



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS

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

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ I) ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΑ II) ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Επιτάχυνση της οξείδωσης των λευκών οίνων μετά από προσθήκη Fe(II) και H₂O₂
και μελέτη της μεταβολής των πολυφαινολικών τους ενώσεων

Ευτυχία Ε. Βλάχου

Επιβλέπουσα καθηγήτρια:

Καλλίθρακα Σταματίνα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ, 2022

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΙΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΛΚΟΟΛΟΥΧΩΝ ΠΟΤΩΝ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Επιτάχυνση της οξείδωσης των λευκών οίνων μετά από προσθήκη Fe(II) και H₂O₂
και μελέτη της μεταβολής των πολυφαινολικών τους ενώσεων

“Accelerated oxidation in white wines with addition of Fe(II) and H₂O₂
and survey on the changing of their polyphenolic compounds”

Ευτυχία Ε. Βλάχου

Εξεταστική Επιτροπή:

Καλλίθρακα Σταματίνα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΓΠΑ (επιβλέπουσα)

Ρούσσης Ιωάννης, Καθηγητής Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Παπάς Χρήστος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Επιτάχυνση της οξείδωσης των λευκών οίνων μετά από προσθήκη Fe(II) και H₂O₂ και μελέτη της μεταβολής των πολυφαινολικών τους ενώσεων

*ΠΜΣ Σύγχρονη Τεχνολογία Τροφίμων I) Γαλακτοκομία II) Οινολογία
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου
Εργαστήριο Οινολογίας και Αλκοολούχων Ποτών*

Περίληψη

Η ανάπτυξη του οξειδωτικού καφετιάσματος στους λευκούς οίνους συνδέεται με υποβάθμιση της ποιότητάς τους, λόγω αλλοίωσης των οργανοληπτικών τους χαρακτηριστικών, αλλά και με την πτώση της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας. Στην παρούσα μελέτη η πορεία του ρυθμού οξείδωσης και η ανάπτυξη του οξειδωτικού καφετιάσματος (browning) παρακολουθήθηκε σε λευκό οίνο ποικιλίας Ασύρτικο μετά από την προσθήκη δισθενούς σιδήρου (Fe²⁺) και υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂), σε δυο διαφορετικές συγκεντρώσεις, για το διάστημα των 12 ημερών σε κάθε ένα πείραμα ταχείας οξείδωσης στις θερμοκρασίες των 35 και 50 °C. Επίσης στο κρασί πραγματοποιήθηκε και η προσθήκη σεληνίου (Se) σε δυο διαφορετικές συγκεντρώσεις, αλλά και σε συνδυασμό με το σίδηρο και το υπεροξείδιο του υδρογόνου, προκειμένου να μελετηθεί η ενδεχόμενη αντιοξειδωτική προστασία που θα προσέφερε στο λευκό οίνο.

Για την αξιολόγηση του ρυθμού οξείδωσης πραγματοποιήθηκε η μέτρηση της απορρόφησης στα 420 nm κάθε 24 ώρες και για το διάστημα των 12 ημερών σε κάθε ένα πείραμα ταχείας αμαύρωσης στους 35 και 50 °C. Επιπλέον για την εκτίμηση του βαθμού οξείδωσης υπολογίστηκε και ο συντελεστής του ρυθμού μεταβολής του χρώματος k, αλλά και η επί τις εκατό μεταβολή της απορρόφησης στα 420 nm (%ΔA₄₂₀). Παράλληλα, για κάθε ένα πείραμα επιταχυνόμενης οξείδωσης, υπολογίστηκαν και αξιολογήθηκαν και οι μεταβολές των συγκεντρώσεων των ολικών φαινολικών συστατικών, των φλαβονολών, των υδροξυκινναμωμικών οξέων, των ολικών ελεύθερων σουλφρυδυλομάδων, των ποσοτήτων του ολικού και ελεύθερου διοξειδίου του θείου και της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Στο τέλος κάθε πειράματος οξείδωσης πραγματοποιήθηκε ο ποσοτικός προσδιορισμός των φαινολικών ουσιών του λευκού οίνου με τη χρήση της HPLC (Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης). Από τις φλαβανόλες, η (+)-κατεχίνη ήταν αυτή που βρέθηκε στις υψηλότερες συγκεντρώσεις στο κρασί, ενώ από τα υδροξυκινναμωμικά οξέα, το καφταρικό οξύ ήταν αυτό που βρέθηκε στις μεγαλύτερες ποσότητες.

Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων ταχείας αμαύρωσης διαπιστώθηκε ότι η αύξηση της θερμοκρασίας στους 50 °C και οι προσθήκες του Fe²⁺ και H₂O₂, στις μέγιστες συγκεντρώσεις τους, εντείνουν την επιτάχυνση του φαινομένου της οξείδωσης και συνεπώς την αμαύρωση του οίνου. Ταυτόχρονα αποδείχθηκε ότι η ανάπτυξη του καφετιάσματος σχετίζεται με τη μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας.

Επιστημονική περιοχή: Οξείδωση λευκών οίνων

Λέξεις κλειδιά: πείραμα επιταχυνόμενης αμαύρωσης, ρυθμός αμαύρωσης, φαινολικές ενώσεις

Accelerated oxidation in white wines with addition of Fe(II) and H₂O₂ and survey on the changing of their polyphenolic compounds

*MSc Advanced Food Technology I) Dairy Science II) Enology
Department of Food science and Human Nutrition
Laboratory of Enology and Alcoholic drinks*

Abstract

The development of oxidative browning in white wines has been associated with degradation of their quality, due to alteration of their organoleptic characteristics, but also with the reduction of their antioxidant capacity. In the present study, the oxidation rate and the development of oxidative browning were observed in Assyrtiko white wine after the addition of ferrous iron (Fe²⁺) and hydrogen peroxide (H₂O₂), in two different concentrations, for the period of 12 days in each accelerated browning test at temperatures of 35 and 50 °C. Also in the wine, the addition of selenium (Se) was performed within two different concentrations, and in combinations with iron and hydrogen peroxide, in order to study the possible antioxidant protection that would offer to the white wine.

The evaluation of the browning rate was performed by measuring the absorbance at 420 nm every 24 hours for the period of 12 days, in each accelerated oxidation test at 35 and 50 °C. Additionally, to assess the degree of oxidation, the rate of change of the color *k* was calculated, as well as the percentage change in absorbance at 420 nm (%DA₄₂₀). At the same time, in each accelerated browning test, changes in the concentrations of total phenolic components, flavanols, hydroxycinnamic acids, total free sulfhydryl groups, the amounts of total and free sulfur dioxide and the antioxidant capacity, were calculated and evaluated. At the end of each accelerated browning test, the quantification of phenolic compounds in the white wine was carried out by HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Between the flavanols, (+)-catechin was found in the highest concentration in wine, while caftaric acid concentrations was the highest between the hydroxycinnamic acids amounts.

The results from the accelerated browning test showed that when the temperature is increased to 50 °C and the addition of Fe²⁺ and H₂O₂ to the maximum concentrations, intensify the acceleration of the oxidation phenomenon and as a result the wine browning. At the same time it turned out that the browning rate is associated with a decrease in antioxidant capacity.

Scientific area: Oxidation in white wines

Keywords: accelerated browning experiment, browning rate, phenolic compounds

Ευχαριστίες

Με την παρούσα μεταπτυχιακή ερευνητική μελέτη ολοκληρώνεται ο κύκλος των μεταπτυχιακών μου σπουδών στο Εργαστήριο Οινολογίας και Αλκοολούχων Ποτών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς όλους όσους συνέβαλαν στην διεκπεραίωσή της.

Κατ'αρχάς θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Καλλίθρακα Σταματίνα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γ. Π. Α., για την ανάθεση του θέματος της μεταπτυχιακής μου μελέτης. Επίσης επιθυμώ να την ευχαριστήσω για τον χρόνο που μου αφιέρωσε, καθώς και για τις πολύτιμες γνώσεις και υποδείξεις που μου μετέδωσε τόσο κατά την εκπόνηση της παρούσας ερευνητικής μελέτης, όσο και κατά τη διάρκεια της φοίτησής μου στο Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών της Οινολογίας.

Παράλληλα ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στον κύριο Ρούσση Ιωάννη, Καθηγητή Χημείας – Βιοχημείας Τροφίμων και Οίνου του Εργαστηρίου Χημείας Τροφίμων του Παν/μίου Ιωαννίνων, τόσο για τη σημαντική συμβολή του και τη συνεργασία προκειμένου να επιτευχθεί η παρούσα ερευνητική μελέτη, όσο και για τις πολύτιμες επιστημονικές του συμβουλές που αφορούσαν την πειραματική διαδικασία αλλά και τις προσθήκες του δισθενούς μετάλλου σιδήρου και υπεροξειδίου του υδρογόνου. Ταυτόχρονα θα ήθελα να τον ευχαριστήσω που δέχτηκε να αξιολογήσει την παρούσα μεταπτυχιακή εργασία.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω και τον κύριο Παππά Χρήστο, Αναπληρωτή Καθηγητή του Εργαστηρίου Γενικής Χημείας του Γ.Π.Α., που δέχτηκε να αξιολογήσει την παρούσα μελέτη.

Επιπλέον επιθυμώ να ευχαριστήσω την κυρία Χριστοφή Στεφανία, Υποψήφια Διδάκτωρ του Εργαστηρίου Οινολογίας και Αλκοολούχων Ποτών του Γ. Π. Α., για τον χρόνο και την πολύτιμη βοήθεια της προκειμένου να υλοποιηθεί η παρούσα εργασία. Συγχρόνως δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω για τη βοήθειά της και την κυρία Προξενιά Νίκη, μέλος ΕΔΙΠ του Εργαστηρίου Οινολογίας και Αλκοολούχων Ποτών του Γ. Π. Α.

