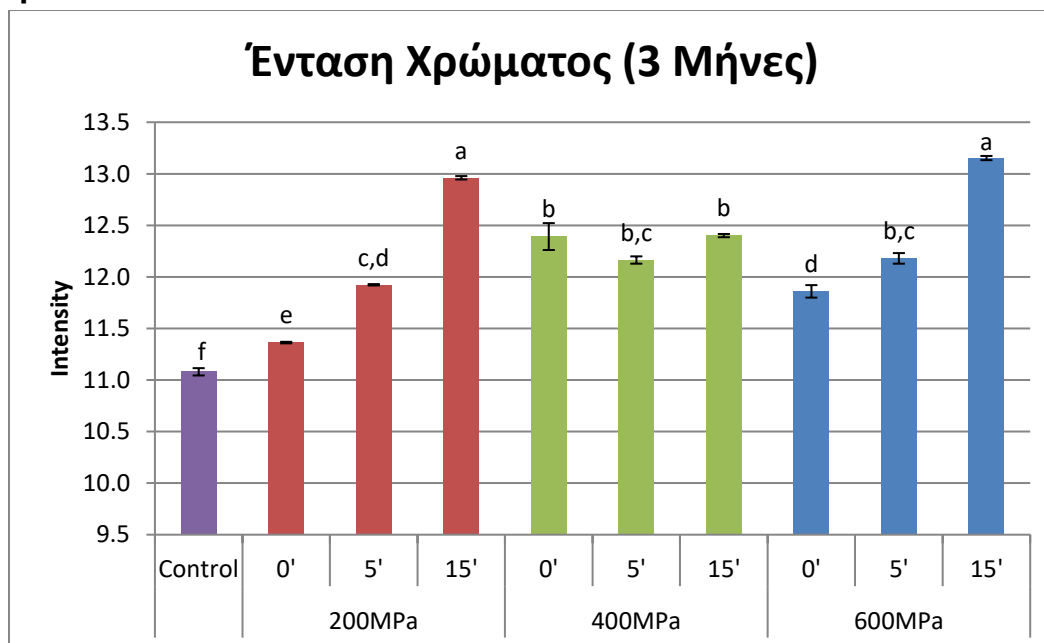
παρατηρείται στην αντιοξειδωτική ικανότητα των 'πιεσμένων' οίνων μετά από τους έξι μήνες αποθήκευσης μπορεί να οφείλεται σε πολυμερισμό των φαινολικών ενώσεων.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΗΗΡ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΟΙΝΟΥ

Όλα τα δείγματα, ανεξαρτήτου συνδυασμού χρόνου και πίεσης, μετά από έξι μήνες αποθήκευσης, παρουσίασαν μειωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα, σε αντίθεση με το δείγμα 'Control'. 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). Θα λέγαμε λοιπόν, πως οι οίνοι που έχουν υποβληθεί σε ΗΗΡ παρουσιάζουν μειωμένη αντιοξειδωτική προστασία (φαινολικές ενώσεις) η οποία πιθανόν όμως και να οφείλεται στην παλαίωση.

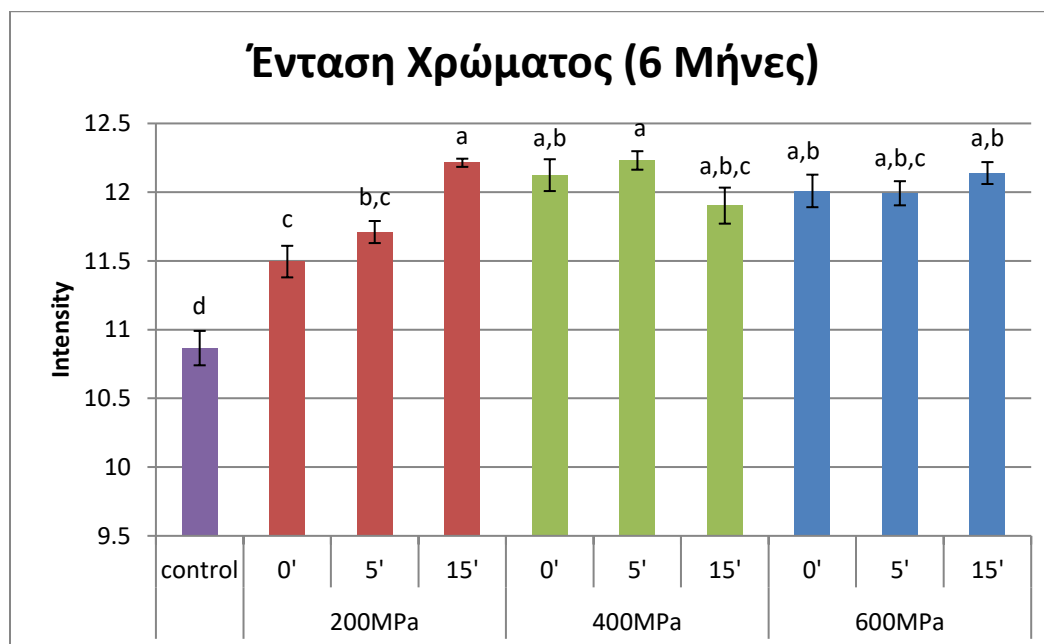
Χρωματικά Χαρακτηριστικά των οίνων

Ένταση



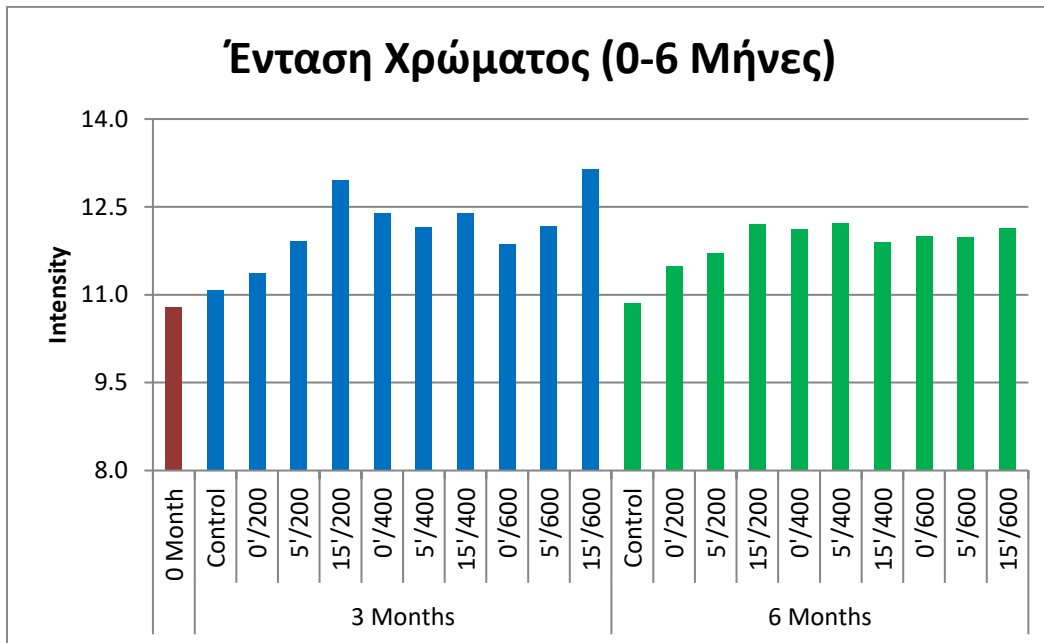
Διάγραμμα 24: Ένταση χρώματος οίνων με διαφορετικές συγκεντρώσεις πιέσεις μετά από τρεις μήνες. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στα δείγματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

Στο Διάγραμμα 24 απεικονίζεται η ένταση του χρώματος στα δείγματα με τις διαφορετικές πιέσεις (200, 400 και 600MPa) στους τρεις μήνες παλαίωσης. Η μεγαλύτερη ένταση χρώματος εμφανίζεται στους συνδυασμούς 15min/200MPa και 15min/600MPa, ενώ η μικρότερη στον οίνο βάσης (Control). Η ένταση χρώματος σε όλα τα δείγματα κυμαίνεται σε τιμές ανώτερες των 10 μονάδων, γεγονός που καταδεικνύει την ικανότητα παλαίωσης του οίνου.

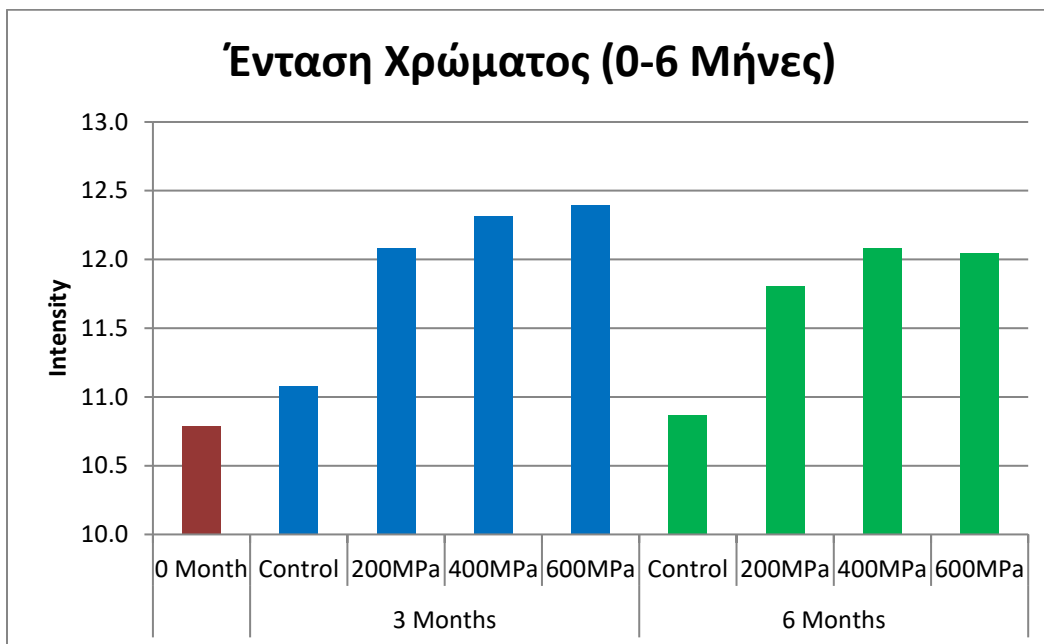


Διάγραμμα 25: Ένταση χρώματος των οίνων με διαφορετικές πιέσεις μετά από έξι μήνες. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στα δείγματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

Στο Διάγραμμα 25, παρατίθενται οι τιμές της έντασης χρώματος των οίνων στους έξι μήνες. Συγκριτικά με τους τρεις μήνες, παρατηρείται μείωση στην ένταση του χρώματος όλων των οίνων. Υψηλότερες τιμές έντασης μπορεί να οφείλονται σε ελαφρώς μικρότερο pH που μπορεί να παρουσιάζουν, αλλά και στον SO_2 , ο οποίος αποχρωματίζει τις ανθοκυάνες (Ribéreau-Gayon and Stonestreet, 1965).



Διάγραμμα 26α: Εξέλιξη της έντασης του χρώματος οίνων σε διάστημα έξι μηνών.



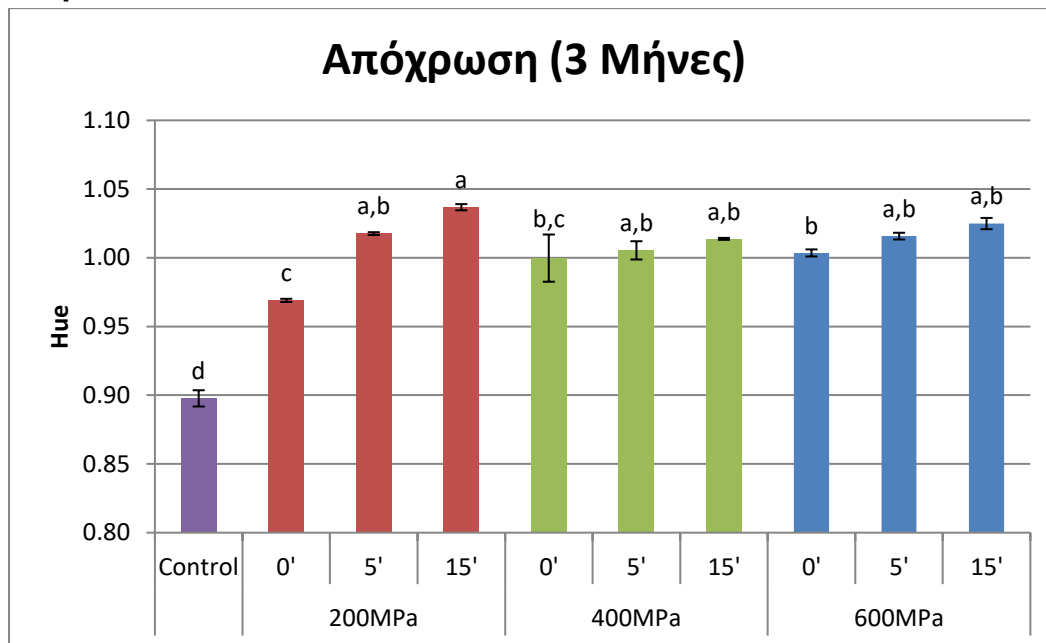
Διάγραμμα 26β: Εξέλιξη της έντασης του χρώματος σε διάστημα έξι μηνών, βάσει πίεσης.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΗΗΡ ΣΤΗΝ ΕΝΤΑΣΗ ΤΟΥ ΧΡΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΟΙΝΟΥ

Παρατηρώντας τα παραπάνω διαγράμματα (Διάγραμμα 26α και Διάγραμμα 26β), είναι εμφανές ότι στην εξέλιξη του χρόνου, η ένταση του χρώματος των δειγμάτων υπέστη αύξηση στους τρεις μήνες, ενώ στους έξι μήνες η ένταση του χρώματος μειώθηκε. Η χαμηλότερη ένταση χρώματος παρατηρείται στο δείγμα Control καθ' όλη την πορεία ωρίμανσης. Τελικό αποτέλεσμα είναι η μείωση της έντασης του χρώματος, με παράλληλη αύξηση της απόχρωσης (Santos *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2019; Francia-Aricha, *et al.*, 1997; Mateus, *et al.*, 2003; Revilla & González-sanjosé, 2001; Revilla, *et al.*, 1999). Η ένταση συνήθως μειώνεται, ενώ η απόχρωση αυξάνεται, λόγω της ταυτόχρονης μείωσης της απορρόφησης στα 520nm (κόκκινο χρώμα) και αύξησης στα 420nm (κίτρινο χρώμα) αντίστοιχα (Boido, Alcade-Eon, Carrau, Dellacassa & Rivas-Gonzaleo, 2006).

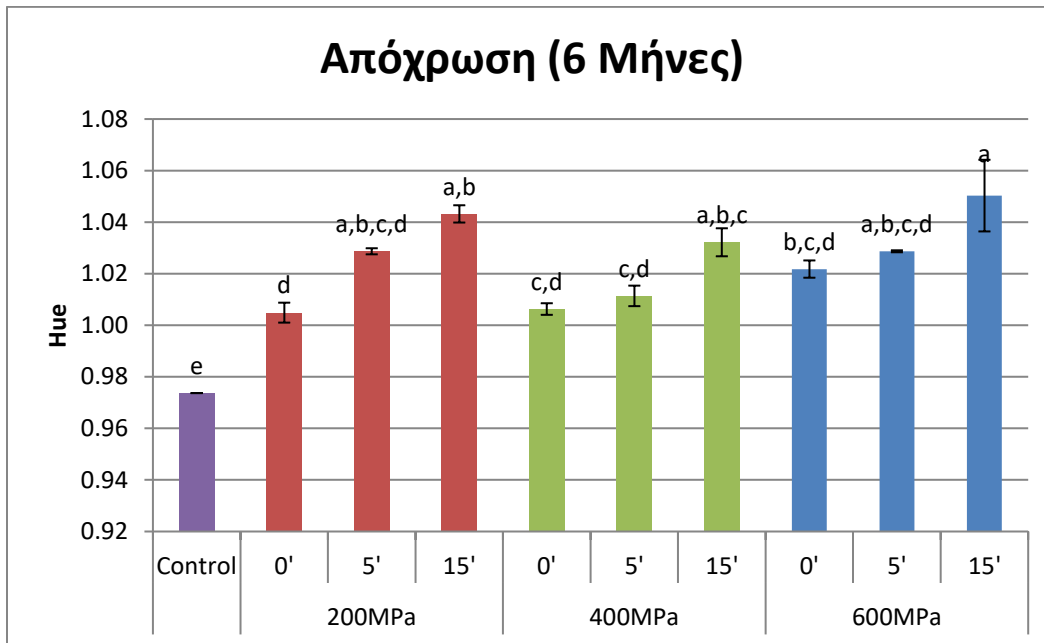
Η μείωση που παρατηρείται στο διάστημα των έξι μηνών, πιθανόν να οφείλεται στην μείωση των ανθοκυανών (Διάγραμμα 31α), που παρατηρείται κατά την παλαίωση, λόγω συμμετοχής των μονομερών ανθοκυανών σε πολυάριθμες αντιδράσεις συμπύκνωσης, καθώς και σε άλλες αντιδράσεις υδρόλυσης και αποικοδόμησης σε μικρότερο βαθμό (Santos-Buelga *et al.*, 1999). Ο σχηματισμός νέων χρωστικών που πραγματοποιείται κατά την φυσική παλαίωση των οίνων, δύναται να μετατοπίσει το χρώμα τους από το αρχικά κυρίαρχο ερυθρό χρώμα, σε άλλες αποχρώσεις όπως κίτρινο και μπλε (Fernández *et al.*, 2003; Perez-Magarino & Gonzalez-San Jose, 2004).

Απόχρωση



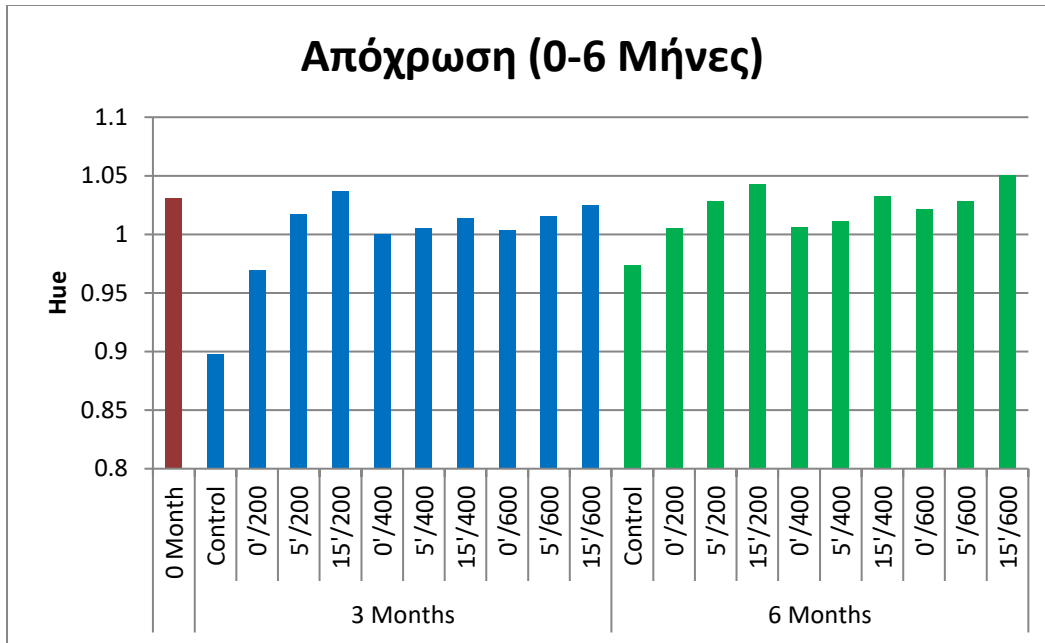
Διάγραμμα 27: Απόχρωση των οίνων με διαφορετικές πιέσεις στους τρεις μήνες. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στα δείγματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

Στο Διάγραμμα 27 απεικονίζεται η απόχρωση των οίνων στους τρεις μήνες αποθήκευσης. Το δείγμα Control εμφανίζει την χαμηλότερη τιμή απόχρωσης, ενώ το δείγμα 15'/200 παρουσιάζει την υψηλότερη.

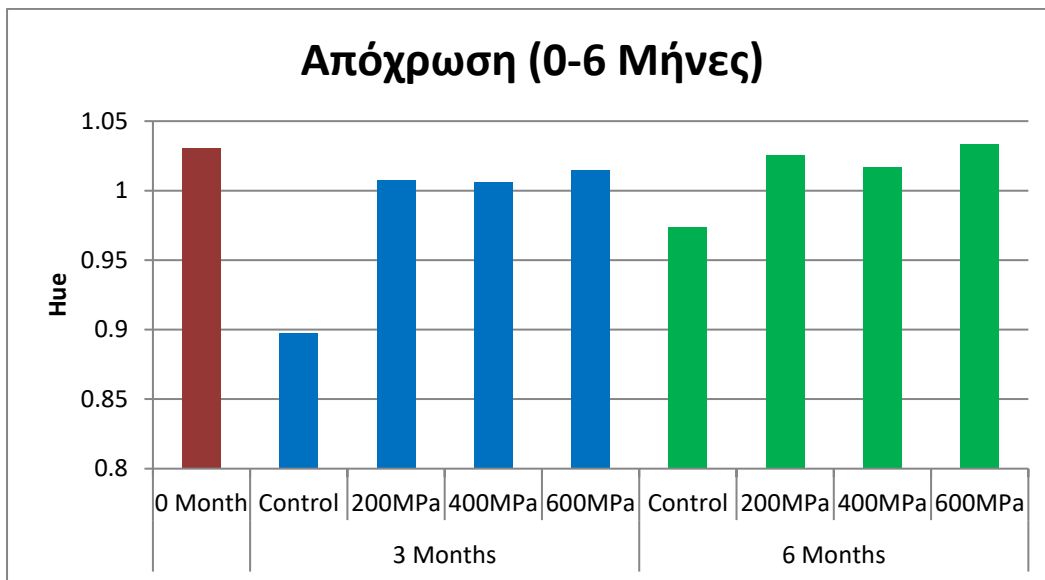


Διάγραμμα 28: Απόχρωση των οίνων με διαφορετικούς συνδυασμούς πίεσης και χρόνου στους έξι μήνες. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στα δείγματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

Στο Διάγραμμα 28, παρατίθενται οι τιμές της απόχρωσης όλων των οίνων μετά το διάστημα των έξι μηνών. Η υψηλότερη τιμή της απόχρωσης παρατηρείται στο δείγμα 15'/600, ενώ η χαμηλότερη στο δείγμα Control. Η εφαρμογή της HHP, 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).



Διάγραμμα 29α: Εξέλιξη της απόχρωσης των οίνων σε διάστημα έξι μηνών.



Διάγραμμα 29β: Εξέλιξη της απόχρωσης των οίνων σε διάστημα έξι μηνών βάσει πίεσης.

Στα παραπάνω διαγράμματα (Διάγραμμα 29α και 29β) παρουσιάζεται η εξέλιξη της απόχρωσης των οίνων μέσα σε διάστημα έξι μηνών. Η απόχρωση, φαίνεται μέσα στο διάστημα των τριών μηνών να μειώθηκε λίγο, ενώ αυξήθηκε στους έξι μήνες. Οι τιμές που λήφθηκαν για την απόχρωση των οίνων στην πρώτη δειγματοληψία (0 μήνες), οι οποίες υποδεικνύουν την χημική ηλικία ενός οίνου, εμφανίζονται γύρω στο 1,01 και χαρακτηρίζονται αυξημένες για φρέσκο οίνο.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΗΗΡ ΣΤΑ ΧΡΩΜΑΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΟΙΝΟΥ

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 συμφωνία με το αποτέλεσμα αυτής της μελέτης.

Η διαφορά στην περιεκτικότητα των μονομερών ανθοκυανών μετά το διάστημα των έξι μηνών (Διάγραμμα 36α και Διάγραμμα 36β), έγινε αντιληπτή από την μέτρηση της έντασης του χρώματος κι από την μέτρηση της απόχρωσης. Το 'πιεσμένο' δείγμα 15'/600 εμφανίστηκε με υψηλότερη τιμή 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 εξέλιξη της απόχρωσης των 'πιεσμένων' οίνων, σε σχέση και με το δείγμα 'Control', επιβεβαιώνει ότι η εφαρμογή της ΗΗΡ 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, συνεπώς χρειάζεται περαιτέρω έρευνα για τον συνδυασμό πίεσης και χρόνου που θα μπορέσει να ανταποκριθεί στις απαιτήσεις της αγοράς.

Ανθοκυάνες με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

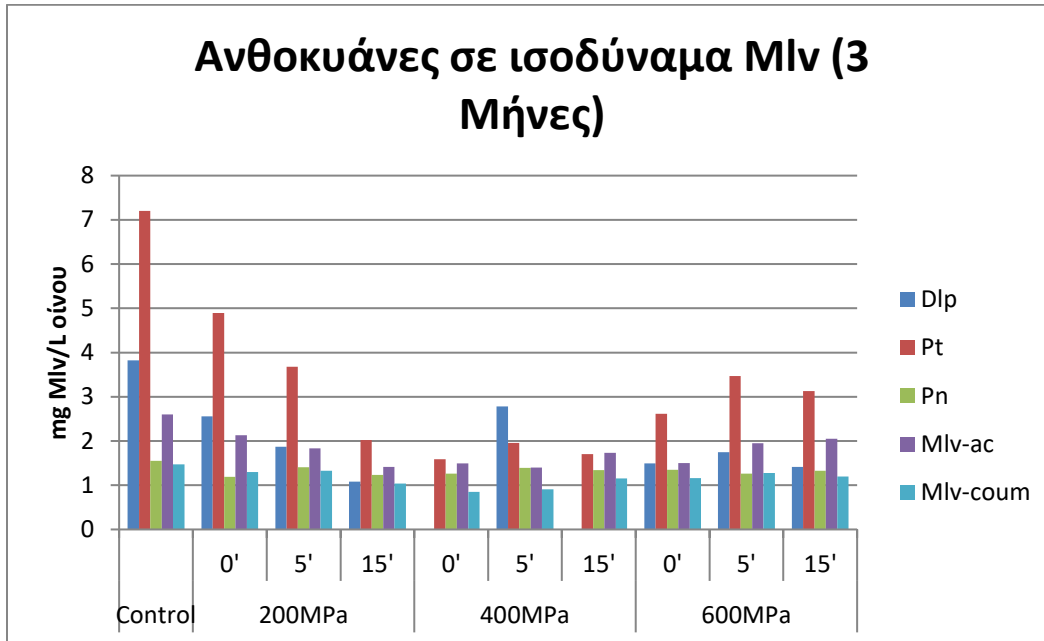
Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 8) παρατίθενται οι τιμές των ανθοκυανών που λήφθηκαν κατά την πρώτη δειγματοληψία. Αξίζει να αναφερθεί πως η ΗΗΡ αμέσως μετά την εφαρμογή της, δεν επηρεάζει τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του οίνου (Santos *et al.*, 2016).

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

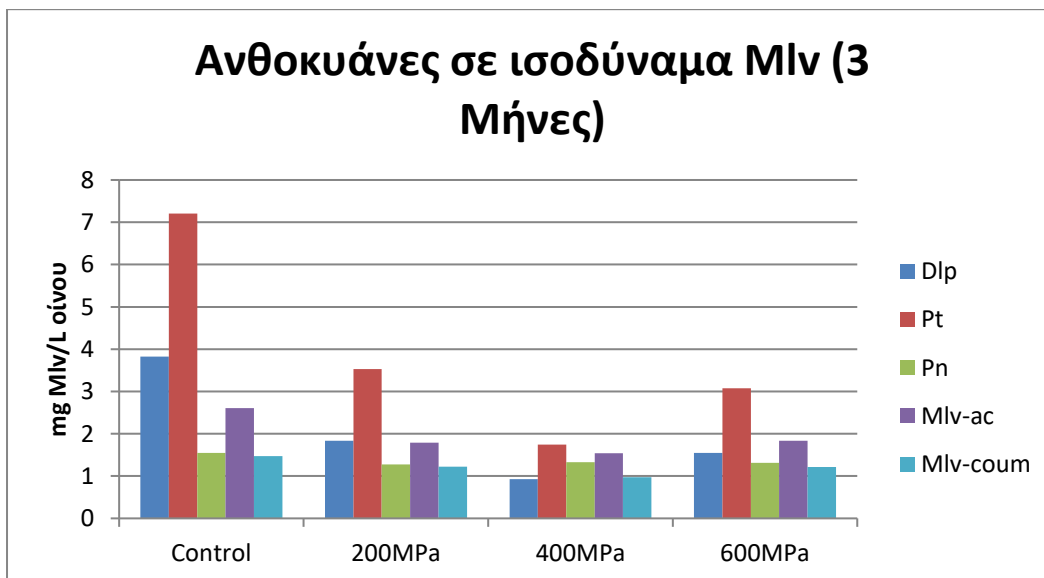
Dlp	Pt	Pn	Mlv	Mlv-ac	Mlv-coum
7.950	18.540	2.544	222.764	5.780	

Στα διαγράμματα που ακολουθούν (Διάγραμμα 30α και Διάγραμμα 30β), παρουσιάζονται οι ανθοκυάνες των οίνων, με τις διαφορετικές πιέσεις, εκφρασμένες σε mg μαλβιδίνης ανά λίτρο οίνου

(mg Mlv/L οίνου) στους τρεις μήνες παλαίωσης. Ο μονογλυκοζίτης της μαλβιδίνης (Mlv) ήταν η κυρίαρχη ανθοκυάνη σε όλα τα δείγματα και θα δείξουμε την εξέλιξή της στους 6 μήνες αποθήκευσης σε ξεχωριστά διαγράμματα (Διάγραμμα 32α και Διάγραμμα 32β).