Τέλος, ευχαριστώ βαθύτατα τη μητέρα και τον πατέρα μου για τη στήριξη και τη σημαντική τους βοήθεια προκειμένου να υλοποιήσω τις μεταπτυχιακές μου σπουδές.

Με την άδειά μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ΓΠΑ και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΜΕΛΕΤΗΣ

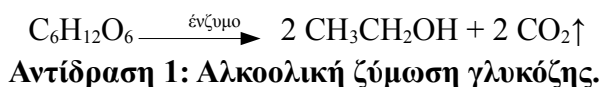
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ.....	8
1. Ο οίνος και η χημική του σύσταση.....	8
1.1 Το νερό που περιέχεται στον οίνο.....	9
1.2 Τα σάκχαρα.....	9
1.3 Οι Αλκοόλες.....	10
1.4 Τα Οργανικά Οξέα.....	12
1.5 Αζωτούχες ενώσεις.....	15
1.6 Πτητικές ενώσεις των οίνων.....	18
1.6.1 Πρωτογενές άρωμα των οίνων.....	18
1.6.2 Δευτερογενές άρωμα των οίνων.....	20
1.6.3 Τριτογενές άρωμα των οίνων.....	20
1.7 Φαινολικά συστατικά των οίνων.....	21
1.7.1 Φλαβονοειδή φαινολικά συστατικά.....	22
1.7.1.1 Φλαβονόλες.....	22
1.7.1.2 Φλαβανόνες.....	23
1.7.1.3 Φλαβανόλες.....	23
1.7.1.4 Ταννίνες.....	24
1.7.1.5 Ανθοκυανιδίνες και ανθοκυάνες.....	26
1.7.2 Μη φλαβονοειδή φαινολικά συστατικά.....	27
1.7.2.1 Φαινολικά οξέα.....	27
1.7.2.2 Στυλβένια.....	28
2. Η οξείδωση των οίνων.....	29
2.1 Η αντίδραση οξείδωσης Fenton.....	30
2.2 Ενζυμική οξείδωση.....	31
2.3 Χημική οξείδωση.....	32
2.4 Αλληλεπίδραση φαινολικών συστατικών του οίνου με το οξυγόνο.....	33
2.5 Ο ρόλος των μετάλλων σιδήρου (Fe) στην οξείδωση των οίνων.....	34
2.6 Η χημική οξείδωση των φαινολικών συστατικών και τα παραγόμενα προϊόντα της.....	34
2.7 Η οξείδωση στους λευκούς οίνους.....	36
2.8 Οι επιπτώσεις της οξείδωσης στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των λευκών οίνων.....	38
2.8.1 Επίδραση στο χρώμα.....	38
2.8.2 Επίδραση στο άρωμα.....	38
2.9 Αντιοξειδωτική δράση φαινολικών συστατικών.....	40
2.10 Αντιοξειδωτικοί παράγοντες των οίνων.....	41
2.10.1 Θειώδης ανυδρίτης.....	41
2.10.2 Ασκορβικό οξύ.....	43
2.10.3 Γλουταθειόνη.....	45
2.10.4 Σελήνιο.....	47
2.11 Αντιμετώπιση της οξείδωσης των οίνων.....	48
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	49
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	50
A. Υλικά.....	50
1. Δείγμα οίνου.....	50
2. Αντιδραστήρια.....	50
3. Όργανα.....	50
3.1 Φασματοφωτόμετρο.....	50
3.2 Αυτόματος τιτλοδότης.....	50
3.3 Σύστημα Ύγρης Χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC).....	51

B. Πειραματική πορεία.....	51
1. Δείγματα προς ανάλυση.....	51
2. Θερμοκρασίες εφαρμογής του πειράματος της οξείδωσης.....	51
3. Προετοιμασία των δειγμάτων.....	51
4. Δειγματοληψίες.....	53
Γ. Μέθοδοι Ανάλυσης.....	53
1. Απορρόφηση στα 420 nm και δείκτης καστανώσης.....	53
2. Θειώδης ανυδρίτης.....	54
2.1 Ολικός θειώδης ανυδρίτης.....	54
2.2 Ελεύθερος θειώδης ανυδρίτης.....	54
3. Ολικά φαινολικά συστατικά.....	55
4. Φλαβανόλες.....	55
5. Υδροξυκινναμωμικά οξέα.....	56
6. Αντιοξειδωτική ικανότητα.....	57
7. Ολικές ελεύθερες σουλφρυδυλομάδες (SH).....	58
8. Προσδιορισμός των επιπέδων των φαινολικών ενώσεων με τη χρήση HPLC.....	59
9. Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.....	60
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	61
1. Απορρόφηση στα 420 nm.....	61
2. Θειώδης ανυδρίτης.....	71
2.1 Ολικός θειώδης ανυδρίτης.....	71
2.2 Ελεύθερος θειώδης ανυδρίτης.....	76
3. Ολικά φαινολικά συστατικά.....	81
4. Φλαβανόλες.....	87
5. Υδροξυκινναμωμικά οξέα.....	93
6. Αντιοξειδωτική Ικανότητα.....	99
7. Ολικές ελεύθερες σουλφρυδυλομάδες (SH).....	105
8. Αποτελέσματα επιπέδων φαινολικών ενώσεων με τη χρήση HPLC.....	110
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	122
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....	125

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

1. Ο οίνος και η χημική του σύσταση

Από αρχαιοτάτων χρόνων έως και σήμερα, ο οίνος αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι του ελληνικού πολιτισμού. Είναι το προϊόν που παράγεται αποκλειστικά με πλήρη ή μερική αλκοολική ζύμωση νωπών σταφυλιών ή γλεύκους σταφυλιών (E. E., 2008). Η αλκοολική ζύμωση του γλεύκους για την παραγωγή του κρασιού, μπορεί να είναι είτε φυσική (αυθόρμητη ζύμωση) είτε ελεγχόμενη με την προσθήκη μιας καλλιέργειας εκκίνησης (Γιαβάσης, 2019). Με την εφαρμογή της ελεγχόμενης ζύμωσης επιτυγχάνεται ο καλύτερος έλεγχος της αλκοολικής ζύμωσης αλλά και η καλύτερη τυποποίηση των οίνων που θα παραχθούν. Ως καλλιέργεια εκκίνησης χρησιμοποιούνται οι ζυμομύκητες του γένους *Saccharomyces*, κυρίως τα είδη *Saccharomyces cerevisiae* και *Saccharomyces bayanus*. Συνήθως ο εμβολιασμός του γλεύκους γίνεται με την καλλιέργεια του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*, ο οποίος έχει και μεγαλύτερα ποσοστά βιωσιμότητας (Τσέτουρας, 2008). Υπό αναερόβιες συνθήκες οι ζύμες ακολουθούν το μονοπάτι της αλκοολικής ζύμωσης, το οποίο ξεκινά με τη μεταβολική οδό της γλυκόλυσης και καταλήγει στην αλκοολική ζύμωση. Η αλκοολική ζύμωση ολοκληρώνεται όταν οι ζυμομύκητες μεταβολίσουν όλη τη γλυκόζη και φρουκτόζη από το υπόστρωμα τους (Αντίδραση 1).



Η αιθυλική αλκοόλη ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) και το διοξείδιο του άνθρακα (CO_2) που παράγονται είναι τα κύρια προϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης. Ενώ πέρα από αυτά, σε μικρές ποσότητες παράγονται και δευτερογενή προϊόντα, όπως είναι οι ανώτερες αλκοόλες, οι εστέρες, η γλυκερόλη, το ηλεκτρικό οξύ, το διακετύλιο και η ακετοΐνη. Όσον αφορά τη χημική του σύσταση, ο οίνος είναι ένα υδατο-αλκοολικό διάλυμα (Πίνακας 1) μέσα στο οποίο διακρίνονται κυρίως τα εξής συστατικά: (Σουφλερός, 1997)

- Νερό
- Οργανικά συστατικά: αλκοόλες (αιθυλική αλκοόλη, γλυκερόλη), οργανικά οξέα, σάκχαρα, πολυσακχαρίτες, αζωτούχες ενώσεις, φαινολικές ενώσεις, πτητικές ενώσεις του αρώματος, ένζυμα, και βιταμίνες.
- Ανόργανα συστατικά: ανιόντα (Cl^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , F^- , Br^- , I^- , BO_3^{3-} , κ.α.), κατιόντα (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^+ , Cu^{2+} , Al^{3+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , As^{3+} , Pb^{2+} , κ.α.).

Πίνακας 1: Τα βασικά συστατικά του οίνου (Κοντοκόστας, 2010).

Συστατικά	Ποσοστά στο κρασί
Νερό	80-85 %
Αιθυλική αλκοόλη	9-15 %
Λοιπά συστατικά	~ 3 %

1.1 Το νερό που περιέχεται στον οίνο

Το νερό είναι το συστατικό που καταλαμβάνει τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα στη σύσταση του οίνου (Πίνακας 1). Ο προσδιορισμός της υδατοπεριεκτικότητας του κρασιού γίνεται με εξάτμιση στους 100°C και τη μέτρηση του στερεού υπολείμματος (Σουφλερός, 1997).

1.2 Τα σάκχαρα

Τα σάκχαρα, ή αλλιώς υδατάνθρακες (Ribereau-Gayon et al., 1982; Jackson, 1994), είναι μια ομάδα βιολογικών μορίων σημαντικής σημασίας για τους οργανισμούς. Με βάση τη χημική τους δομή μπορεί να είναι πολυ-υδροξυαλδεΐδες (αλδόζες) ή πολυ-υδροξυκετόνες (κετόζες) και αποδίδονται με τον γενικό τύπο $C_nH_{2n}O_n$, όπου n είναι ο αριθμός των ατόμων άνθρακα (Βοργιάς, 2013). Τα σάκχαρα αποτελούν το βασικότερο συστατικό του γλεύκους (12-30 %), συντίθενται μέσω της φωτοσυνθετικής ικανότητας των πράσινων μερών του φυτού (φύλλα, ράγες) και συσσωρεύονται στη ράγα όσο προχωράει η ωρίμανση του καρπού (Αντίδραση 2) (Ribereau-Gayon et al., 2006). Οι κυριότεροι μονοσακχαρίτες που ανιχνεύονται στα γλεύκη είναι η D-γλυκόζη και η D-φρουκτόζη, ενώ σε ελάχιστες ποσότητες βρίσκονται η D-γαλακτόζη, η σακχαρόζη και οι πεντόζες (Σουλής, 1992).



Από τα σάκχαρα προέρχονται πολλές ενώσεις στους οίνους, όπως είναι τα οργανικά οξέα (τρυγικό, μηλικό, κιτρικό οξύ), οι φαινολικές ενώσεις, τα αρωματικά αμινοξέα (όπως η τυροσίνη), οι γλυκοζίτες (ανθοκυάνες, τερπένια) αλλά και διάφορα άλλα προϊόντα όπως είναι το γαλακτικό ή το οξικό οξύ [βλ. Κεφ. 1.4]. Επιπλέον, τα σάκχαρα συγκαταλέγονται στα σημαντικότερα συστατικά του γλεύκους, καθώς με βάση την περιεκτικότητά τους σε αυτό καθορίζεται ο αλκοολικός βαθμός του οίνου που θα παραχθεί μετά το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης (Σουλής, 1992).

Τα σάκχαρα του γλεύκους και του οίνου διαίρονται στα:

Ανάγοντα σάκχαρα

Τα ανάγοντα σάκχαρα διαθέτουν μια ελεύθερη αλδεΐδομάδα ή κετονομάδα και μπορούν να ανάγουν ή να αποχρωματίζουν το φερίγγειο υγρό. Είναι κυρίως εξόζες και πεντόζες και χωρίζονται στα:

- *Ζυμώσιμα σάκχαρα (εξόζες)*: Όπως είναι η D-(+)-γλυκόζη, η D-(-)-φρουκτόζη και η D-(-)-γαλακτόζη, οι οποίες ζυμώνονται από τα κύτταρα των ζυμομυκήτων. Οι οίνοι αναλόγως με την περιεκτικότητά τους σε ανάγοντα σάκχαρα χωρίζονται σε ξηρούς, ημίξηρους, ημίγλυκους και γλυκούς (Πίνακας 2).
- *Μη ζυμώσιμα σάκχαρα (πεντόζες)*: Όπως είναι η D-αραβινόζη, η D-ριβόζη, η D-ξυλόζη και η L-ραμνόζη. Οι πεντόζες δε ζυμώνονται από τους ζυμομύκητες αλλά μπορεί να προσβληθούν από τα

γαλακτικά βακτήρια, έχοντας ως αποτέλεσμα την αύξηση της πτητικής οξύτητας των οίνων (Ρούσσης, 2015).

Πίνακας 2: Η συγκέντρωση των αναγόντων σακχάρων στους οίνους (Πολίτης, 1997).

Οίνος	Συγκέντρωση αναγόντων ζαχάρων (g/L)
Ξηρός	< 2
Ημίξηρος	2 - 18
Ημίγλυκος	18 - 40
Γλυκός	> 40

Μη ανάγοντα σάκχαρα

Είναι μη ζυμώσιμα σάκχαρα και δεν ανάγουν, ή αλλιώς δεν αποχρωματίζουν, το φελλίγγειο υγρό. Τα μη ανάγοντα σάκχαρα στους οίνους προέρχονται από τα σταφύλια και σε αυτά συγκαταλέγονται: η ζαχαρόζη, η σταχυόζη, η ραφινόζη κ.α. (Ρούσσης, 2015).

Πολυσακχαρίστες

Οι πολυσακχαρίτες βρίσκονται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στα γλεύκη από ότι στους οίνους. Στους οίνους κατά την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, αλλά και κατά την οινοποίηση μετέπειτα, μπορεί να καθιζάνουν και να σχηματίζουν ιζήματα, εμποδίζοντας έτσι την διαδικασία της διήθησης και του φιλτραρίσματος στους οίνους (Σουφλερός, 1997). Χωρίζονται σε:

I) Ομοπολυσακχαρίτες ή πηκτίνες: Προέρχονται από τα κυτταρικά τοιχώματα του φλοιού και της σάρκας των σταφυλιών. Έτσι, μετά το σπάσιμο των ραγών υδρολύονται ενζυμικά στο γλεύκος, ενώ δεν περιέχονται σε μεγάλες ποσότητες στους οίνους.

II) Ετεροπολυσακχαρίτες ή κόμμεα (οζάνες): Είναι πολυμερισμένοι ανυδρίτες πεντοζών ή εξοζών. Τα κόμμεα που συναντιόνται συνήθως στους οίνους είναι οι αραβάνες, οι ραμνάνες, οι ξυλάνες, οι γαλακτάνες, οι μαννάνες κ.α.

Επιπλέον, υπάρχουν και οι ποσότητες των πολυσακχαριτών που απελευθερώνεται από την αυτόλυση των κυττάρων των ζυμομυκήτων κατά την αλκοολική ζύμωση, όπως είναι οι μαννοπρωτεΐνες (γλυκοπρωτεΐνες) και οι γλυκομαννοπρωτεΐνες (Σουφλερός, 1997). Είναι ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους και ανιχνεύονται στους οίνους που ωριμάζουν με τις οινολάσπες.

1.3 Οι Αλκοόλες

Οι αλκοόλες που περιέχονται στους οίνους είναι:

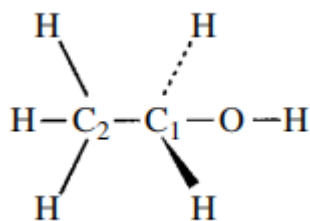
α) Οι απλές μονοαλκοόλες :

Μεθανόλη

Η μεθανόλη (CH_3OH) στους οίνους δεν αποτελεί προϊόν της αλκοολικής ζύμωσης, αλλά η παραγωγή της οφείλεται στην υδρόλυση των μεθύλιο καρβοξυλικών ομάδων της δομής των πηκτινών που βρίσκονται στο γλεύκος (Ribereau-Gayon et al., 2006). Η υδρόλυση πραγματοποιείται μέσω της καταλυτικής δράσης του ενζύμου πηκτινομεθυλεστεράση που βρίσκεται στο φλοιό του σταφυλιού. Σημαντική παρατήρηση είναι ότι με την αύξηση της θερμοκρασίας του γλεύκους, η συγκέντρωση της μεθανόλης μειώνεται διότι το ένζυμο απενεργοποιείται (Gnekow & Ough, 1976). Η μεθανόλη στους οίνους συνήθως βρίσκεται σε μικρές ποσότητες, της τάξης των 30 με 35 mg/L (Ribereau-Gayon et al., 2006). Στην οινοποίηση η χρήση των κατάλληλων στελεχών είναι σημαντική, διότι μπορούν και διατηρήσουν την παραγωγή της σε χαμηλά επίπεδα, μειώνοντας έτσι τις τοξικές επιδράσεις της στην υγεία του ανθρώπινου οργανισμού (Hodson, 2017).

Αιθανόλη

Η αιθανόλη (CH_3CH_2OH) (Εικόνα 1) είναι η πιο σημαντική αλκοόλη καθώς είναι αυτή που ανιχνεύεται στη μεγαλύτερη συγκέντρωση στους οίνους. Εκπροσωπεί το 9 με 15 % του συνολικού όγκου τους και είναι το κυριότερο συστατικό αμέσως μετά το νερό (Ribereau-Gayon et al., 2006; Κοτσερίδης & Προξενιά, 2015). Επιπλέον, όπως έχει προαναφερθεί, η αιθανόλη είναι το κύριο προϊόν της αλκοολικής ζύμωσης και η παραγωγή της πραγματοποιείται από το μεταβολισμό των σακχάρων του γλεύκους (Ribereau-Gayon et al., 2006). Για την έκφραση της αλκοολοπεριεκτικότητας ενός οινικού προϊόντος χρησιμοποιείται ο όρος ‘αλκοολικός βαθμός’ ή ‘αλκοολικός τίτλος κατ’ όγκο’ και συμβολίζεται ως ‘% vol’ (Ribereau-Gayon et al., 2006; Κοτσερίδης & Προξενιά, 2015). Ο αλκοολικός βαθμός έχει σημαντική επίδραση στην ποιότητα, στη συντήρηση, μέσω της αντιμικροβιακής δράσης, αλλά και στην εμπορική αξία του οίνου. Όσον αφορά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά η αλκοόλη μαζί με τα αναγωγικά σάκχαρα και τη γλυκερόλη διαμορφώνουν τη γλυκιά γεύση στους οίνους, ενώ παράλληλα λειτουργεί και ως διαλύτης των αρωματικών τους ενώσεων.



Εικόνα 1: Η δομή της αιθυλικής αλκοόλης (Ribereau-Gayon et al., 2006).