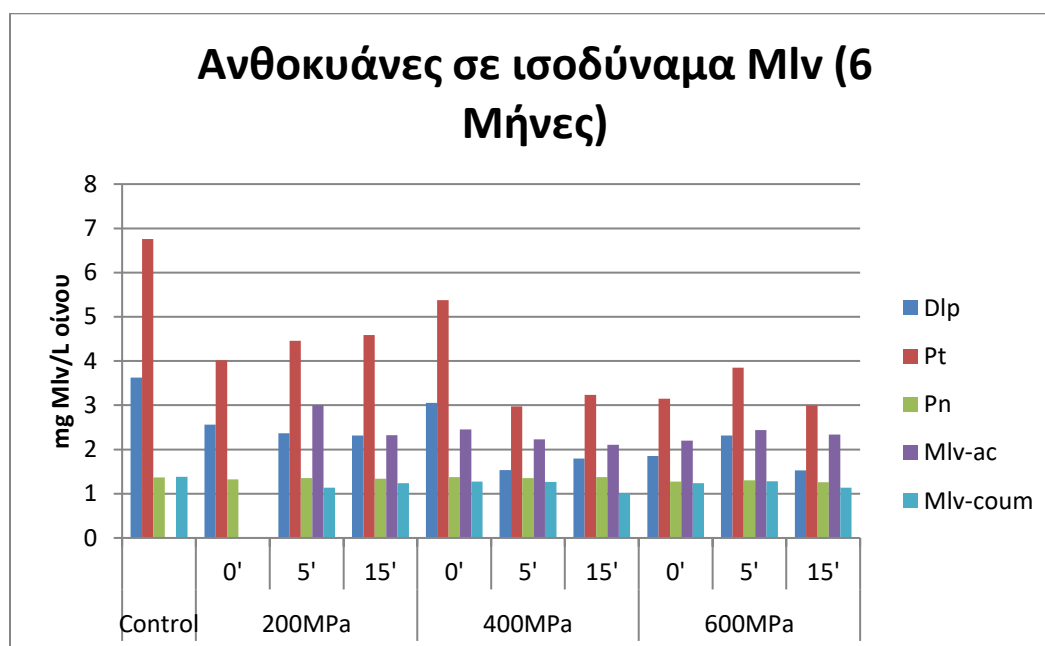


Διάγραμμα 30α: Ανθοκυάνες με HPLC εκφρασμένες σε ισοδύναμα μαλβιδίνης των οίνων με διαφορετικές πιέσεις. Όπου στο υπόμνημα: Dlp, 3-O-μονογλυκοζίτης της δελφινιδίνης, Pt, 3-O-μονογλυκοζίτης της πετουνιδίνης, Pn, 3-O-μονογλυκοζίτης της παιονιδίνης; Mlv, 3-O-μονογλυκοζίτης της μαλβιδίνης, Mlv-ac, οξικός εστέρας του 3-O-μονογλυκοζιτη της μαλβιδίνης, Mlv-coum, κουμαρικός εστέρας του 3-O-μονογλυκοζιτη της μαλβιδίνης.

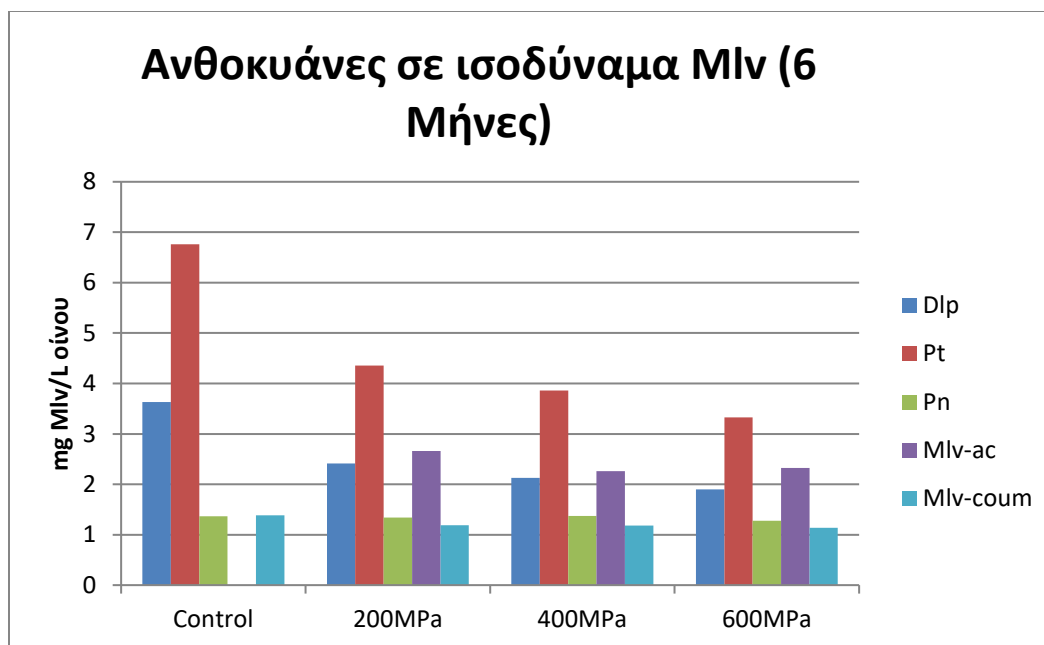


Διάγραμμα 30β: Ανθοκυάνες με HPLC εκφρασμένες σε ισοδύναμα μαλβιδίνης των οίνων βάσει των διαφορετικών πιέσεων.

Όπως αναφέραμε η μαλβιδίνη ήταν η κύρια ανθοκυάνη σε όλα τα δείγματα, ενώ επόμενη κυρίαρχη ανθοκυάνη στον οίνο ήταν ο μονογλυκοζίτης της πετουινιδίνης (Pt), κι εν συνεχεία ήταν ο μονογλυκοζίτης της δελφινιδίνης (Dlp), όπου εμφανίζεται, κι έπειτα ο οξικός εστέρας της μαλβιδίνης (Mlv-ac). Μέγιστη συγκέντρωση του Pt απαντά στο δείγμα Control και ελάχιστη στο δείγμα 0'/400, ενώ μέγιστη συγκέντρωση του Dlp απαντά στο δείγμα Control κι ελάχιστη στο δείγμα 15'/200. Οι ανθοκυάνες με τις μικρότερες συγκεντρώσεις ο μονογλυκοζίτης της παιονιδίνης (Pn) και ο κουμαρικός εστέρας της μαλβιδίνης (Mlv-coum). Σε κανέναν οίνο δεν ανιχνεύτηκε μονογλυκοζίτης της κυανιδίνης.

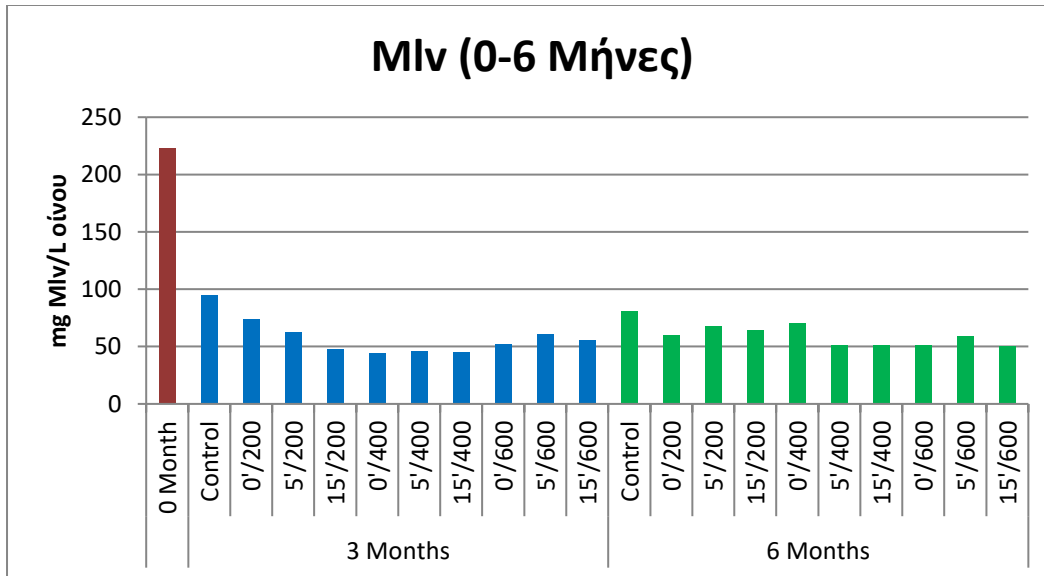


Διάγραμμα 31α: Ανθοκυάνες με HPLC εκφρασμένες σε ισοδύναμα μαλβιδίνης των οίνων με διαφορετικές πιέσεις. Όπου στο υπόμνημα: Dlp, 3-O-μονογλυκοζίτης της δελφινιδίνης, Pt, 3-O-μονογλυκοζίτης της πετουινιδίνης, Pn, 3-O-μονογλυκοζίτης της παιονιδίνης; Mlv, 3-O-μονογλυκοζίτης της μαλβιδίνης, Mlv-ac, οξικός εστέρας του 3-O-μονογλυκοζίτη της μαλβιδίνης, Mlv-coum, κουμαρικός εστέρας του 3-O-μονογλυκοζίτη της μαλβιδίνης.

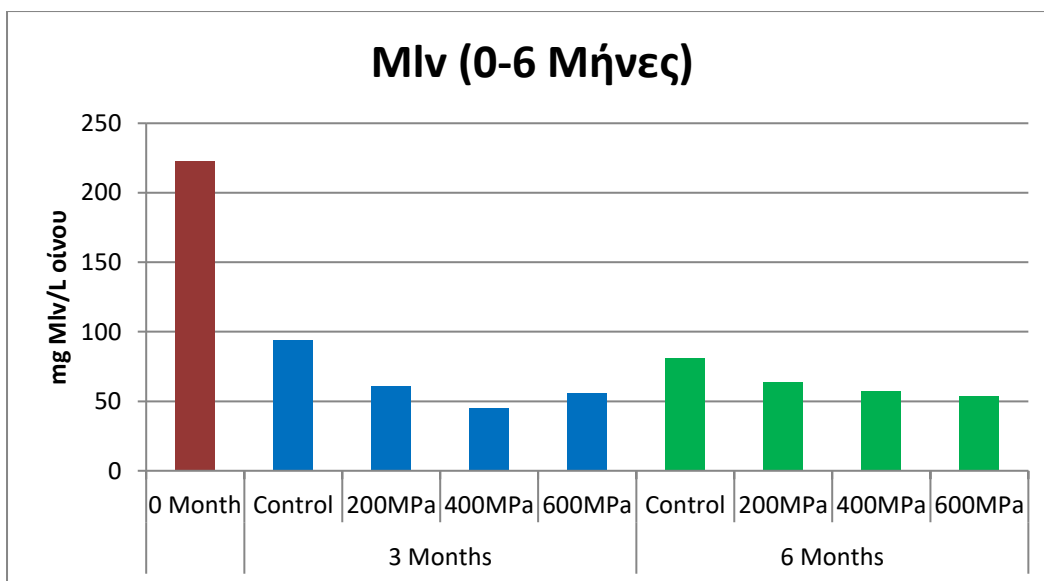


Διάγραμμα 31β: Ανθοκυάνες με HPLC εκφρασμένες σε ισοδύναμα μαλβιδίνης των οίνων βάσει των διαφορετικών πιέσεων, στους έξι μήνες αποθήκευσης.

Στα παραπάνω διαγράμματα (Διάγραμμα 31α και Διάγραμμα 31β), απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις των ανθοκυανών των οίνων των διαφορετικών πιέσεων, στους έξι μήνες, εκφρασμένοι σε mg μαλβιδίνης ανά λίτρο οίνου (mg Mlv/L οίνου). Και σε αυτούς τους οίνους ο μονογλυκοζίτης της μαλβιδίνης (Mlv) είναι η κυρίαρχη ανθοκυάνη. Ο μονογλυκοζίτης της πετουινιδίνης (Pt) είχε την αμέσως επόμενη μεγαλύτερη συνεισφορά στο ανθοκυανικό προφίλ όλων των οίνων που μελετήθηκαν, ενώ ακολούθησαν ο μονογλυκοζίτης της δελφινιδίνης (Dlp) και ο οξικός εστέρας της μαλβιδίνης (Mlv-ac). Επίσης τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε όλους τους οίνους είχαν η παιονιδίνη (Pn) και ο κουμαρικός εστέρας της μαλβιδίνης (Mlv-coum), ενώ δεν εμφανίστηκε πουθενά ο μονογλυκοζίτης της κυανιδίνης.



Διάγραμμα 32α: Εξέλιξη μαλβιδίνης στους έξι μήνες αποθήκευσης του οίνου.



Διάγραμμα 32β: Εξέλιξη μαλβιδίνης στους έξι μήνες αποθήκευσης βάσει πίεσης.

Στα παραπάνω διαγράμματα (Διάγραμμα 32α και Διάγραμμα 32β) παρατηρείται η εξέλιξη της κύριας ανθοκυάνης του οίνου, της μαλβιδίνης, στους 6 μήνες αποθήκευσης του οίνου. Η μέγιστη συγκέντρωση μαλβιδίνης παρατηρείται στο δείγμα Control τόσο στους 3 όσο και στους 6 μήνες, ενώ την χαμηλότερη συγκέντρωση μαλβιδίνης στους 3 μήνες εμφανίζει το δείγμα 0'/400 και στους 6 το 15'/600.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΗΗΡ ΣΤΙΣ ΑΝΘΟΚΥΑΝΕΣ ΤΟΥ ΟΙΝΟΥ

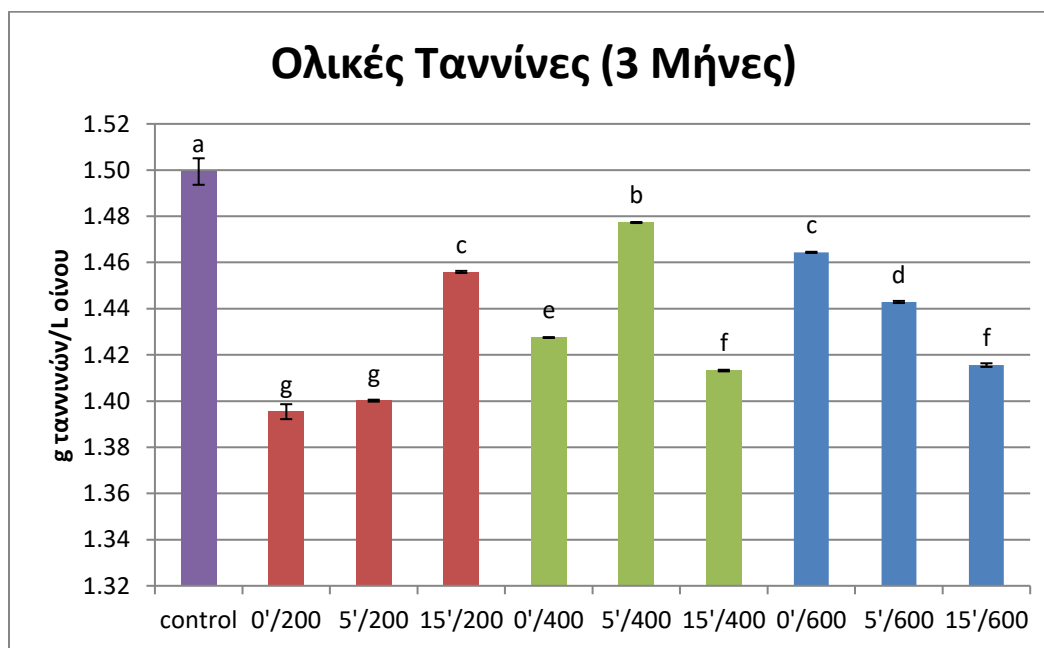
Οι χαμηλές συγκεντρώσεις μονομερών ανθοκυανών στους έξι μήνες, μπορεί αν οφείλονται σε χημική οξείδωση των ανθοκυανών λόγω της συγκέντρωσης του SO_2 , ο οποίος προστατεύει από την οξείδωση των φαινολικών. Συνολικά, όλοι οι οίνοι παρουσίασαν μείωση στην ολική περιεκτικότητα σε μονομερείς ανθοκυάνες μετά 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). Στη διαδικασία αυτή μάλιστα, ενδεχομένως να συμμετείχε και η ακεταλδεΐδη, αφού σημειώθηκε παράλληλη μείωση στη συγκέντρωσή της (Διάγραμμα 8). Γνωρίζουμε επίσης, ότι οι παράγοντες που επηρεάζουν την συγκέντρωση των ανθοκυανών, είναι τυχόν προσροφήσεις, καταβυθίσεις ή και αλληλεπίδρασή τους με τις τανίνες.