β) Οι ανώτερες μονοαλκοόλες (αμυλικές αλκοόλες) :

Στην πλειονότητα τους αποτελούν δευτερογενή προϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης των ζυμομυκήτων και στο κρασί φτάνουν τα επίπεδα των 150 έως 550 mg/L (Ribereau-Gayon et al., 1982; Jackson, 1994). Πιο συγκεκριμένα, οι κυριότερες αμυλικές αλκοόλες των οίνων είναι: η μεθυλ-2-προπανόλη-1, η μεθυλο-2-βουτανόλη-1 και η μεθυλο-3-βουτανόλη-1. Τόσο οι αλκοόλες

αυτές, όσο και οι εστέρες τους, έχουν σημαντική συνεισφορά στην ανάπτυξη του δευτερογενούς αρώματος των οίνων. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις, λιγότερο από 300 mg/L, συμμετέχουν θετικά στην αρωματική πολυπλοκότητα του κρασιού (Ribereau-Gayon et al., 2006). Παραδείγματος χάρη η ύπαρξη της φαινυλο-2-αιθανόλης έχει συνδεθεί με κάποια ανθικά αρώματα, κυρίως τριαντάφυλλου, ενώ η τυροσόλη με αρώματα μελιού. Ωστόσο, οι ανώτερες μονοαλκοόλες δεν έχουν μόνο θετική συνεισφορά στον αρωματικό χαρακτήρα των οίνων, καθώς αν εμφανιστούν σε υψηλές συγκεντρώσεις απελευθερώνουν κάποιες έντονες και βαριές μυρωδιές που μπορεί να καλύψουν την αρωματική φινέτσα του κρασιού (Ribereau-Gayon et al., 2006). Εξάριση αποτελεί η 1-εξανόλη, μια μονοαλκοόλη που προέρχονται από το σταφύλι. Η παρουσία της στους οίνους έχει συνδεθεί με κάποια χαρακτηριστικά φυτικά - χορτώδη αρώματα που τους προσδίδει, ενώ είναι γνωστή και για την συμμετοχή της στο ποικιλιακό τους άρωμα.

γ) Οι πολυαλκοόλες :

Στην ομάδα των πολυαλκοολών συγκαταλέγεται η γλυκερόλη, η βουτανεδιόλη-2,3, η μαννιτόλη, η σοβιτόλη, η ινοσιτόλη και άλλες (Ribereau-Gayon et al., 2006). Από όλες τις προαναφερόμενες αλκοόλες, η γλυκερόλη είναι αυτή που βρίσκεται στην υψηλότερη συγκέντρωση στο κρασί. Παράλληλα, μετά την αιθυλική αλκοόλη και το νερό, είναι η ένωση όπου εμφανίζεται με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση στους οίνους (Ribereau-Gayon et al., 2006). Είναι ένα πολύ σημαντικό παραπροϊόν της αλκοολικής ζύμωσης των ζυμομυκήτων και η συγκέντρωσή της εξαρτάται από το στέλεχος της ζύμης και από τις συνθήκες της ζύμωσης. Στο κρασί οι συγκεντρώσεις της ανέρχονται στα 5 g/L, αλλά οι τιμές της μπορεί να φτάσουν και τα 15 έως 20 g/L, αναλόγως των συνθηκών που πραγματοποιείται η ζύμωση (Ribereau-Gayon et al., 2006).

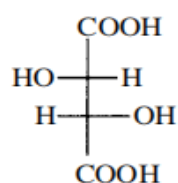
1.4 Τα Οργανικά Οξέα

Τα οργανικά οξέα που βρίσκονται στους οίνους μπορεί: α) να προέρχονται απευθείας από το σταφύλι, β) να σχηματίζονται σαν δευτερογενή προϊόντα κατά την αλκοολική ζύμωση ή αλλιώς γ) μπορεί να απελευθερωθούν ως προϊόντα τυχόν βακτηριακών προσβολών και ενζυμικών δράσεων (Ribereau-Gayon et al., 2006). Επιπλέον συνεισφέρουν σημαντικά στη σύσταση, στη σταθερότητα και στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των οίνων, και ιδιαίτερος των λευκών, καθώς συμβάλλουν στην αύξηση της όξινης - δροσερής γεύσης, στη προστασία του χρώματος και στη πολυπλοκότητα του αρώματος (Ribereau-Gayon et al., 1982; Jackson, 1994).

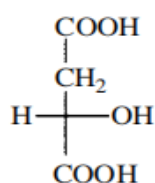
Τρυγικό οξύ

Το τρυγικό οξύ είναι ένα από τα κυριότερα οξέα σε συγκέντρωση στο σταφύλι (7,5 – 15 g/L), στα γλεύκη (6 – 2 g/L) και στους οίνους (1,5 – 2,5 g/L) (Εικόνα 2). Είναι ένα ισχυρό οξύ και μαζί με την συγκέντρωση των ιόντων καλίου διαμορφώνει το pH των οίνων (pH 3,0-3,5) (Ribereau-Gayon et al., 2006), λόγω της ικανότητας του να διίσταται και να συμμετέχει ενεργά στην ογκομετρούμενη οξύτητα του κρασιού. Η τελική συγκέντρωση και η διαλυτότητα του τρυγικού οξέος στους οίνους επηρεάζεται από: τον αλκοολομετρικό τίτλο, τη διαλυτότητα των αλάτων, τη συγκέντρωση σε

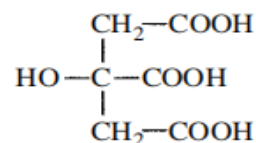
ανόργανα ανιόντα, την περιεκτικότητα σε μηλικό και γαλακτικό οξύ, τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος, τις διάφορες επεξεργασίες του οίνου και την προσβολή του από ορισμένα οξυγαλακτικά βακτήρια (Σουφλερός, 1997). Η γαλακτική ζύμωση του τρυγικού οξέος οδηγεί στη δημιουργία οξικού οξέος, έχοντας ως αποτέλεσμα την αύξηση της πτητικής οξύτητας και την απώλεια βασικών οργανοληπτικών συστατικών στους οίνους. Επιπλέον, λόγω του ότι είναι το πιο ανθεκτικό οξύ στις βακτηριακές προσβολές, μπορεί να προστεθεί για την διόρθωση-αύξηση της οξύτητας σε κρασιά με υψηλό pH. Επίσης, η εμφάνιση χημικής αστάθειας και η δημιουργία τρυγικών αλάτων, τα οποία κρυσταλλοποιούνται και καθιζάνουν με τη μορφή ιζήματος σε χαμηλές θερμοκρασίες, αποτελεί σύνηθες φαινόμενο στους οίνους. Έτσι, προς το τέλος της οινοποίησης το κρασί ψύχεται ώστε να πραγματοποιηθεί πρώιμος σχηματισμός ιζήματος και να αποφευχθεί η κρυσταλλοποίηση αργότερα μέσα στη φιάλη.



L(+)-Tartaric acid



L(-)-Malic acid



Citric acid

Εικόνα 2: Τα κύρια οξέα του οίνου: τρυγικό, μηλικό και κιτρικό οξύ (Ribereau-Gayon et al., 2006).

Μηλικό οξύ

Η συγκέντρωση του μηλικού οξέος στα ανώριμα σταφύλια μπορεί να φτάσει έως και τα 25 g/L, ενώ κατά το στάδιο του περκασμού και της ωρίμανσης μειώνεται και φτάνει έως και τα 2 - 4 g/L (Ribereau-Gayon et al., 2006). Όσο υψηλότερη είναι η θερμοκρασία στο στάδιο της ωρίμανσης των σταφυλιών, τόσο περισσότερο επιταχύνεται η καύση του μηλικού οξέος στη ράγα, με αποτέλεσμα η συγκέντρωσή του να μειώνεται. Συνεπώς, οι οίνοι ορεινών αμπελώνων εμφανίζουν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις μηλικού οξέος από τους οίνους των πεδινών περιοχών (Ribereau-Gayon et al., 2006). Η συγκέντρωση μηλικού οξέος στη ράγα αποτελεί ένα βασικό δείκτη για τον καθορισμό της έναρξης του τρύγου σε έναν αμπελώνα. Στους οίνους η συγκέντρωση του μειώνεται έως και κατά 25 % κατά την αλκοολική ζύμωση, ενώ η παρουσία του σε ποσότητες 1 – 2,5 g/L μετά τη ζύμωση αποδίδει μια φρουτώδη γεύση με μια παράλληλη αίσθηση φρεσκάδας. Επιπλέον το μηλικό οξύ μεταβολίζεται προς την δημιουργία γαλακτικού οξέος, μέσω της δράσης των γαλακτικών βακτηρίων κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση των οίνων που έχουν τοποθετηθεί σε βαρέλια.

Κιτρικό οξύ

Το κιτρικό οξύ είναι πολύ διαδεδομένο στη φύση και είναι γνωστό διότι διαδραματίζει έναν εξαιρετικά σημαντικό βιοχημικό και μεταβολικό ρόλο για τους οργανισμούς (κύκλος του Krebs ή αλλιώς κύκλος του κιτρικού οξέος) (Ribereau-Gayon et al., 2006). Στο σταφύλι βρίσκεται σε μικρές ποσότητες και οι συγκεντρώσεις του στο μούστο και στο κρασί είναι της τάξης των 0,5 έως 1 g/L (Ribereau-Gayon et al., 2006). Στους οίνους κατά την μηλογαλακτική ζύμωση διασπάται από τα

γαλακτικά βακτήρια δίνοντας οξικό οξύ. Επιπλέον, συμμετέχει και στον οργανοληπτικό χαρακτήρα του κρασιού, παρέχοντας του μια ευχάριστη αίσθηση φρεσκάδας και οξύτητας στο στόμα.

Ασκορβικό οξύ

Στο γλεύκος περιέχονται 50 έως 100 mg/L ασκορβικού οξέος (Ρούσσης, 2015), τα οποία καταναλώνονται από τους ζυμομύκητες, με αποτέλεσμα οι ποσότητες του να ελαχιστοποιούνται έως και να εκμηδενίζονται στο τελικό κρασί.

Λοιπά οξέα που παράγονται κατά την ζύμωση

Τα κυριότερα οξέα των οίνων που παράγονται κατά την διάρκεια της ζύμωσης ως δευτερογενή προϊόντα είναι: το πυρουβικό, το L-(+) και L-(-) γαλακτικό, το ηλεκτρικό, το οξικό, το κιτρομηλικό, το οξαλοοξικό και το φουμαρικό οξύ (Ribereau-Gayon et al., 2006). Παραδείγματος χάρη, το ηλεκτρικό οξύ συμβάλει στη πολυπλοκότητα των οίνων, καθώς συνδυάζει την ξινή, την πικρή και την αλμυρή γεύση. Επιπλέον, ως ενδιάμεσα προϊόντα του μεταβολισμού των ζυμών παράγονται και κετονικά οξέα, όπως είναι το πυροσταφυλικό οξύ που εμπεριέχεται στους οίνους.

Γαλακτικό οξύ

Το γαλακτικό οξύ που υπάρχει στους οίνους μπορεί να προέρχεται από: α) Τις ζύμες κατά την αλκοολική ζύμωση, σε ποσότητες 0,1-0,4 g/L. β) Τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση, σε ποσότητες έως 3 g/L. γ) Τα γαλακτικά βακτήρια μέσω της προσβολής των σακχάρων (εξοζών), της γλυκερίνης και του τρυγικού οξέος.

Πτητικά οξέα

Τα πτητικά οξέα έχουν δυσμενείς επιδράσεις τόσο στη ποιότητα των οίνων, όσο και στα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά προσδίδοντάς τους μια έντονη και δριμεία οσμή που χαρακτηρίζει τα κρασιά με υψηλές πτητικές οξύτητες (Ribereau-Gayon et al., 2006; Κοτσερίδης & Προξενία, 2015). Στην κατηγορία των πτητικών οξέων συγκαταλέγεται το οξικό, το μυρμηκικό, το προπιονικό και το βουτυρικό οξύ των οίνων (Ribereau-Gayon et al., 2006). Το οξικό οξύ αποτελεί το 90-95 % της πτητικής οξύτητας του οίνου. Με βάση την ανακοίνωση της Ευρωπαϊκής Επιτροπής (2010), η πτητική οξύτητα απαρτίζεται από τα οξέα της σειράς του οξικού οξέος που εμφανίζονται στους οίνους ελεύθερα ή με μορφή αλάτων και είναι σημαντικό να παρακολουθείται καθ'όλη τη διάρκεια της οινοποιητικής διαδικασίας. Κατά την αλκοολική ζύμωση του γλεύκους, τόσο στην αρχή όσο και προς το τέλος της, σχηματίζονται 0,2 έως 0,3 g/L H₂SO₄ τα οποία αντιστοιχούν στην πτητική οξύτητα του κρασιού που παράχθηκε (Ribereau-Gayon et al., 2006). Επιπλέον αύξηση της πτητικής οξύτητας εμφανίζεται και κατά την μηλογαλακτική ζύμωση από 0,1 έως 0,2 g/L H₂SO₄ (Ribereau-Gayon et al., 2006). Οι Chauvet et al. (1982) στη μελέτη τους διαπίστωσαν ότι η παραγωγή οξικού οξέος κατά την μηλογαλακτική ζύμωση πραγματοποιείται μέσω της διάσπασης του κιτρικού οξέος από τα γαλακτικά βακτήρια. Ωστόσο, η εμφάνιση υψηλής πτητικής οξύτητας στους οίνους συνδέεται με ανεπιθύμητα φαινόμενα. Κυρίως εμφανίζεται μέσω της διάσπασης των εναπομεινάντων σακχάρων, του τρυγικού οξέος και της γλυκερόλης από τη δράση αναερόβιων γαλακτικών βακτηρίων (Ribereau-Gayon et al., 2006). Ακόμη, η παρουσία αερόβιων οξικών βακτηρίων στο κρασί συνδράμει στην παραγωγή οξικού οξέος μέσω της ενζυμικής οξειδωσης της αιθανόλης (Ribereau-Gayon et al., 2006). Η συγκέντρωση του οξικού

οξέος στους οίνους αποτελεί κριτήριο για την υγιεινή τους κατάσταση και την ποιότητά τους, ενώ παράλληλα η παρουσία του σε ποσότητες πάνω από 1 g/L γίνεται αντιληπτή και οργανοληπτικά μέσω της εμφάνισης ενός χαρακτηριστικού αρώματος ξιδιού (Ribereau-Gayon et al., 2006).

1.5 Αζωτούχες ενώσεις

Οι αζωτούχες ενώσεις εμφανίζονται σε συγκεντρώσεις από 0,5 έως 4 g/L (Ribereau-Gayon et al., 2006). Μπορούν να αντιπροσωπεύουν έως και το 20 % του ξηρού υπολείμματος σε ένα ξηρό κρασί και κυρίως προέρχονται από το σταφύλι (Ribereau-Gayon et al., 2006). Η συγκέντρωσή τους εξαρτάται από την ωρίμανση και την ποικιλία των σταφυλιών, καθώς και από τον χρόνο εκχύλισης, τη θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και την οξύτητα του γλεύκους. Στους οίνους στη πλειονότητά τους είναι οργανικές (95 %) και σε μικρότερο ποσοστό ανόργανες (5 %). Οι ερυθροί οίνοι περιέχουν τη διπλάσια ποσότητα αζωτούχων ενώσεων σε σχέση με τους λευκούς (Ribereau-Gayon et al., 1982).

Ανόργανες αζωτούχες ενώσεις

Οι ανόργανες αζωτούχες ενώσεις βρίσκονται με τη μορφή αμμωνιακών αλάτων [(NH₄)₃PO₄]. Η σημαντικότητα τους έγκειται στο γεγονός ότι αποτελούν την κύρια πηγή θρεπτικών συστατικών για τους ζυμομύκητες, ιδιαιτέρως τα ιόντα NH⁴⁺, με αποτέλεσμα η συγκέντρωσή τους να εκμηδενίζεται μετά το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης (Ribereau-Gayon et al., 2006).

Οργανικές αζωτούχες ενώσεις

Όσον αφορά τις οργανικές αζωτούχες ενώσεις, οι σημαντικότερες που βρίσκονται στους οίνους είναι:

α) Τα Αμινοξέα

Οι Roux και Ournac (1970) διαπίστωσαν ότι τα αμινοξέα ενός γλεύκους αντιπροσωπεύουν το 20-30 % του συνολικού αζώτου. Παράλληλα, οι Rapp και Versini (1991) ανίχνευσαν περίπου 20 διαφορετικά ελεύθερα αμινοξέα σε γλεύκος σταφυλιών ερυθρών και λευκών ποικιλιών, για τα οποία οι μετρήσεις τους έδειξαν ότι αντιστοιχούν στο 28 με 39 % του συνολικού αζώτου. Με βάση τα αποτελέσματά τους επιβεβαιώνεται ότι οι αζωτούχες ενώσεις στα γλεύκη βρίσκονται σε πολύ μεγαλύτερες ποσότητες από ότι στους οίνους. Η συγκέντρωσή τους στο γλεύκος μεταβάλλεται από χρονιά σε χρονιά και μπορεί να κυμαίνεται από 1- 4 g/L (Ribereau-Gayon et al., 2000; 2006). Τα ελεύθερα αμινοξέα χρησιμοποιούνται ως θρεπτικά συστατικά από τους ζυμομύκητες κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, ενώ παράλληλα αποτελούν σημαντική πηγή αζώτου και για τα γαλακτικά βακτήρια κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση (Moreno-Arribas & Polo, 2009). Επιπλέον, οι Moreno-Arribas και Polo (2009) συμπέραναν ότι τόσο η συγκέντρωσή, όσο και η σύσταση των αμινοξέων σε έναν οίνο έχει σημαντική επίδραση στην αρωματική του πολυπλοκότητα, καθώς λειτουργούν σαν μια πηγή αρωματικών ενώσεων. Στους οίνους ανιχνεύονται μόνο τα L-αμινοξέα. Πιο συγκεκριμένα, τα δυο αμινοξέα που βρίσκονται σε αφθονία στους οίνους είναι η προλίνη και η αργινίνη (Feuillat, 1974). Στη μελέτη τους, οι ερευνητές ανέλυσαν τα πρωτογενή αμινοξέα 42 ελληνικών λευκών κρασιών από 6 διαφορετικές ποικιλίες σταφυλιών και από αρκετές διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές. Οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι η αργινίνη, το γ-

αμινοβουτυρικό οξύ, η λυσίνη, η αλανίνη, η γλυκίνη, το ασπαρτικό οξύ και η λευκίνη ήταν τα κύρια αμινοξέα που ανιχνεύτηκαν σε αφθονία στους οίνους (Soufleros et al., 2003).

β) Τα Ολιγοπεπτίδια

Τα ολιγοπεπτίδια των γλευκών και των οίνων απαρτίζονται από αζωτούχες ενώσεις που προκύπτουν από τη συνένωση έως και τεσσάρων αμινοξέων, ενωμένα με πεπτιδικούς δεσμούς (Ribereau-Gayon et al., 2006). Η γλουταθειόνη είναι ένα τριπεπτίδιο που ανιχνεύεται στα γλεύκη, ενώ παράλληλα χρησιμοποιείται ως πρόσθετο στην οινοβιομηχανία λόγω των ευεργετικών αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων που μπορεί να προσφέρει στους οίνους [βλ. Κεφ. 2.10.3].