Αξίζει να αναφέρουμε ότι ο SO_2 είναι ένας ακόμη παράγοντας που σχετίζεται με την συγκέντρωση των ανθοκυανών καθώς η απουσία SO_2 , αφήνει ελεύθερα τα ηλεκτρονιόφιλα κέντρα των ανθοκυανών διευκολύνοντας έτσι των πολυμερισμό τους, ειδικά στην περίπτωση που ο οίνος υποβάλλεται σε ΗΗΡ. Παράλληλα, η ΗΗΡ έχει την δυνατότητα να μεταβάλλει την ισορροπία μεταξύ των διαφόρων μορφών του θειώδους ανυδρίτη στους οίνους, επηρεάζοντας τη δέσμευση του από τα ηλεκτρονιόφιλα κέντρα των ανθοκυανών (Tao *et al.*, 2012). Ωστόσο, με βάση τα δεδομένα για το mDP που παρατίθενται και πιο κάτω (Διάγραμμα 40), πιθανή εξήγηση μπορεί να αποτελεί και ο μεγαλύτερος βαθμός οξείδωσης των ανθοκυανών από υψηλής δραστηριότητας ελεύθερες ρίζες που παράγονται κατά την εφαρμογή ΗΗΡ (Bolumar, Skibsted, & Orlien, 2012b; Clariana, *et al.*, 2011).

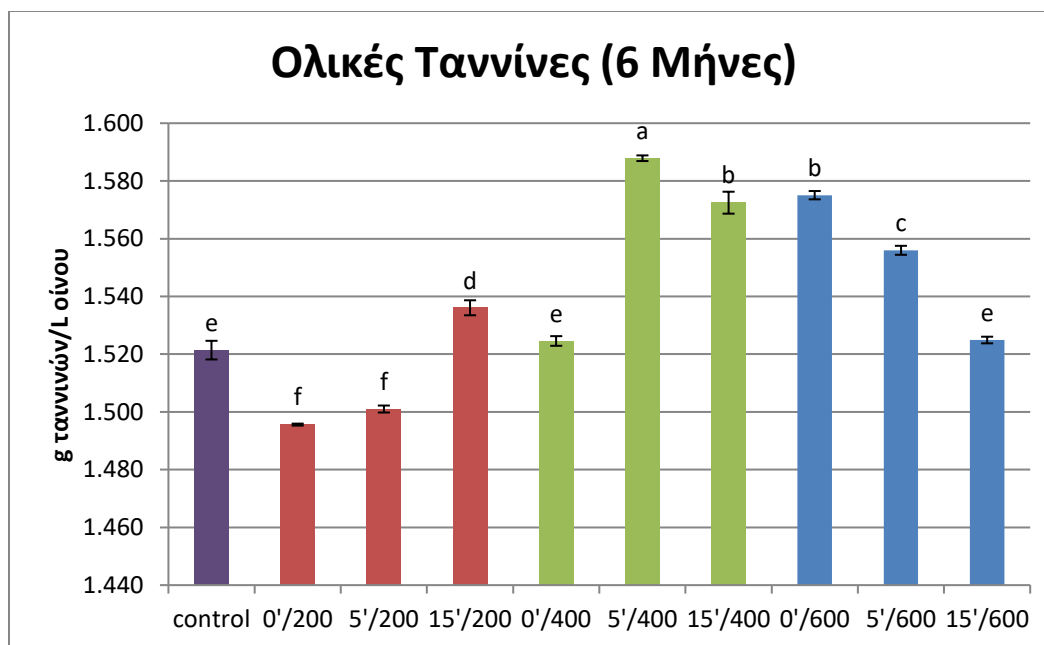
Η διαφορά στην περιεκτικότητα των μονομερών ανθοκυανών μετά το διάστημα των έξι μηνών, δεν έγινε αντιληπτή από την μέτρηση της έντασης του χρώματος, ούτε από την μέτρηση της απόχρωσης. Το 'πιεσμένο' δείγμα 15'/600 εμφανίστηκε με υψηλότερη τιμή έντασης χρώματος, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στο ελαφρώς μικρότερο pH αλλά και στα χαμηλότερα επίπεδα SO_2 , ο οποίος αποχρωματίζει τις ανθοκυάνες (Ribéreau-Gayon and Stonestreet, 1965). Η εξέλιξη της απόχρωσης των 'πιεσμένων' οίνων, σε σχέση και με το δείγμα 'Control', επιβεβαιώνει ότι η εφαρμογή της ΗΗΡ 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, συνεπώς χρειάζεται περαιτέρω έρευνα για τον συνδυασμό πίεσης και χρόνου που θα μπορέσει να ανταποκριθεί στις απαιτήσεις της αγοράς.

Τα δείγματα παρουσίασαν έντονη μείωση στη συγκέντρωση των μονομερών ανθοκυανών μετά την πάροδο των έξι μηνών. Συμπερασματικά, όπως έχει ήδη αναφερθεί, αυτό μπορεί να οφείλεται σε χημική οξειδωση των ανθοκυανών από υψηλής δραστηκότητας ρίζες που παράγονται κατά την εφαρμογή της ΗΗΡ ή/και σε αντιδράσεις συμπύκνωσης και πολυμερισμού, που οδηγούν τελικά στην καταβύθισή τους. Υψηλότερες συγκεντρώσεις μονομερών ανθοκυανών συγκριτικά με χαμηλότερες συγκεντρώσεις SO₂, μπορεί να οφείλονται και στο ότι ο SO₂ αντιδρά με τις ανθοκυάνες και με πολλά άλλα συστατικά, μειώνοντας τον ρυθμό πολυμερισμού των φαινολικών ενώσεων, που παρατηρείται συνήθως κατά την παλαίωση του οίνου (Santos *et al.*, 2012).

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

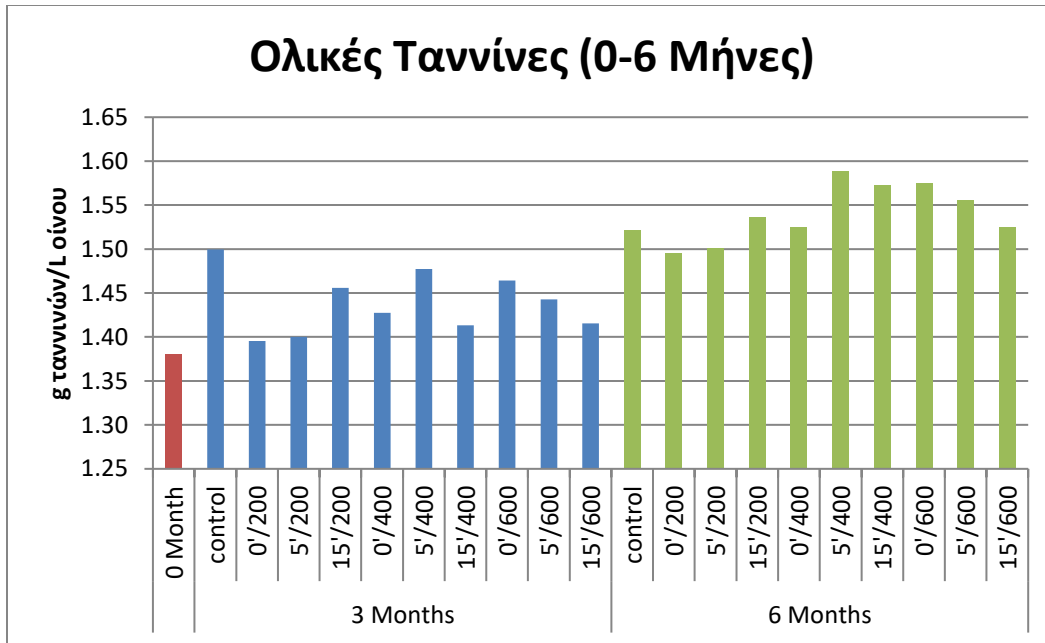


Διάγραμμα 33: Ολικές ταννίνες στα δείγματα οίνου μετά από τρεις μήνες παλαίωσης. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στα δείγματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

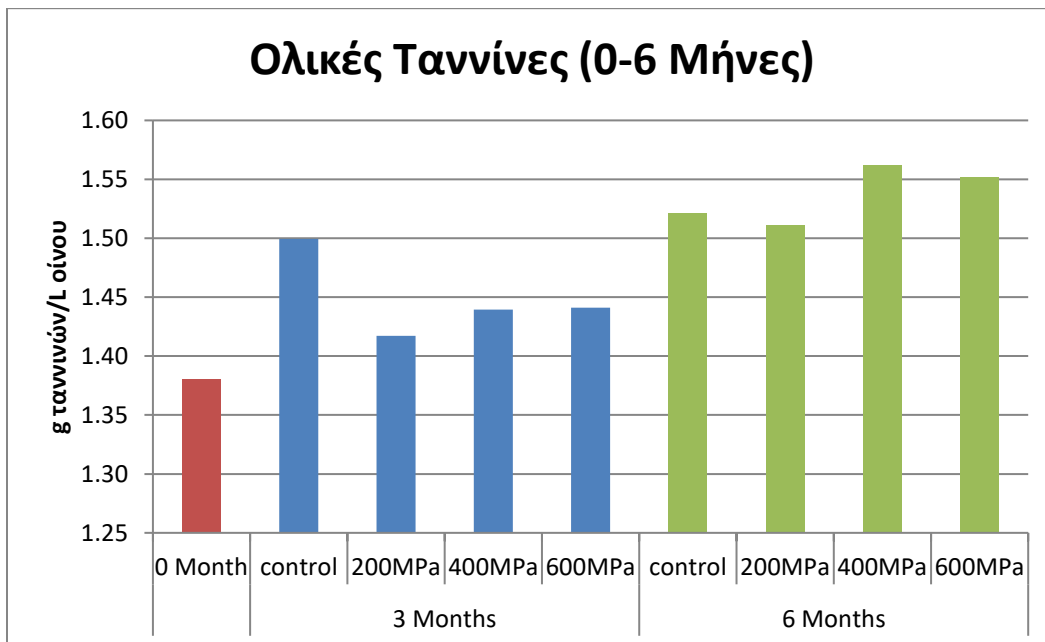


Διάγραμμα 34: Ολικές ταννίνες στα δείγματα οίνου (πιεσμένα και απίεστα) μετά από έξι μήνες παλαίωσης. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στα δείγματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

Στα παραπάνω διαγράμματα (Διάγραμμα 33 και Διάγραμμα 34) απεικονίζονται οι ολικές ταννίνες των πιεσμένων οίνων στους τρεις και στους έξι μήνες αντίστοιχα. Στους τρεις μήνες, το δείγμα Control εμφανίζει τις περισσότερες ολικές ταννίνες, ενώ τα δείγματα 0'/200 και 5'/200 τις λιγότερες. Εξετάζοντας τα επιμέρους δείγματα μετά από έξι μήνες, παρατηρήθηκε αύξηση στις ολικές ταννίνες με την υψηλότερη τιμή να καταγράφεται στο δείγμα 5'/400, ενώ η χαμηλότερη στο δείγμα 0'/200.



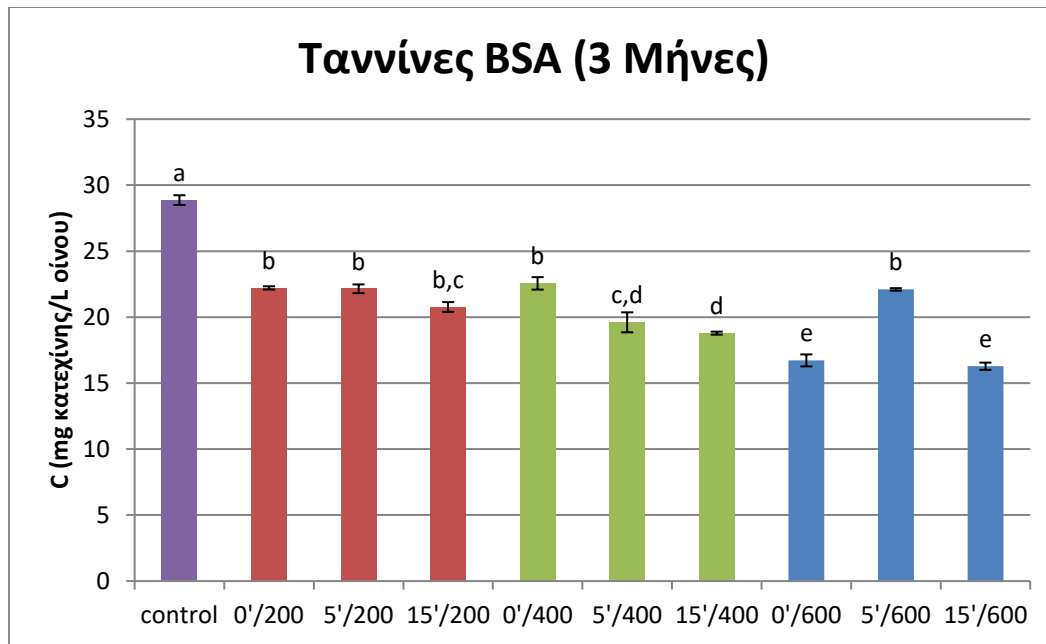
Διάγραμμα 35α: Εξέλιξη των ολικών ταννινών σε διάστημα έξι μηνών.



Διάγραμμα 35β: Εξέλιξη των ολικών ταννινών σε διάστημα έξι μηνών.