γ) Οι πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες των οίνων είναι μικρού μοριακού βάρους και προέρχονται κυρίως από το σταφύλι (Ribereau-Gayon et al., 2006). Οι συγκεντρώσεις τους εμφανίζουν παραλλακτικότητα ανάλογα με την ποικιλία του σταφυλιού και τις διάφορες οινοποιητικές τεχνικές που εφαρμόζονται στα γλεύκη και στους οίνους. Οι λευκοί και οι ροζέ οίνοι τις περιέχουν σε πολύ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε σχέση με τους ερυθρούς. Αυτό συμβαίνει λόγω της ισχυρής τάσης των ελεύθερων πρωτεϊνών να δεσμεύονται από τις ταννίνες των ερυθρών οίνων και να καταβυθίζονται (Ribereau-Gayon et al., 2006). Οι πρωτεΐνες του σταφυλιού στο μεγαλύτερο ποσοστό είναι χιτινάσες και θαυματίνες. Στη μελέτη τους οι Claus και Mojsos (2018) ανέφεραν ότι οι πρωτεΐνες αυτές συνδέονται άμεσα με τη παθογένεια και με την άμυνα του φυτού ενάντια σε βακτηριακές και μυκητολογικές προσβολές (Pathogenesis-related proteins). Λόγω των συμπαγών δομών τους είναι ανθεκτικές στις όξινες συνθήκες του οίνου και στην πρωτεόλυση, με αποτέλεσμα να είναι υπεύθυνες για την εμφάνιση του προβλήματος της πρωτεϊνικής αστάθειας των λευκών οίνων (Mesquita et al., 2001; Ribereau-Gayon et al., 2006). Πρώτος ο Laborde το 1904 ανέφερε για την καθίζηση των πρωτεϊνών αυτών και τη δημιουργία του πρωτεϊνικού θολώματος (Laborde, 1904). Το πρόβλημα της πρωτεϊνικής αστάθειας κυρίως έγκειται στη φιάλη και ιδίως κατά την αποθήκευση των οίνων σε συνθήκες υψηλών θερμοκρασιών. Συγκεκριμένα, οι γλυκοσυλιωμένες με χαμηλό μοριακό βάρος και με χαμηλό ισοηλεκτρικό σημείο πρωτεΐνες είναι υπεύθυνες για το σχηματισμό του πρωτεϊνικού θολώματος (Dawes et al., 1994; Yokotsuka et al., 1994; Santoro, 1995; Toland et al., 1996). Οι Koch και Sajak (1959) ήταν οι πρώτοι που απομόνωσαν και διαχώρισαν τα κλάσματα των ασταθών πρωτεϊνών σε γλεύκος σταφυλιού. Τα κλάσματα αυτά έχουν ανιχνευθεί και στους οίνους και εμφανίζουν την τάση να αντιδρούν με τα σάκχαρα, τις ταννίνες και τα κατιόντα, μειώνοντας τα στο τελικό προϊόν. Στην έρευνα τους, οι Mesquita et al. (2001) προσπάθησαν να ερμηνεύσουν την επίδραση που έχει η αύξηση της θερμοκρασίας, στην εμφάνιση του πρωτεϊνικού θολώματος. Οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το πρωτεϊνικό θόλωμα των οίνων δεν οφείλεται αποκλειστικά στη φύση και στη συγκέντρωση των πρωτεϊνών, αλλά ελέγχεται και οφείλεται σε ένα συνδυασμό μη πρωτεϊνικών παραγόντων, όπως είναι η θερμοκρασία, η παρουσία πολυσακχαριτών και φαινολικών ενώσεων, αλλά και το χαμηλό pH των οίνων (Mesquita et al., 2001). Η απομάκρυνση των ασταθών πρωτεϊνών στην οινοβιομηχανία επιτυγχάνεται κυρίως με την προσθήκη μπεντονίτη, ο οποίος προσροφά τις πρωτεΐνες, που είναι θετικά φορτισμένες στο pH του οίνου, και τις καταβυθίζει (Saywell, 1934; Ribereau-Gayon, 1935). Παράλληλα στους οίνους ανιχνεύεται και μια επιπρόσθετη κατηγορία πρωτεϊνών, η οποία αφορά αυτές που παράγονται από την αυτόλυση των κυττάρων των ζυμομυκήτων τόσο κατά το στάδιο της αλκοολικής ζύμωσης, όσο και κατά το στάδιο της ωρίμανσης τους στο βαρέλι (μαννοπρωτεΐνες) (Feuillat, 1974). Οι πρωτεΐνες αυτές δεν

επηρεάζονται από μεταβολές της θερμοκρασίας, αλλά παρουσιάζουν ευαισθησία στις αντιδράσεις που υφίστανται από τις πρωτεάσες των ζυμομυκήτων (Ribereau-Gayon et al., 2006). Επομένως μόνο οι πρωτεΐνες που εμφανίζουν ευαισθησία στις θερμικές επεξεργασίες είναι υπεύθυνες για την εμφάνιση του πρωτεϊνικού θολώματος των οίνων (Ribereau-Gayon et al., 2006).

δ) *Πυραζίνες*

Πρόκειται για ετεροκυκλικές ενώσεις οι οποίες παρουσιάζουν δυο άτομα αζώτου στο μόριο τους και παράγονται από τον μεταβολισμό των αμινοξέων (Ribereau-Gayon et al., 2006). Οι μεθοξυπυραζίνες ανιχνεύονται στους οίνους συγκεκριμένων ποικιλιών και συμβάλλουν στη διαμόρφωση του ποικιλιακού τους αρώματος (πρωτογενές άρωμα) [βλ. Κεφ. 1.6.1]. Η συγκέντρωσή τους στο γλεύκος και στο παραγόμενο οίνο μεταβάλλεται ανάλογα με την ποικιλία του σταφυλιού, το κλίμα της περιοχής των αμπελώνων αλλά και τις διάφορες αμπελουργικές τεχνικές που εφαρμόζονται σε αυτόν. Οι Bayonove et al. (1975) ήταν οι πρώτοι που διαπίστωσαν ότι η ένωση 2-μεθοξυ-3-ισοβουτυραζίνη ήταν υπεύθυνη για τα χαρακτηριστικά φυτικά αρώματα των οίνων ποικιλίας Cabernet Sauvignon. Αντίστοιχα, οι Augustyn et al. (1982) ταυτοποίησαν τις ενώσεις των μεθοξυπυραζίων σε κρασιά ποικιλίας Sauvignon blanc. Επίσης, σε επόμενη μελέτη με τη χρήση της αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας (GC-MS), οι ερευνητές ανίχνευσαν την ένωση 2-μεθόξυ-3-(1-μεθυλοπροπιλ) πυραζίνη σε κρασιά ποικιλιών Cabernet Sauvignon, Merlot και Cabernet Franc σε συγκεντρώσεις μικρότερες από 2 ng/L (Allen et al., 1995).

ε) *Βιογενείς Αμίνες*

Οι βιογενείς αμίνες στους οίνους έχουν τρεις πιθανές προελεύσεις, καθώς μπορεί να προέρχονται από το σταφύλι, ή να απελευθερώνονται από τους ζυμομύκητες κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης ή από κάποια στελέχη γαλακτικών βακτηρίων ως παραπροϊόντα της μηλογαλακτικής ζύμωσης (Arce et al., 1998). Η βιοσύνθεση τους οφείλεται στην αποκαρβοξυλίωση των αμινοξέων μέσω της δράσης μικροβιακών ενζύμων (Severin et al., 2003), όπως η αποκαρβοξυλίωση των γαλακτικών βακτηρίων. Η συσσώρευση και ο σχηματισμός τους στο κρασί μπορεί να εμφανιστούν σε διαφορετικά στάδια της οινοποιητικής διαδικασίας (Kushnereva, 2015), αλλά και με τη χρήση διαφόρων οινοποιητικών τεχνικών (Souza et al., 2005). Στη περίπτωση της αλκοολικής ζύμωσης οι συγκεντρώσεις τους εξαρτώνται από το στέλεχος της ζύμης που χρησιμοποιείται (λόγω των ενζύμων που μπορεί να παράξει), αλλά και από τις συνθήκες της ζύμωσης, δηλαδή από τη θερμοκρασία και τη χρονική της διάρκεια (Soufleros et al., 2007). Στην έρευνα των Soufleros et al. (2007) μελετήθηκαν τα επίπεδα δέκα βιογενών αμινών σε ελληνικούς οίνους και διαπιστώθηκε ότι το συνολικό μέσο επίπεδο αμίνης ήταν της τάξης των 4,76 mg/L, με κυρίαρχες τις συγκεντρώσεις της πουτρεσκίνης και την αιθυλαμίνης, ενώ ακολούθησαν η καδαβερίνη και η μεθυλαμίνη.

Όσον αφορά την αμπελοκαλλιέργεια, η προσθήκη αζωτούχων λιπασμάτων αυξάνει την συγκέντρωση βιογενών αμινών στη ράγα (Ough, 1971). Ωστόσο η συγκέντρωσή τους στο τελικό κρασί εξαρτάται και από την ποικιλία του σταφυλιού. Παραδείγματος χάρη, οι ποικιλίες Cabernet Franc και Cabernet Sauvignon εμφανίζουν υψηλά επίπεδα βιογενών αμινών (Souza et al., 2005). Γενικότερα οι ερυθροί οίνοι, λόγω της οινοποιητικής διαδικασίας που υφίστανται (επαφή του χυμού με τους φλοιούς και τα στέμφυλα - εκχύλιση συστατικών, εφαρμογή μηλογαλακτικής ζύμωσης), τις περιέχουν σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από ότι οι λευκοί, ενώ έχει διαπιστωθεί ότι οι αφρώδεις οίνοι σε ένα μπουκάλι περιέχουν 1,5 - 2 φορές περισσότερες βιογενείς αμίνες από ότι τα επιτραπέζια κρασιά (Kushnereva., 2015). Επίσης άλλοι παράγοντες που ευνοούν το σχηματισμό

και τη συσσώρευση βιογενών αμινών είναι η προσθήκη των πηκτινολυτικών ενζύμων αφού αυξάνουν τον χρόνο εκχύλισης αλλά και η αλκοόλη, το pH των οίνων, καθώς και ο χρόνος και οι συνθήκες παλαίωσης τους (Ough, 1971; Radler & Fäth, 1991; Souza et al., 2005). Ακόμη, ο τύπος και οι συγκεντρώσεις των βιογενών αμινών στον οίνο συνδέονται άμεσα με την υγεία του ανθρώπινου οργανισμού, καθώς έχουν μελετηθεί και αναφερθεί οι τοξικότητες που επιφέρουν στον ανθρώπινο οργανισμό (Bauza, 1995; Lehtonen, 1996). Για παράδειγμα, η ισταμίνη έχει συσχετιστεί με τη αγγειοδιαστολή και την προξένηση αλλεργιών και φλεγμονών, ενώ η τυραμίνη, η τρυπταμίνη και η 2-φαινυλαιθυλαμίνη στην αύξηση της αρτηριακής πίεσης ή την πρόκληση ημικρανιών (Souza et al., 2005). Επομένως η πρόληψη είναι αναγκαία και αποτελεί τον σημαντικότερο παράγοντα ενάντια στη παραγωγή τους στους οίνους. Αυτό επιτυγχάνεται με την προσθήκη θειώδους ανυδρίτη ή λυσοζύμης και με τον εμβολιασμό με στελέχη γαλακτικών βακτηρίων που δεν παράγουν το ένζυμο αποκαρβοξυλάση, ενώ οι σωστές συνθήκες υγιεινής στο οινοποιείο αποτελούν επίσης σημαντικό κανόνα για τη διασφάλιση της ποιότητας των κρασιών (Arce et al., 1998).

στ) Λοιπές αζωτούχες ενώσεις των οίνων

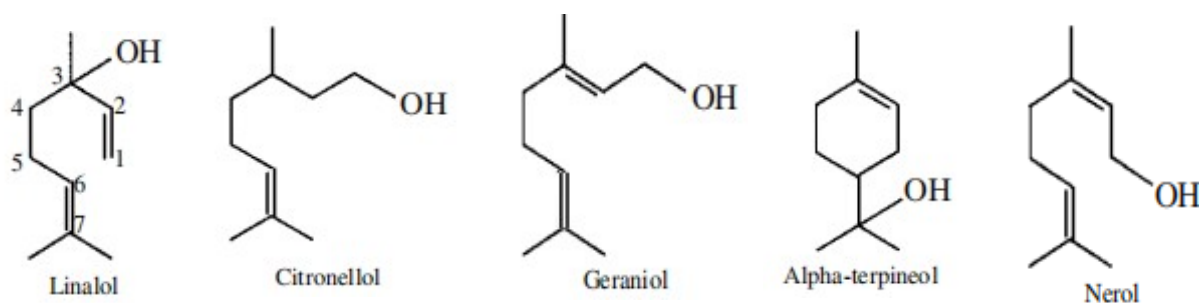
Επίσης στην ομάδα των αζωτούχων ενώσεων των οίνων συγκαταλέγεται η ουρία και ο καρβαμιδικός αιθυλεστέρας (Ribereau-Gayon et al., 2006). Άλλες οργανικές αζωτούχες μορφές που περιέχονται στους οίνους είναι οι νουκλεϊκές βάσεις (πουρίνη, πυριμιδίνη) και τα νουκλεϊκά οξέα. Επιπλέον υπάρχουν και τα αμινο-ζάχαρα, όπως είναι η γλυκοζαμίνη και η γαλακτοζαμίνη.

1.6 Πτητικές ενώσεις των οίνων

Το άρωμα στους οίνους διακρίνεται σε πρωτογενές, δευτερογενές και τριτογενές.

1.6.1 Πρωτογενές άρωμα των οίνων

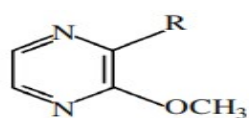
Το πρωτογενές άρωμα των οίνων οφείλεται στις ενώσεις που προέρχονται από το σταφύλι, στις οποίες συγκαταλέγονται οι τερπενικές ενώσεις, οι πυραζίνες και οι θειόλες. Οι τερπενικές ενώσεις του κρασιού είναι οργανικές ενώσεις με 10 (μονοτερπένια) και 15 άτομα άνθρακα (σεσκιτερπένια), που σχηματίζονται από δύο και τρεις μονάδες ισοπρενίου (Ribereau-Gayon, et al., 2006). Η ομάδα των μονοτερπενίων μπορεί να περιλαμβάνει ενώσεις με τη μορφή απλών υδρογονανθράκων (λιμονένιο), ή αλκοολών και οξέων (γερανικό οξύ) ή ακόμα και εστέρων (οξικός εστέρας της λιναλοόλης) (Ribereau-Gayon, et al., 2006). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι τερπενόλες που βρίσκονται με τη μορφή αλκοολών, όπως είναι η λιναλοόλη, η α-τερπινεόλη, η γερανιόλη, η κιτρονελλοόλη και η νεροόλη (Εικόνα 3). Τα αρώματα που εκλύουν είναι κυρίως εσπεριδοειδή και ανθικά αρώματα, κυρίως τριαντάφυλλου (Jackson, 2002).



Εικόνα 3: Οι κυριότερες μονοτερπενικές αλκοόλες των σταφυλιών και του κρασιού (Ribereau-Gayon, et al., 2006).

Κατά την ωρίμανση και την παλαίωση των οίνων τόσο η μορφή, όσο και η αναλογία των τερπενικών ενώσεων αλλοιώνεται (Jackson, 2002). Παραδείγματος χάρη κάποια τερπένια μετατρέπονται σε κετόνες, όπως είναι η α -ιονόνη και η β -ιονόνη (άρωμα βιολέτας), ενώ οι λιναλόλη, γερανιόλη και κιτρονελλόλη μειώνονται αισθητά όσο αυξάνεται ο χρόνος παλαίωσης (Jackson, 2002). Συγκεκριμένα, η αποικοδόμηση μέσω της οξείδωσης των τερπενίων με 40 άτομα άνθρακα (καροτενοειδή) παράγει τις ενώσεις των νορισοπρενοειδών. Στην ομάδα αυτή συγκαταλέγεται η β -δαμασκηνόνη που έχει εξαιρετικά χαμηλό κατώφλι αντίληψης (3 - 4 ng/L) και εκλύει κυρίως ανθικά αρώματα και οσμές τροπικών φρούτων (Ribereau-Gayon, et al., 2006). Οι συγκεντρώσεις της είναι συνήθως μεγαλύτερες στους ερυθρούς οίνους από ότι στα λευκά ξηρά κρασιά (Ribereau-Gayon, et al., 2006).

Ακόμη, στο ποικιλιακό άρωμα των οίνων κατατάσσεται και η ομάδα των πυραζινών (Εικόνα 4). Τα χαρακτηριστικά φυτικά - πράσινα αρώματα που εμφανίζονται σε ορισμένους οίνους, όπως οσμές πράσινης πιπεριάς και σπαραγγιού δίνει η ομάδα των μεθοξυπυραζινών (Augustyn et al., 1982; Ribereau-Gayon, et al., 2006). Οι Allen et al. (1991) διαπίστωσαν ότι η εμφάνιση αυτών των χαρακτηριστικών φυτικών αρωμάτων σε κρασιά ποικιλίας Sauvignon blanc, οφείλεται στην ένωση ισοβουτυλομεθοξυπυραζίνη. Οι μεθοξυπυραζίνες είναι ενώσεις που προέρχονται από το σταφύλι και οι συγκεντρώσεις τους παραμένουν σταθερές κατά το στάδιο της ζύμωσης (Allen & Lacey, 1998). Επιπροσθέτως, στην ομάδα των πρωτογενών αρωμάτων συγκαταλέγονται και οι ποικιλιακές θειόλες (ή μερκαπτάνες) (Ribereau-Gayon, et al., 2006). Οι θειόλες είναι θειούχα παράγωγα των αλκοολών, που στη θέση του -OH έχουν την ομάδα -SH. Η ένωση 3-μερκαπτοεξανόλη είναι μια θειόλη με θετική επίδραση στο άρωμα που ανιχνεύεται σε οίνους της ποικιλίας Sauvignon blanc, στους οποίους προσφέρει ένα χαρακτηριστικό φρουτώδες άρωμα γκρέιπφρουτ (Tominaga et al., 1996; 1998). Παράλληλα, οι θειόλες των σταφυλιών οξειδώνονται σε δισουλφίδια (Mestres et al., 1997). Κάποια από τα σουλφίδια, όπως είναι το διαίθυλο σουλφίδιο και το διαίθυλο δισουλφίδιο μπορούν να προσδώσουν δυσάρεστες οσμές σκόρδου και κρεμμυδιού στους οίνους (Mestres et al., 2000; Moreno-Arribas & Polo, 2009; Fedrizzi et al., 2007).



R: $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$

R: $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$

R: $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$

2-Methoxy-3-isobutylpyrazine

2-Methoxy-3-isopropylpyrazine

2-Methoxy-3-sec-butylpyrazine

Εικόνα 4: Οι κύριες μεθοξυπυραζίνες των οίνων (Ribereau-Gayon, et al., 2006).

1.6.2 Δευτερογενές άρωμα των οίνων

Το δευτερογενές άρωμα διαμορφώνεται από τις πτητικές ενώσεις που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης από την δράση των ζυμομυκήτων. Ωστόσο, δευτερογενή αρώματα παράγονται και κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση από της δράσης των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος (Grainger, 2009). Στους νεαρούς φρέσκους οίνους απαντώνται διάφοροι εστέρες που δημιουργούνται ενζυμικά κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης. Παράλληλα, οι εστέρες των οίνων μπορεί να σχηματίζονται και μη ενζυμικά κατά τη διάρκεια της παλαίωσης, με αποτέλεσμα οι συγκεντρώσεις τους να αυξάνονται με το πέρασμα του χρόνου και να φτάνουν και τα 9 με 10 mg/L (Σουφλερός, 2000). Παραδείγματος χάρη, ο οξικός αιθυλεστέρας συγκαταλέγεται στα παραπροϊόντα του μεταβολισμού των ζυμών, αλλά μπορεί να σχηματιστεί και από τα οξικά βακτήρια μέσω της ενζυμικής οξειδωσης της αιθανόλης προς οξικό οξύ. Ωστόσο, μέσα στο κρασί μπορεί να σχηματιστεί και μέσω της εστεροποίησης του οξικού οξέος και της αιθανόλης. Είναι υπεύθυνος για την εμφάνιση φρουτώδων αρωμάτων στους οίνους που θυμίζουν μήλο, αχλάδι, μπανάνα αλλά σε υψηλές συγκεντρώσεις, μεγαλύτερες των 100 mg/L, προσδίδει στους οίνους δυσάρεστη ορμή επηρεάζοντας έτσι αρνητικά τη ποιότητά τους (Belitz et al., 2009).