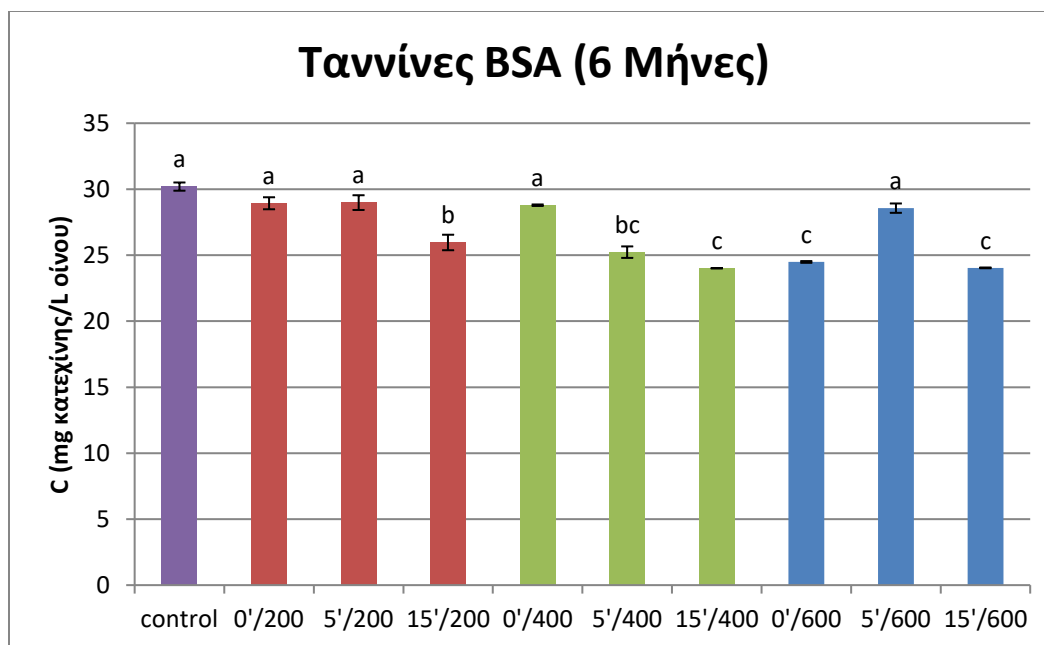
Στα Διαγράμματα 35α και 35β παρατηρούμε συνολικά την εξέλιξη των 'πιεσμένων' οίνων μέσα στον διάστημα των έξι μηνών. Μέσα στον χρόνο παρατηρείται μια ανοδική πορεία στην τιμή των ολικών ταννινών σε όλα τα δείγματα μέσα στο χρονικό διάστημα των έξι μηνών.

Ταννίνες με τη μέθοδο Harbertson (BSA)



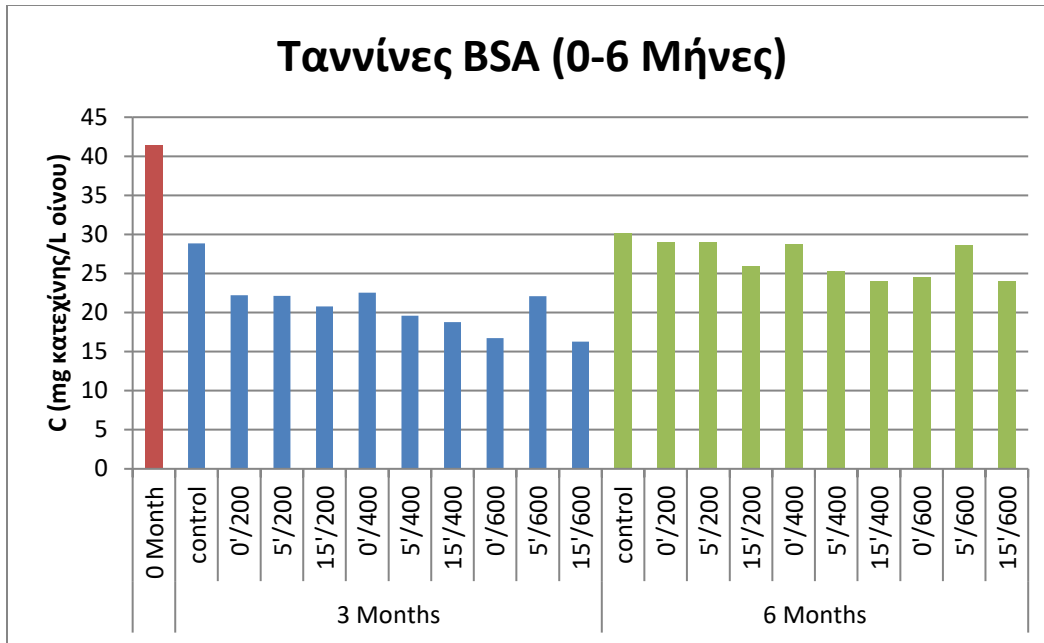
Διάγραμμα 36: Συγκέντρωση ταννινών (μέθοδος Harbertson), εκφρασμένη σε mg κατεχίνης ανά λίτρο οίνου, των 'πιεσμένων' οίνων με διαφορετικές πιέσεις και χρόνους πίεσης, μετά από τρεις μήνες. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στα δείγματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

Στο παραπάνω διάγραμμα (Διάγραμμα 36) παρατίθενται οι συγκεντρώσεις των ταννινών των οίνων με διαφορετικό συνδυασμό πίεσης και χρόνου πίεσης. 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 ταννινών σημειώνεται στο δείγμα Control. Η χαμηλότερη συγκέντρωση σύμφωνα με τη μέθοδο παρατηρήθηκε στους 'πιεσμένους' οίνους 0'/600 και 15'/600.

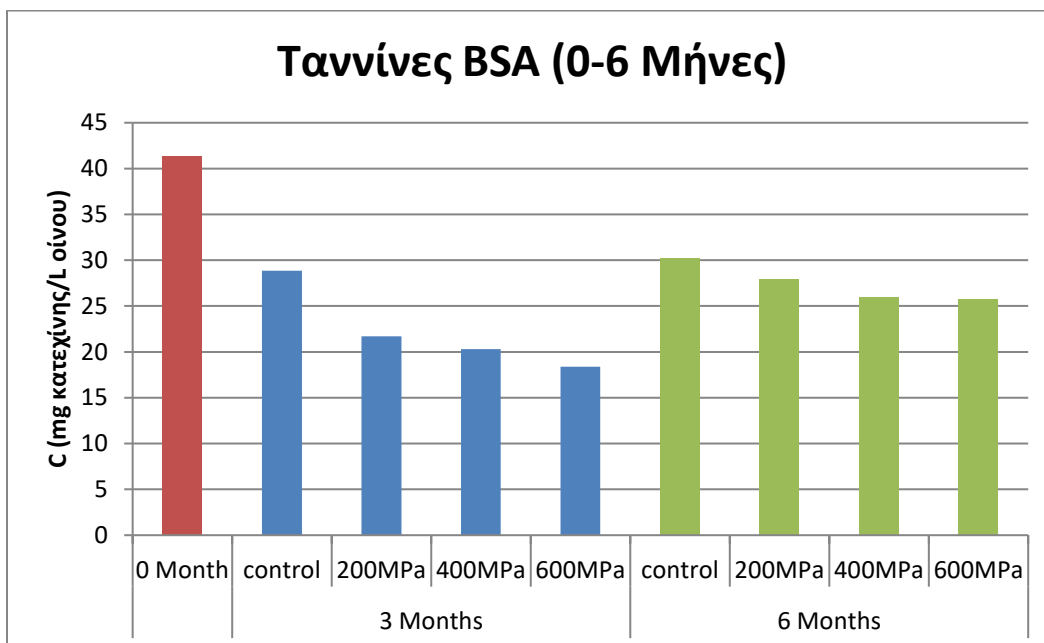


Διάγραμμα 37: Συγκέντρωση ταννινών (μέθοδος Harbertson), εκφρασμένη σε mg κατεχίνης ανά λίτρο οίνου, των 'πιεσμένων' οίνων με διαφορετικές πιέσεις και χρόνους πίεσης, μετά από έξι μήνες. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στα δείγματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

Στο Διάγραμμα 37 εμφανίζονται οι συγκεντρώσεις των ταννινών σε διάστημα έξι μηνών. Τα δείγματα 15'/400, 0'/600 και 15'/600 εμφάνισαν την χαμηλότερη συγκέντρωση, ενώ το δείγμα Control εμφάνισε την μεγαλύτερη συγκέντρωση ταννινών στους έξι μήνες, όπως και στην προηγούμενη δειγματοληψία.



Διάγραμμα 38α: Εξέλιξη της συγκέντρωσης των ταννινών με τη μέθοδο Harbertson σε διάστημα έξι μηνών.

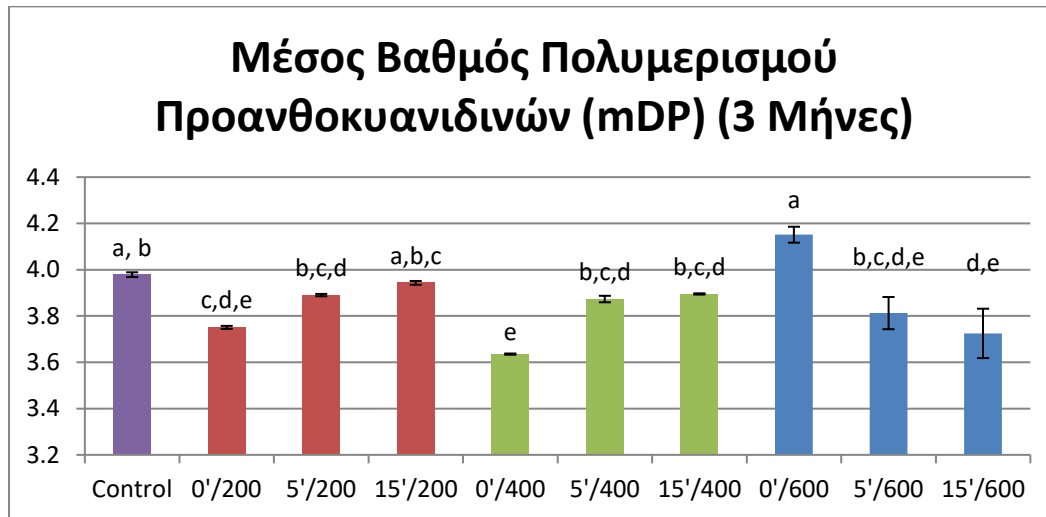


Διάγραμμα 38β: Εξέλιξη της συγκέντρωσης των ταννινών βάσει πίεσης, με τη μέθοδο Harbertson, σε διάστημα έξι μηνών.

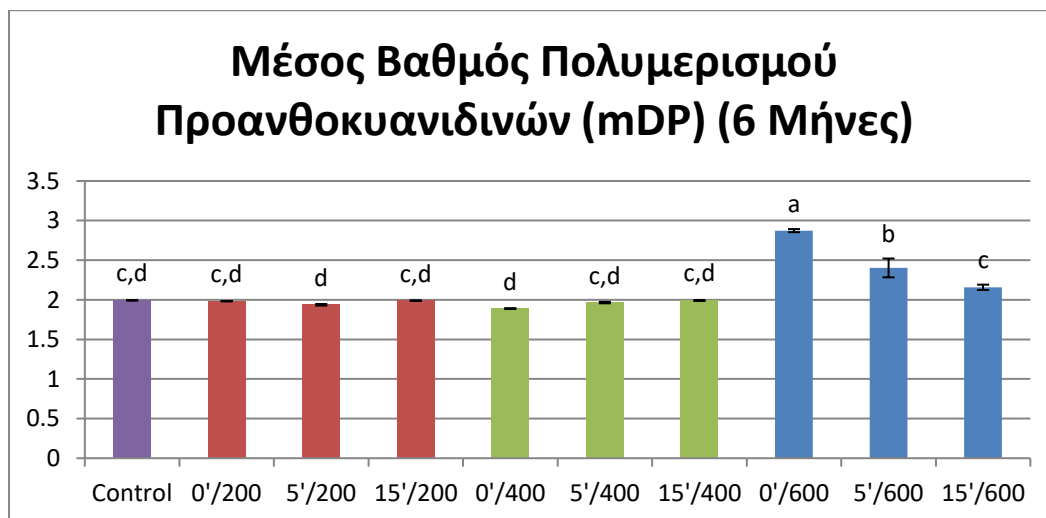
Στα Διαγράμματα 38α και 38β παρουσιάζεται η εξέλιξη της συγκέντρωσης των ταννινών με τη μέθοδο Harbertson σε χρονικό διάστημα έξι μηνών. Η συγκέντρωση των ταννινών αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου.

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

Ο mDP του οίνου στην πρώτη δειγματοληψία που πραγματοποιήθηκε (μήνας 0) ήταν 1.6353 ± 0.0337 (όπου με \pm υποδεικνύεται το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου της τιμής).



Διάγραμμα 39: Μέσος βαθμός πολυμερισμού (mDP) των προανθοκυανιδινών στους οίνους με τις διαφορετικές πιέσεις μετά από την πάροδο τριών 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, $p < 0.05$).

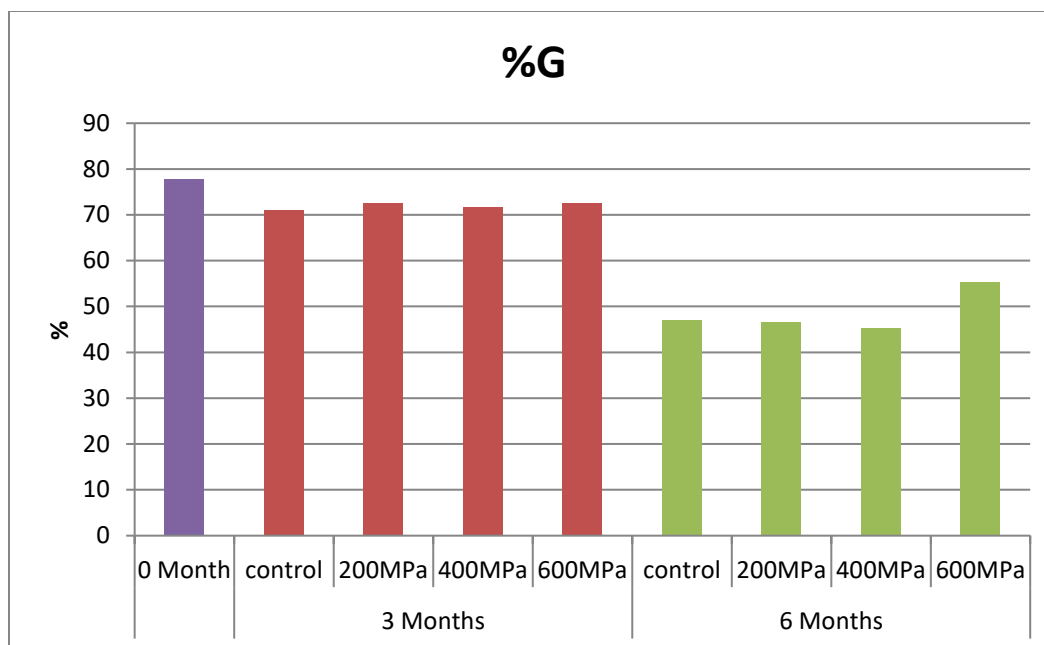


Διάγραμμα 40: Μέσος βαθμός πολυμερισμού (mDP) των προανθοκυανιδινών στους οίνους με τις διαφορετικές πιέσεις μετά από την πάροδο έξι μηνών. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στους οίνους διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

Στα παραπάνω διαγράμματα (Διάγραμμα 39 και Διάγραμμα 40) απεικονίζεται ο μέσος βαθμός πολυμερισμού προανθοκυανιδινών (mDP) των οίνων με πιέσεις 0, 200, 400 και 600 MPa στους τρεις και έξι μήνες αντίστοιχα. Ο υψηλότερος mDP στους τρεις μήνες παρουσιάζεται στον οίνο 0'/600, ενώ ο χαμηλότερος στον οίνο 0'/400. Μετά από έξι μήνες ο πιεσμένος οίνος 0'/600 εμφανίζει κι εδώ τον μεγαλύτερο mDP και ο χαμηλότερος απαντά πάλι στο δείγμα 0'/400. Όλα τα δείγματα παρουσιάζουν μείωση στον βαθμό πολυμερισμού από τους τρεις μέχρι τους έξι μήνες. 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 ταννικός (Chira *et al.*, 2011).

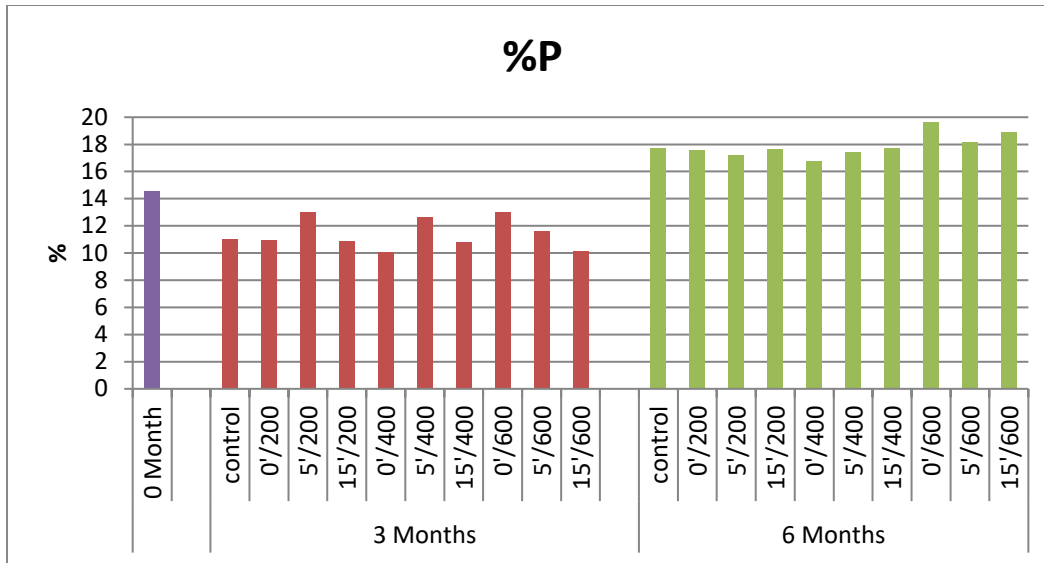


Διάγραμμα 41α: Ποσοστό εστεροποίησης (%G) των τανινών στους οίνους των διαφορετικών πιέσεων στο διάστημα των έξι μηνών.

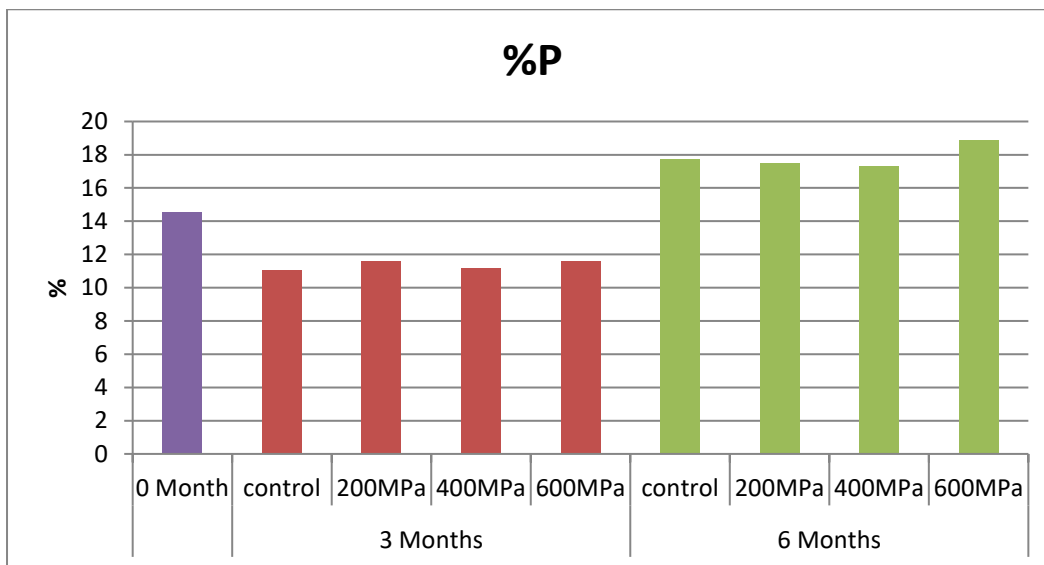


Διάγραμμα 41β: Ποσοστό εστεροποίησης (%G) των τανινών στον οίνο, βάσει πίεσης που εφαρμόστηκε στα δείγματα, στο διάστημα των έξι μηνών.

Στα παραπάνω διαγράμματα (Διάγραμμα 41α και Διάγραμμα 41β), παρουσιάζεται το ποσοστό εστεροποίησης των τανινών με γαλλικό οξύ (%G) στο διάστημα των έξι μηνών για όλα τα δείγματα. Παρατηρούνται ιδιαίτερα υψηλές τιμές εστεροποίησης με γαλλικό οξύ. Στην πρώτη δειγματοληψία το ποσοστό είναι μέγιστο (77.7%), ενώ στους τρεις μήνες, το δείγμα 0'/600 φαίνεται να εμφανίζει το υψηλότερο ποσοστό (74.9%). Το χαμηλότερο ποσοστό απαντά στον οίνο 0'/400 (33.8%). Όσον αφορά τους έξι μήνες, κι εδώ η υψηλότερη τιμή παρατηρείται στον οίνο 0'/600 (62.7%) και η χαμηλότερη τιμή καταγράφεται στον οίνο 0'/400 (42.6%). Με την πάροδο του χρόνου, από τους μηδέν μέχρι τους έξι μήνες, το ποσοστό εστεροποίησης παρουσιάζει μείωση στους οίνους.



Διάγραμμα 42α: Ποσοστό προδελφινιδινών (%P) στους 'πιεσμένους' οίνους των διαφορετικών χρόνων πίεσης και διαφορετικών πιέσεων στο διάστημα των έξι μηνών.



Διάγραμμα 42β: Ποσοστό προδελφινιδινών (%P) στους 'πιεσμένους' οίνους βάσει των διαφορετικών πιέσεων στο διάστημα των έξι μηνών.

Στα παραπάνω διαγράμματα (Διάγραμμα 42α και Διάγραμμα 42β), παρατίθεται το ποσοστό προδελφινιδινών (%P) όλων των οίνων, όπως καταγράφηκαν στο διάστημα των έξι μηνών. Στους 3 μήνες παρατηρείται τα χαμηλότερα ποσοστά με μέγιστο στο δείγμα 0'/600 (13%) και ελάχιστο στο δείγμα 0'/400 (10%). Στους έξι μήνες παρατηρείται το υψηλότερο ποσοστό στον 'πιεσμένο' οίνο 0'/600 (19.7%), ενώ το χαμηλότερο εμφανίζεται στον 'πιεσμένο' οίνο 0'/400 (16.8%).

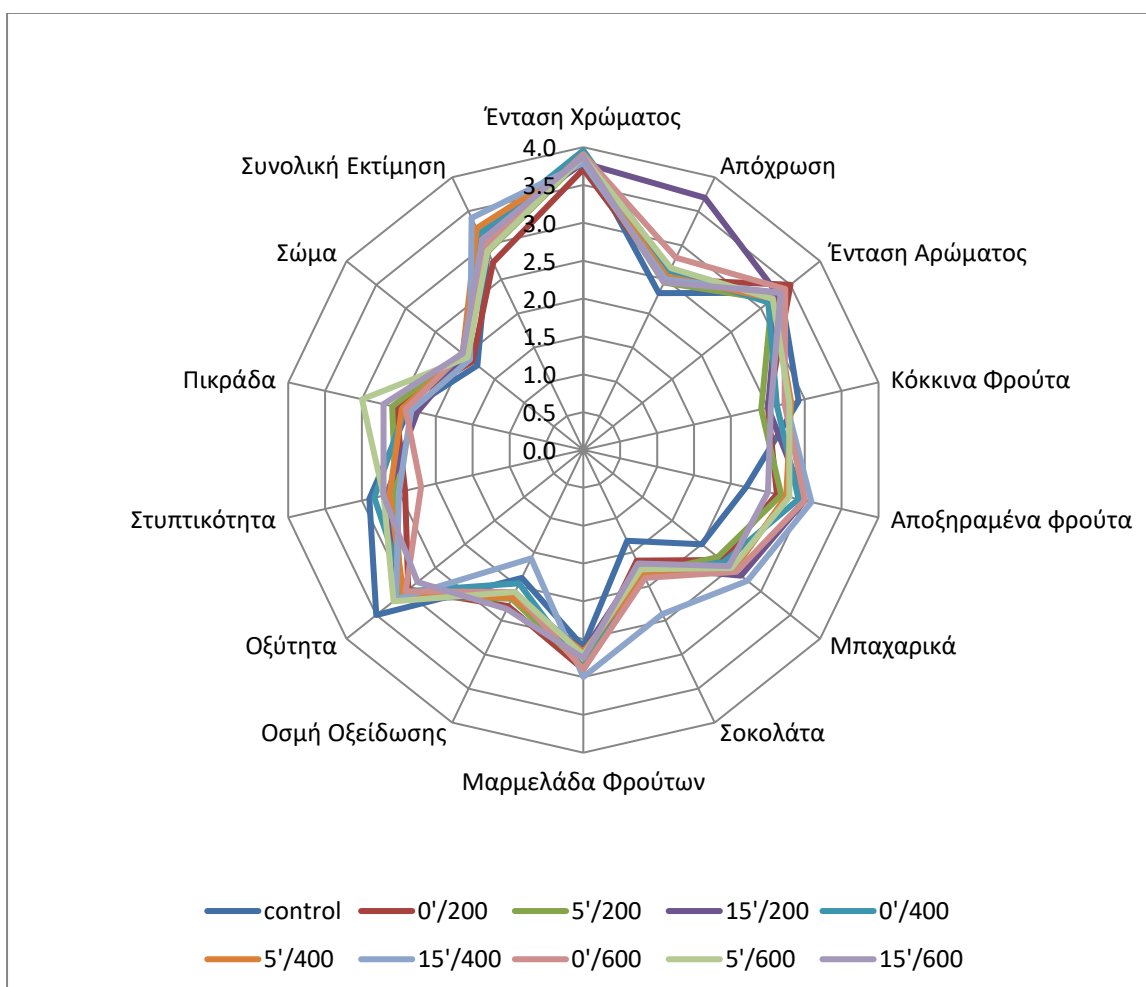
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΗΗΡ ΣΤΗΝ ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΤΑΝΝΙΝΩΝ ΤΟΥ ΟΙΝΟΥ

Η μείωση του mDP των κατεργασμένων με ΗΗΡ δειγμάτων, μετά από 6 μήνες, μπορεί να οφείλεται σε μεγαλύτερο βαθμό οξείδωσης των προανθοκυανιδινών από ελεύθερες ρίζες (Bolumar *et al.*, 2012b). Επιπλέον, σύμφωνα με μελέτες, ο mDP φαίνεται να αυξάνει τις αντιδράσεις συμπύκνωσης των φαινολικών ενώσεων κατά την παλαίωση του οίνου, σχηματίζοντας ενώσεις με μεγαλύτερο βαθμό πολυμερισμού (Santos *et al.*, 2013, Santos *et al.*, 2016, Santos *et al.*, 2018). Η μεγαλύτερη αρχική τιμή του mDP, ενδεχομένως να προέκυψε από το μεγαλύτερο βαθμό διάλυσης του O₂ κατά την εφαρμογή της ΗΗΡ, που προάγει τις αντιδράσεις πολυμερισμού, σε συνδυασμό με την προστασία που παρέχει ο SO₂ (Santos *et al.*, 2016).

Η στυπτικότητα εξαρτάται όχι μόνο από τις τιμές του mDP, αλλά και από αυτές των %G και %P. 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 (Kyraleou *et al.*, 2016; Wollmann&Hofmann, 2013), είτε αρνητική συσχέτιση (Chira *et al.*, 2015). Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, γνωρίζουμε επίσης, πως η μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας (AOA) (Διάγραμμα 34), σχετίζεται με την μείωση του ποσοστού εστεροποίησης και την πτώση των φαινολικών ενώσεων (Leeuw *et al.*, 2014). 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).

Συμπερασματικά, αναφορικά με τον μέσο βαθμό πολυμερισμού των προανθοκυανιδινών, παρατηρήσαμε ότι εξαρτάται άμεσα από την πίεση και την ΗΗΡ. Οι 'πιεσμένοι' οίνοι εμφανίζουν, μετά τους έξι μήνες αποθήκευσης, τις χαμηλότερες τιμές μέσου βαθμού πολυμερισμού και τα μικρότερα ποσοστά εστεροποίησης με γαλλικό οξύ. Αυτά τα δεδομένα πιθανόν να είναι ένδειξη για μειωμένη στυπτικότητα σε αυτούς τους οίνους (Chira *et al.*, 2011).

Οργανοληπτικός Έλεγχος



Διάγραμμα 43: Αποτελέσματα οργανοληπτικού ελέγχου των οίνων στους έξι μήνες.

Το αραχνοειδές γράφημα (Διάγραμμα 43) παρουσιάζει τις μέσες βαθμολογίες που έδωσαν στα οσφρητικά, γευστικά και οπτικά χαρακτηριστικά του οίνου στους έξι μήνες παλαίωσης. Σύμφωνα με το panel των δοκιμαστών, η υψηλότερη ένταση χρώματος απαντά στον οίνο 0'/400 και η χαμηλότερη στον οίνο 0'/200, με στατιστικά σημαντική διαφορά. Οι δοκιμαστές δεν κατάφεραν να ανιχνεύσουν τις στατιστικές διαφορές που εμφάνισαν μεταξύ τους τα 'πιεσμένα' δείγματα όπως φάνηκαν με την φωτομετρική μέθοδο Glories Y. (1984) (Διάγραμμα 26α).

Όσον αφορά την απόχρωση, ο οίνος 'Control' βαθμολογήθηκε χαμηλότερα, ενώ ο οίνος 15'/200 υψηλότερα, με στατιστικά σημαντική διαφορά. Τα αποτελέσματα των δοκιμαστών ταυτίζονται και με το αποτέλεσμα της ανάλυσης της απόχρωσης στους έξι μήνες (Διάγραμμα 29α).

Αναφορικά με την «Ένταση του Αρώματος», το δείγμα 0'/200 είχε την υψηλότερη βαθμολογία, ενώ το 0'/400 την χαμηλότερη.

Οι δοκιμαστές βαθμολόγησαν τον οίνο 'Control' με την υψηλότερη βαθμολογία στο κριτήριο «Κόκκινα Φρούτα» με στατιστικά σημαντική διαφορά, ενώ η χαμηλότερη βαθμολογία απαντά στον οίνο 5'/200. Σύμφωνα με το Διάγραμμα 43, το δείγμα 'Control' στα κριτήρια «Αποξηραμένα Φρούτα», «Μπαχαρικά», «Σοκολάτα» αλλά και «Μαρμελάδα Φρούτων» βαθμολογήθηκε χαμηλότερα με στατιστικά σημαντική διαφορά. Αντίθετα, το δείγμα 15'/400 στις κατηγορίες «Αποξηραμένα Φρούτα», «Μπαχαρικά», «Σοκολάτα» και «Μαρμελάδα Φρούτων» έλαβε την υψηλότερη βαθμολογία με στατιστικά σημαντική διαφορά από τα δείγματα που πήραν την χαμηλότερη βαθμολογία. Η χαμηλότερη βαθμολογία στην κατηγορία «Μαρμελάδα Φρούτων» παρατηρείται στο δείγμα 'Control'. Σύμφωνα με τους Santos *et al.* (2016) και Santos *et al.* (2019), ο 'πιεσμένος' οίνος παρουσιάζεται ως λιγότερο φρουτώδης και ανθικός, με εντονότερη την οσμή των «Μπαχαρικών» και «Αποξηραμένων Φρούτων». Σύμφωνα με τους Santos *et al.* (2015) τα «Αποξηραμένα Φρούτα» και η «Μαρμελάδα Φρούτων» σχετίζονται κυρίως με υψηλές συγκεντρώσεις σε ακετάλες, η παρουσία των οποίων στον οίνο, μπορεί να αυξηθεί φυσικά, λόγω της οξειδωσης κατά την παλαίωση. Οι 'πιεσμένοι' οίνοι έχει αναφερθεί επίσης, πως περιέχουν υψηλότερες συγκεντρώσεις σε 2-φουρφουράλη, αλδεΐδες και κετόνες, που υποδηλώνουν ότι η HHP επιταχύνει τις αντιδράσεις Maillard και την οξειδωση των λιπαρών οξέων προσδίδοντας στον οίνο οσμές χαρακτηριστικές των παλαιομένων οίνων (Santos *et al.*, 2015).

Την υψηλότερη βαθμολογία στην οσμή οξειδωσης λαμβάνουν οι οίνοι 0'/200 και 15'/600, ενώ την χαμηλότερη έλαβε το δείγμα 0'/600, με στατιστικά σημαντική διαφορά.

Οι δοκιμαστές βρήκαν ως πιο όξινο το δείγμα 'Control', ενώ με στατιστικά σημαντική διαφορά, ως λιγότερο όξινο το 15'/600. Σύμφωνα με την μέτρηση της πτητικής οξύτητας ([Πίνακας 7](#)), σε συμφωνία και με το panel, λιγότερο όξινο είναι το δείγμα 15'/600, ενώ αντίθετα το πιο όξινο το 0'/200.

Το δείγμα 0'/600 εμφανίζεται ως το λιγότερο στυπτικό, σύμφωνα με τους δοκιμαστές και το δείγμα 'Control' ως το πιο στυπτικό με στατιστικά σημαντική διαφορά. Είναι γνωστό ότι η στυπτικότητα των ερυθρών οίνων εξαρτάται από την φαινολική τους σύνθεση και από την συγκέντρωσή τους σε ταννίνες, ωστόσο, η περιεκτικότητά τους σε φλαβανόλες είναι η κυριότερη παράμετρος που επηρεάζει την στυπτικότητα (Kyrialeou *et al.*, 2016). Τα αποτελέσματα των δοκιμασιών ως προς το κριτήριο της

στυπτικότητας, συμφωνούν με αυτά της μεθόδου Harbertson ([Διάγραμμα 38α](#)) που αποτελεί δείκτη της χημικής στυπτικότητας των οίνων.

Όσον αφορά την πικράδα, τα δείγματα 15'/200 και 15'/400 εμφανίζουν την χαμηλότερη, ενώ η υψηλότερη πικράδα εμφανίζεται στο δείγμα 5'/600. Ανεπιθύμητη πίκρα μπορεί να προέρχεται από υπερβολική πίεση των σταφυλιών, ενώ δεν πρέπει να συνδέεται με την τανικότητα.

Σχετικά με το «σώμα», οι δοκιμαστές δεν κατάφεραν να εντοπίσουν διαφορά ανάμεσα στα δείγματα, με το δείγμα 'Control' να εμφανίζει ελαφρώς πιο χαμηλή βαθμολογία.

Τέλος, ως τον πιο ισορροπημένο γευστικά οίνο, οι δοκιμαστές επέλεξαν τον οίνο 15'/400, ενώ για το συγκεκριμένο κριτήριο η χαμηλότερη βαθμολογία δόθηκε στον οίνο 0'/200, έχοντας στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

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

Η εφαρμογή ΗΗΡ δύναται να επιφέρει αλλαγές στην συγκέντρωση του SO₂, οι οποίες σχετίζονται με την πίεση που εφαρμόζεται στον οίνο, αλλά και τον χρόνο πίεσης. Πιο συγκεκριμένα, τα 'πιεσμένα' δείγματα σημείωσαν μείωση στον ολικό και τον ελεύθερο θειώδη ανυδρίτη σε συμφωνία και με παλαιότερες μελέτες (Santos *et al.*, 2016 και Santos *et al.*, 2018). Η εφαρμογή ΗΗΡ δεν επιδρά αρνητικά στα χρωματικά χαρακτηριστικά, στην αντιοξειδωτική ικανότητα, το φαινολικό προφίλ και στην συγκέντρωση των ταννινών του ερυθρού οίνου, απευθείας μετά την εφαρμογή της και αυτά τα αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία και με παλαιότερες μελέτες (Mok *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2016; Santos, Nunes, Carpelle, *et al.*, 2013). Μετά όμως από διάστημα έξι μηνών, οι 'πιεσμένοι' οίνοι εμφάνισαν μείωση της πτητικής οξύτητας, αύξηση των ταννινών, μείωση στην ένταση του χρώματος και αύξηση στην απόχρωση και τέλος μικρότερες συγκεντρώσεις μονομερών ανθοκυανών και φλαβονολών, συγκριτικά με τους απίεστους, πιθανών λόγω των αντιδράσεων οξειδωσης που λαμβάνουν χώρα.

Συμπερασματικά, μελετώντας την συνολική εικόνα των αποτελεσμάτων των πειραμάτων μας, θα μπορούσαμε να προτείνουμε ως τον πλέον βέλτιστο συνδυασμό πίεσης και χρόνου τα 15 λεπτά στα 400MPa (15'/400). Ο 'πιεσμένος' οίνος εμφανίζει μειωμένη πτητική οξύτητα και την μικρότερη μείωση στην συγκέντρωση της μαλβιδίνης και των ταννινών. Η μείωση στην ένταση του χρώματος και η αύξηση της απόχρωσης, παρατηρείται στα περισσότερα δείγματα και οφείλεται στην επιτάχυνση της οξειδωσης, λόγω των ελεύθερων ριζών. Το πάνελ των δοκιμασιών έκρινε τον οίνο με πίεση 15 λεπτών στα 400MPa, ως τον πιο ισορροπημένο γευστικά οίνο, με την λιγότερη πικράδα. Τέλος, στις κατηγορίες «Αποξηραμένα Φρούτα», «Μπαχαρικά», «Σοκολάτα» και «Μαρμελάδα Φρούτων» πήρε την υψηλότερη βαθμολογία, γεγονός που φανερώνει επιτάχυνση της ωρίμανσης. Ωστόσο, για να καταλήξουμε σε ασφαλέστερα συμπεράσματα κρίνεται απαραίτητη εκτενέστερη μελέτη.

Καθώς η χρήση SO₂ είναι φθηνή αλλά και αποτελεσματική μέθοδος, η πλήρης αντικατάστασή της μοιάζει απίθανη στις ημέρες μας, παρ'όλα αυτά η ΗΗΡ παρουσιάζει όλο και μεγαλύτερο ενδιαφέρον όσον αφορά τη συντήρηση αλλά και την παλαίωση των οίνων (δύναται να επιταχύνει τις διαδικασίες παλαίωσης) (Tao *et al.*, 2012). Η πιο ρεαλιστική προσέγγιση είναι η μείωση των ποσοτήτων για την

προστασία και συντήρηση του οίνου συνδυάζοντας την αντιμικροβιακή δράση της HHP και την αντιοξειδωτική δράση του θειώδους.

Δεν θα μπορούσαμε να παραβλέψουμε όμως το γεγονός ότι, η εγκατάσταση ενός μηχανήματος υψηλής υδροστατικής πίεσης, σε ένα οινοποιείο, θα φέρει ένα πρόσθετο κόστος στα έξοδα του, το οποίο θα επηρεάσει και την τελική τιμή του οίνου και θα ήταν αποτρεπτικό για αρκετούς οινοπαραγωγούς.

ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ - ΠΡΟΤΑΣΗ

Αξίζει να επισημανθεί ότι κάποιοι συνδυασμοί πίεσης και χρόνου, δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά στις περισσότερες από τις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν. Ωστόσο, για να καταλήξουμε σε ασφαλέστερα συμπεράσματα σχετικά με το επίπεδο μείωσης της συγκέντρωσης του SO₂ με τη βοήθεια της HHP, αλλά και ποιος θα ήταν ο ιδανικός συνδυασμός πίεσης και χρόνου, απαιτείται περισσότερη μελέτη σε εκτενέστερο χρονικό διάστημα, τόσο στο φυσικοχημικό και μικροβιακό, όσο και στο οργανοληπτικό προφίλ του οίνου.

Αναφορικά με μελλοντικές εργασίες, ένα πλαίσιο στο οποίο υπάρχουν προοπτικές μελέτης εύρεσης νέων συντηρητικών και καινοτόμων τεχνολογιών για την μείωση των χρησιμοποιούμενων συγκεντρώσεων SO₂ στους οίνους, είναι ο προσδιορισμός της επίδρασης στο μικροβιακό, οργανοληπτικό και φυσικοχημικό προφίλ (συμπεριλαμβανομένου και της αρωματικής σύστασης) ερυθρών και λευκών οίνων, μετά από εφαρμογή HHP σε διάφορα στάδια της οινοποίησης (πριν και μετά την αλκοολική ζύμωση, μετά τη μηλογαλακτική ζύμωση, μετά την παλαίωση τους σε δρύινα βαρέλια ή/και κατά την παραμονή τους σε φιάλες). Επίσης, πολύ ενδιαφέρουσα είναι η αναζήτηση τρόπων αύξησης του δυναμικού παλαίωσης 'πιεσμένων' οίνων, δεδομένης της επιταχυνόμενης παλαίωσης τους που επέρχεται μετά την εφαρμογή HHP.

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

1. Κωδικοποίηση των δειγμάτων
2. Διαλύματα που χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία της καμπύλης κατεχίνης.
3. Gradient για τον προσδιορισμό των ανθοκυανών με HPLC
4. Μέθοδος προσδιορισμού μέσου βαθμού πολυμερισμού με HPLC
5. Κλασικές αναλύσεις στον οίνο βάσης στην 1^η δειγματοληψία (μήνας 0)
6. Κλασικές αναλύσεις στα δείγματα στην 2^η δειγματοληψία (3 μήνες)
7. Κλασικές αναλύσεις στα δείγματα στην 3^η δειγματοληψία (6 μήνες)
8. Οι ανθοκυάνες των οίνων στην πρώτη δειγματοληψία (χρόνος 0). Όπου: Dlp, 3-O-μονογλυκοζίτης της δελφινιδίνης, Pt, 3-O-μονογλυκοζίτης της πετουινιδίνης, Pn, 3-O-μονογλυκοζίτης της παιονιδίνης; Mlv, 3-O-μονογλυκοζίτης της μαλβιδίνης, Mlv-ac, οξικός εστέρας του 3-O-μονογλυκοζίτη της μαλβιδίνης, Mlv-coum, κουμαρικός εστέρας του 3-O-μονογλυκοζίτης της μαλβιδίνης.

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

1. Εξέλιξη της πτητικής οξύτητας το διάστημα τριών έως έξι μηνών.
2. Ελεύθερος SO₂ εκφρασμένος σε mg ανά L οίνου των οίνων με διαφορετικούς συνδυασμούς χρόνου και πίεσης στους τρεις μήνες. Οι μπάρες δείχνουν 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).
3. Ελεύθερος SO₂ εκφρασμένος σε mg ανά L οίνου των οίνων με διαφορετικές πιέσεις και χρόνους πίεσης, στους έξι μήνες. Οι μπάρες δείχνουν 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).
4. 4α) Εξέλιξη του ελεύθερου SO₂ στους οίνους μέσα στο διάστημα των έξι μηνών.
4β) Εξέλιξη του ελεύθερου SO₂ στους οίνους σε διάστημα έξι μηνών, βάσει πίεσης.
5. Ολικός SO₂ εκφρασμένος σε mg ανά L οίνου των οίνων με διαφορετικές πιέσεις και χρόνους πίεσης, στους τρεις μήνες. Οι μπάρες δείχνουν το ± τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών.

Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στα δείγματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).

6. Ολικός SO_2 εκφρασμένος σε mg ανά L οίνου των οίνων με διαφορετικές πιέσεις και χρόνους πίεσης στους έξι 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, $p < 0.05$).
7. 7α) Εξέλιξη του ολικού SO_2 στους οίνους σε διάστημα έξι μηνών.
7β) Εξέλιξη του ολικού SO_2 στους οίνους σε διάστημα έξι μηνών βάσει πίεσης.
8. Εξέλιξη της συγκέντρωσης ακεταλδεϋδης σε mg ανά L οίνου των 'πιεσμένων' οίνων σε χρονικό διάστημα έξι μηνών (Tukey's test, $p < 0.05$).
9. L-μηλικό οξύ εκφρασμένο σε g ανά L οίνου των οίνων με διαφορετικές πιέσεις και χρόνους πίεσης, στους 3 μήνες. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).
10. L-μηλικό οξύ εκφρασμένο σε g ανά L οίνου των οίνων με διαφορετικό συνδυασμό πίεσης και χρόνου στους 6 μήνες. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).
11. 11α) Εξέλιξη του L-μηλικού οξέος στο διάστημα έξι μηνών.
11β) Εξέλιξη του L-μηλικού οξέος σε διάστημα έξι μηνών βάσει πίεσης.
12. L-γαλακτικό οξύ εκφρασμένο σε g ανά L οίνου των οίνων με διαφορετικές πιέσεις και χρόνους πίεσης, στους 3 μήνες. Οι μπάρες δείχνουν το \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (Tukey's test, $p < 0.05$).
13. L-γαλακτικό οξύ εκφρασμένο σε g ανά L οίνου των οίνων με διαφορετικούς συνδυασμούς πίεσης και χρόνου πίεσης, 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, $p < 0.05$).
14. 14α) Εξέλιξη του L-γαλακτικού οξέος στο διάστημα των έξι μηνών.
14β) Εξέλιξη του L-γαλακτικού οξέος σε διάστημα έξι μηνών, βάσει πίεσης.
15. Δείκτης Φαινολικών Ουσιών οίνων με διαφορετικές πιέσεις στους τρεις 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, $p < 0.05$).

16. Δείκτης Φαινολικών Ουσιών οίνων με διαφορετικές πιέσεις στους τρεις 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, $p < 0.05$).
17. 17α) Εξέλιξη του Δείκτη Φαινολικών Ουσιών μεταξύ σε διάστημα έξι μηνών.
17β) Εξέλιξη του Δείκτη Φαινολικών Ουσιών των δειγμάτων σε διάστημα έξι μηνών, βάσει πίεσης.
18. Ολικά φαινολικά (μέθοδος Folin-Ciocalteu) οίνων με διαφορετικές πιέσεις στους τρεις 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, $p < 0.05$).
19. Ολικά φαινολικά (μέθοδος Folin-Ciocalteu) οίνων με διαφορετικούς συνδυασμούς πίεσης και χρόνου πίεσης στους έξι 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, $p < 0.05$).
20. Εξέλιξη των ολικών φαινολικών με την μέθοδο Folin-Ciocalteu.
21. Αντιοξειδωτική ικανότητα εκφρασμένη σε mM Trolox ανά L οίνου, των 'πιεσμένων' οίνων με διαφορετικές πιέσεις και χρόνους πίεσης, μετά από τρεις 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, $p < 0.05$).
22. Αντιοξειδωτική ικανότητα εκφρασμένη σε mM Trolox ανά L οίνου, των 'πιεσμένων' οίνων με διαφορετικές πιέσεις και χρόνους πίεσης, μετά από έξι 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, $p < 0.05$).
23. 23α) Η πορεία της αντιοξειδωτικής ικανότητας, εκφρασμένη σε mM Trolox ανά L οίνου του 'πιεσμένου' οίνου στο διάστημα των έξι μηνών.
23β) Η πορεία της αντιοξειδωτικής ικανότητας, εκφρασμένη σε mM Trolox ανά L οίνου των 'πιεσμένων' δειγμάτων οίνου βάσει πίεσης, στο διάστημα των έξι μηνών.
24. Ένταση χρώματος οίνων με διαφορετικές συγκεντρώσεις πιέσεις μετά από τρεις 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, $p < 0.05$).
25. Ένταση χρώματος των οίνων με διαφορετικές πιέσεις μετά από έξι 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, $p < 0.05$).

26. 16α) Εξέλιξη της έντασης του χρώματος οίνων σε διάστημα έξι μηνών.
16β) Εξέλιξη της έντασης του χρώματος σε διάστημα έξι μηνών, βάσει πίεσης
27. Απόχρωση των οίνων με διαφορετικές πιέσεις στους τρεις 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, $p < 0.05$).
28. Απόχρωση των οίνων με διαφορετικούς συνδυασμούς πίεσης και χρόνου 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, $p < 0.05$).
29. 19α) Εξέλιξη της απόχρωσης των οίνων σε διάστημα έξι μηνών.
19β) Εξέλιξη της απόχρωσης των οίνων σε διάστημα έξι μηνών βάσει πίεσης.
30. 30α) Ανθοκυάνες με HPLC εκφρασμένες σε ισοδύναμα μαλβιδίνης των οίνων με διαφορετικές πιέσεις. Όπου στο υπόμνημα: D1p, 3-O-μονογλυκοζίτης της δελφινιδίνης, Pt, 3-O-μονογλυκοζίτης της πετουινιδίνης, Pn, 3-O-μονογλυκοζίτης της παιονιδίνης; M1v, 3-O-μονογλυκοζίτης της μαλβιδίνης, M1v-ac, οξικός εστέρας του 3-O-μονογλυκοζίτη της μαλβιδίνης, M1v-coum, κουμαρικός εστέρας του 3-O-μονογλυκοζίτης της μαλβιδίνης.
30β) Ανθοκυάνες με HPLC εκφρασμένες σε ισοδύναμα μαλβιδίνης των οίνων βάσει των διαφορετικών πιέσεων.
31. 31α) Ανθοκυάνες με HPLC εκφρασμένες σε ισοδύναμα μαλβιδίνης των οίνων με διαφορετικές πιέσεις. Όπου στο υπόμνημα: D1p, 3-O-μονογλυκοζίτης της δελφινιδίνης, Pt, 3-O-μονογλυκοζίτης της πετουινιδίνης, Pn, 3-O-μονογλυκοζίτης της παιονιδίνης; M1v, 3-O-μονογλυκοζίτης της μαλβιδίνης, M1v-ac, οξικός εστέρας του 3-O-μονογλυκοζίτη της μαλβιδίνης, M1v-coum, κουμαρικός εστέρας του 3-O-μονογλυκοζίτης της μαλβιδίνης.
31β) Ανθοκυάνες με HPLC εκφρασμένες σε ισοδύναμα μαλβιδίνης των οίνων βάσει των διαφορετικών πιέσεων, στους έξι μήνες αποθήκευσης.
32. 32α) Εξέλιξη μαλβιδίνης στους έξι μήνες αποθήκευσης του οίνου.
32β) Εξέλιξη μαλβιδίνης στους έξι μήνες αποθήκευσης βάσει πίεσης.
33. Ολικές τανίνες στα δείγματα οίνου μετά από τρεις μήνες παλαίωσης. 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, $p < 0.05$).
34. Ολικές τανίνες στα δείγματα οίνου (πιεσμένα και απίεστα) μετά από έξι μήνες παλαίωσης. 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, $p < 0.05$).

35. 35α) Εξέλιξη των ολικών ταννινών σε διάστημα έξι μηνών.
35β) Εξέλιξη των ολικών ταννινών σε διάστημα έξι μηνών, βάσει πίεσης.
36. Συγκέντρωση ταννινών (μέθοδος Harbertson), εκφρασμένη σε mg κατεχίνης ανά λίτρο οίνου, των 'πιεσμένων' οίνων με διαφορετικές πιέσεις και χρόνους πίεσης, μετά από τρεις 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, $p < 0.05$).
37. Συγκέντρωση ταννινών (μέθοδος Harbertson), εκφρασμένη σε mg κατεχίνης ανά λίτρο οίνου, των 'πιεσμένων' οίνων με διαφορετικές πιέσεις και χρόνους πίεσης, μετά από έξι 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, $p < 0.05$).
38. 38α) Εξέλιξη της συγκέντρωσης των ταννινών με τη μέθοδο Harbertson σε διάστημα έξι μηνών.
38β) Εξέλιξη της συγκέντρωσης των ταννινών βάσει πίεσης, με τη μέθοδο Harbertson, σε διάστημα έξι μηνών.
39. Μέσος βαθμός πολυμερισμού (mDP) των προανθοκυανιδινών στους οίνους με τις διαφορετικές πιέσεις μετά από την πάροδο τριών 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, $p < 0.05$).
40. Μέσος βαθμός πολυμερισμού (mDP) των προανθοκυανιδινών στους οίνους με τις διαφορετικές πιέσεις μετά από την πάροδο έξι 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, $p < 0.05$).
41. 41α) Ποσοστό εστεροποίησης (%G) των ταννινών στους οίνους των διαφορετικών πιέσεων στο διάστημα των έξι μηνών.
41β) Ποσοστό εστεροποίησης (%G) των ταννινών στον οίνο, βάσει πίεσης που εφαρμόστηκε στα δείγματα, στο διάστημα των έξι μηνών.
42. 42α) Ποσοστό προδελφινιδινών (%P) στους 'πιεσμένους' οίνους των διαφορετικών χρόνων πίεσης και διαφορετικών πιέσεων στο διάστημα των έξι μηνών.
42β) Ποσοστό προδελφινιδινών (%P) στους 'πιεσμένους' οίνους βάσει των διαφορετικών πιέσεων στο διάστημα των έξι μηνών.
43. Αποτελέσματα οργανοληπτικού ελέγχου των οίνων στους έξι μήνες.

BIBΛIOΓPAΦIA

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

Antoce O.A., 2007. *Oenology. Chemistry and sensory analysis.* Universitaria Publishing House, Craiova.

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).

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.

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.*

BağderElmaci, S., Elmacı SB, Gülgör G, Tokatlı M, Erten H, İşci A, Özçelik F., 2015. Effectiveness of chitosan against wine-related microorganisms. *Antonie Van Leeuwenhoek* 107, 675_686.

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

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.

Bartowsky EJ (2009) Bacterial spoilage of wine and approaches to minimize it. *Lett Appl Microbiol* 48(2):149–156

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.

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

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

Bertrand A. and Guillou I. (1999) *Bull. OIV*, 72, 84.

- 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.
- 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
- Brand-Williams, W Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity, 30, 25–30.
- 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.
- Buzrul, S. (2012). High hydrostatic pressure treatment of beer and wine: A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 13, 1–12.
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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

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.

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.

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.

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.

Compendium of international methods of wine and must analysis. International organization of vine and wine. Volume I. Edition 2006. Paris

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.

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

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.

Daeschel M. A., Dong-Sun J. and Watson B. T. (1991), 'Controlling wine malolactic fermentation with nisin and nisin-resistant strains of *Leuconostocoenos*', *Appl Environ. Microbiol* 57(2), 601–603.

Daoudi, L., Quevedo, J. M., Trujillo, A. J., Capdevila, F., Bartra, E., Miñguez, 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.

Daudt, C.E., Ough, C.S., 1980. Action of dimethyldicarbonate on various yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.* 31 (1), 21–23.

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.

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

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.

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.

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.

Dziezak, J.D. (1989) Spices. *Food Technol.*, 43, 102-116

Edinger, W.D., Splittstoesser, D.F., (1986). Sorbate tolerance by lactic acid bacteria associated with grapes and wine. *J. Food. Sci.* 51, 1077_1078.

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.

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

Ferreira EHD, Rosenthal A, Calado V, Saraiva J, Mendo S (2009) Byssochlamysnivea inactivation in pineapple juice and nectar using high pressure cycles. *J Food Eng* 95(4):664–669

Flanzy M. and Poux C., (1958), *Annals of Agricultural Sciences*, 1958:7, 377

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

Fugelsang K., Edwards C., (2007)., *Wine Microbiology, Practical Applications and Procedures*, Second edition.

Fugelsang, K., Edwards, C., 2007. *Wine Microbiology*. Springer Verlag, Berlin, Germany.

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

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

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

- 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.
- 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.
- 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.
- Gerbaux V., Villa A., Monamy C. and Bertrand A. (1997) *Am. J. Enol. Vitic.*, 48 (1), 49.
- Gerland C., Gerbaux V. and Villa A. (1999) *Revue des Oenologues*, 93S, 44.
- 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
- Glories, Y. (1984). La couleur des vins rouges. Mesure, origine et interprétation. Partie I. *Connaiss. Vigne Vin*, 18, 195–217.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Harris V, Jiranek V, Ford CM, Grbin PR (2010) Inhibitory effect of hydroxycinnamic acids on *Dekkera* spp. *Appl Microbiol Biotechnol* 86(2):721–729
- 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

- 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.
- 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
- 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.
- 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
- Kourakou–Dragona S., 1998, Θέματα Οινολογίας
- Koutchma T (2009) Advances in ultraviolet light technology for non-thermal processing of liquid foods. *Food Bioprocess Technol* 2(2):138–155
- Koutchma T., 2014, Adapting High Hydrostatic Pressure (HPP) for Food Processing Operations.,Chapter 6 : Emerged HPP Commercial Applications
- 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
- 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.
- Li, H., Guo, A., & Wang, H. (2008). Mechanisms of oxidative browning of wine. *Food Chemistry*, 108(1), 1–13.
- 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.
- 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.
- 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.

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

Maarse, H., (1991). *Volatile Compounds in Foods and Beverages*. Marcel Dekker Inc, New York, NY.

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.

Manuel Malfeito-Ferreira, (2019), *Red Wine Technology*, Chapter 15. Spoilage Yeasts in Red Wines Pages 219-235

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

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.

Masuzawa N, Ohdaira E, Ide M (2000) Effects of ultrasonic irradiation on phenolic compounds in wine. *Jpn J Appl Phys* 39 (5B):2978–2979

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.

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.

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.

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.

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.

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.

Moreno, F. J., Molina, E., Olano, A., & López-Fandinó, R. (2003). High-pressure effects on Maillard reaction between glucose and lysine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(2), 394–400.

- Ni, Y., and L.-R. Zhong. (2003). The application of Lysozyme in icewine processing. *Food Res. Dev.*, 24:162–163.
- 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.
- OIV, O. (2009). *Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis*. Edition.
- Oliveira, C. M., Ferreira, A. C. S., De Freitas, V., & Silva, A. M. S. (2011). Oxidation mechanisms occurring in wines. *Food Research International*, 44(5), 1115–1126.
- Ough, C.S., (1975). Dimethyldicarbonate as wine sterilant. *Am. J. Enol. Vitic.* 26 (3), 130–133.
- 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
- 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.
- 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.
- 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 trimestrield'informationprofessionnelle* 32:24–28.
- Pilatte, E., M. Nygaard, Y. Cai Gao, S. Krentz, J. Power, and G. Lagarde. (2000). Etude de l'effet du lysozyme sur différentessouchesd'Oenococcusoeni. Applications dans la gestion de la fermentation malolactique. *Rev. Fr. Oenol.*, 185:26–29.
- Piyasena, P., Mohareb, E., & McKellar, R. C. (2003). Inactivation of microbes using ultrasound: A review. *International Journal of Food Microbiology*, 87(3), 207–216.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

- 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.
- 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
- Raposo R., Chinnici F., Ruiz-Moreno M. J., Puertas B., Francisco J. Cuevas F., Carbú M., Guerrero R., Ortíz-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.
- 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.
- 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.
- Rastogi NK, Raghavarao K, Balasubramaniam VM, Niranjana K, Knorr D (2007) Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. *Crit Rev Food Sci Nutr* 47(1):69–112.
- Renouf, V., Strehaiano, P., Lonvaud-Funel, A., (2008). Effectiveness of dimethyldicarbonate to prevent *Brettanomyces bruxellensis* growth in wine. *Food Control* 19, 208_216.
- Ribéreau-Gayon P. and Stonestreet E. (1965) *Bull. Soc.Chim.*, 9, 2649.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

- 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
- 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*
- Santos, M. C., Nunes, C., Cappelle, J., Goncalves, 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Smelt J (1998) Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Trends Food Sci Technol* 9(4):152–158
- 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.
- 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.
- 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.

Stavarakaki M., Biniari K. (2017). Ampelographic and Genetic Characterization of Grapevine Varieties (*Vitis vinifera* L.) of the 'Mavroudia' Group Cultivated in Greece. *Not Bot HortiAgrobo*, 45(2):525-531

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

Thomas LV, Delves-Broughton J , 2014 ,Encyclopedia of Food Microbiology, Volume 3, Elsevier

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.

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.

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

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.

Tsukamoto, I., Yim, B., Stavarache, C. E., Furuta, M., Hashiba, K., & Maeda, Y. (2004). Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* by ultrasonic irradiation. *Ultrasonics Sonochemistry*, 11(2), 61–65.

Vally, H., Misso, N. L. A., & Madan, V. (2009). Clinical effects of sulphite additives. *Clinical and Experimental Allergy*, 39(11), 1643–1651.

Vaquero MJR, Alberto MR, de Nadra MCM (2007) Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control* 18(2):93–101

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.

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.

Wollmann, N., & Hofmann, T. (2013). Compositional and sensory characterization of red wine polymers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(9), 2045–2061.

Wuytack EY, Diels AMJ, Michiels CW (2002) Bacterial inactivation by high-pressure homogenisation and high hydrostatic pressure. *IntJFoodMicrobiol* 77(3):205–212

Κουράκου – Δραγώνα, Σ.,(1998), Θέματα Οινολογίας, Επιστήμη και Τεχνολογία στον τομέα της οινοποιητικής τεχνικής, Εκδόσεις Τροχαλία, Αθήνα

Σταύρακας Δ. Ε., 2010, Αμπελογραφία, Εκδόσεις ΖΗΤΗ

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