Πιο συγκεκριμένα, οι μικρού μοριακού βάρους εστέρες συνδέονται με ευχάριστα φρουτώδη αρώματα στους οίνους (μπανάνα, αχλάδι), όπως είναι οι εστέρες των λιπαρών οξέων (Jackson, 2002). Σε αυτή την κατηγορία ανήκει ο εξανοϊκός αιθυλεστέρας, ο οκτανοϊκός αιθυλεστέρας και ο δεκανοϊκός αιθυλεστέρας (Jackson, 2002). Επιπλέον στην ομάδα των δευτερογενών αρωμάτων συγκαταλέγονται και οι ανώτερες αλκοόλες, όπως είναι η ισοαμυλική και η ισοβουτυλική αλκοόλη, για τις οποίες έχει διαπιστωθεί ότι αν οι συγκεντρώσεις τους στους οίνους υπερβαίνουν τα 400 mg/L φέρουν αρνητική επίδραση στο άρωμα (Σουφλερός, 2000). Από τις ανώτερες αλκοόλες σχηματίζονται ο ισοαμυλικός αιθυλεστέρας (άρωμα μπανάνας) και το οξικό βενζόλιο (άρωμα μήλου) που απαντώνται κυρίως σε νεαρούς οίνους. Ακόμη, ως ενδιάμεσο προϊόν της αλκοολικής ζύμωσης παράγεται και ακεταλδεύδη, ενώ όπως θα αναφερθεί και στη συνέχεια, μικρές ποσότητες ακεταλδεύδης παράγονται και με την οξειδωση της αιθανόλης παρουσία οξυγόνου (Waterhouse & Laurie, 2006) [βλ. Κεφ. 2.6]. Επιπλέον κατά τον μεταβολισμό των ζυμομυκήτων συντίθενται και θειούχες ενώσεις, των οποίων η παραγωγή εξαρτάται από την περιεκτικότητα του μούστου σε θρεπτικά συστατικά και κυρίως σε αζωτούχες ενώσεις (Jackson, 2008). Το υδρόθειο (H₂S) παράγεται από τους ζυμομύκητες, και σε χαμηλές συγκεντρώσεις αποτελεί μέρος του δευτερογενούς αρώματος των οίνων. Χαρακτηρίζει τα κρασιά που μόλις ζυμώθηκαν, ενώ σε αυξημένες συγκεντρώσεις προσδίδει δυσάρεστες οσμές κλούβιου αυγού (Jackson, 2008).

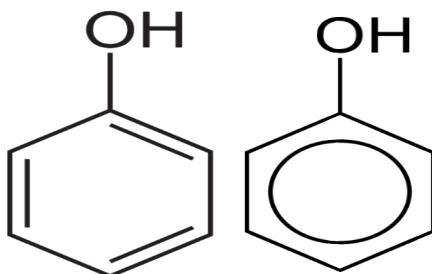
1.6.3 Τριτογενές άρωμα των οίνων

Το τριτογενές άρωμα οφείλεται σε διάφορες χημικές και ενζυμικές αντιδράσεις οι οποίες πραγματοποιούνται μετά το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης, κατά την ωρίμανση στο βαρέλι και τη παλαίωση των οίνων στη φιάλη. Έτσι, οι συγκεντρώσεις των τερπενίων και των εστέρων μειώνονται και παράγονται νέες πτητικές ενώσεις που θα συνθέσουν το τριτογενές άρωμα του

κρασιού (Jackson, 2002). Για την περιγραφή του αρώματος των παλαιωμένων οίνων χρησιμοποιείται ο όρος ‘μπουκέτο’. Κατά την παλαίωση πραγματοποιείται υδρόλυση των αιθυλεστέρων και σύνθεση των εστέρων των ανώτερων αλκοολών, έχοντας ως αποτέλεσμα την μείωση των φρουτωδών αρωμάτων και τη δημιουργία ενός πολυπλοκότερου αρώματος στο κρασί (Jackson, 2002). Επιπλέον, ως αποτέλεσμα της οξειδωτικής παλαίωσης του οίνου στα βαρέλια οι συγκεντρώσεις των αλδευδών αυξάνονται, ενώ πραγματοποιείται και η αύξηση της περιεκτικότητας διαφόρων άλλων αλδευδών, όπως η βανιλίνη (άρωμα βανίλιας) και η κινναμαλδεύδη (οσμή κανέλλας) από την διάσπαση της λιγνίνης του ξύλου. Τέλος, οι λακτόνες που ανιχνεύονται στους οίνους εκχυλίζονται από το ξύλο κατά το στάδιο της ωρίμανσης μέσα στο βαρέλι (Grainger, 2009; Jackson, 2002). Παραδείγματος χάρη, η εκχύλιση της trans-β-μεθυλό-γ-οκταλακτόνης από το βαρέλι ξύλου βελανιδιάς έχει συνδεθεί με ένα ευχάριστο άρωμα καρύδας στους οίνους (Ribereau-Gayon, et al., 2006).

1.7 Φαινολικά συστατικά των οίνων

Ως φαινολικά συστατικά καλούνται οι ενώσεις που φέρουν στη χημική τους δομή τη χαρακτηριστική αρωματική οργανική ένωση της φαινόλης (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Φαινόλη - Ομάδα φαινόλης.

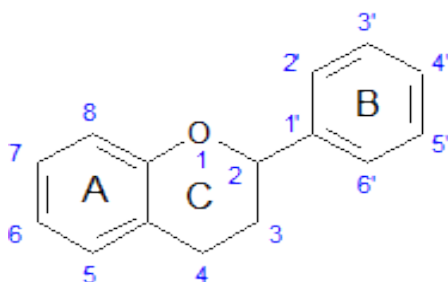
Στους οίνους συμβάλλουν στο καθορισμό της πικρής γεύσης και της αίσθησης του στυφού (στυπτικότητα) (Robichaud & Noble, 1990; Preys et al., 2006). Παράλληλα συνεισφέρουν στο άρωμα των οίνων, μέσω της παρουσίας των πτητικών φαινολών. Επιπλέον, συμμετέχουν στη διαμόρφωση του χρώματος των ερυθρών οίνων (ανθοκυάνες) (Jackson, 2008) και στο οξειδωτικό καφέτισμα των λευκών κρασιών (browning) (Li et al., 2008) μέσω των αντιδράσεων οξείδωσης (Cheynier & Ricardo da Silva, 1991; Ozmianski & Sapis, 1989). Ακόμη οι πολυφαινόλες διαθέτουν αντιβακτηριακή (Cueva et al., 2012) και αντιοξειδωτική δράση (Ali et al., 2010), ενώ παράλληλα καθορίζουν το σώμα, τη δομή, τη σταθερότητα και την ικανότητα ενός οίνου να παλαιώσει (Waterhouse, 2002). Επίσης συμμετέχουν στη ωρίμανση των κρασιών (Haslam, 1980), ενώ όπως είναι γνωστό αλληλεπιδρούν και με τις πρωτεΐνες του οίνου (Mehanso et al., 1987;

Ricardo da Silva et al., 1991). Οι ερυθροί οίνοι εμφανίζουν πολύ μεγαλύτερη φαιολική συγκέντρωση από ότι οι λευκοί. Οι συγκεντρώσεις και τα διάφορα είδη φαιολικών συστατικών σε αυτούς εξαρτώνται από ένα ευρύ φάσμα παραγόντων, όπως είναι η ποικιλία του σταφυλιού, οι κλιματικές συνθήκες της περιοχής, οι τεχνικές οινοποίησης, η ωρίμανση, η παλαίωση αλλά και η αποθήκευση των οίνων.

Οι φαιολικές ενώσεις των σταφυλιών και των οίνων ομαδοποιούνται σε δυο κατηγορίες με βάση τη χημική τους δομή: τις φλαβονοειδείς και τις μη φλαβονοειδείς φαινόλες.

1.7.1 Φλαβονοειδή φαιολικά συστατικά

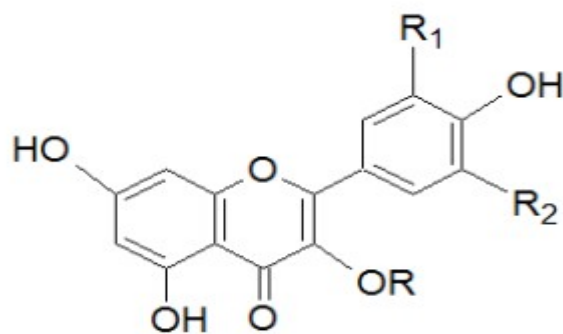
Οι φλαβονοειδείς φαινόλες δομούνται από έναν C₆-C₃-C₆ σκελετό του τύπου 2-φαινυλ-βενζοπυρόνη (Martens & Mithöfer, 2005) (Εικόνα 6). Συγκεκριμένα αποτελούνται από δύο φαιολικούς δακτυλίους (A και B), οι οποίοι ενώνονται με έναν οξυγονωμένο ετεροκυκλικό δακτύλιο (C). Ανάλογα με την οξειδωτική κατάσταση του C-δακτυλίου δημιουργούνται διάφορες υποκατηγορίες χημικών ενώσεων, οι οποίες είναι: οι φλαβανόνες, οι φλαβονόλες, οι φλαβανόλες (κατεχίνες), οι ανθοκυάνες, οι ταννίνες και άλλες. Ένας ερυθρός οίνος μπορεί να περιέχει συγκεντρώσεις από 1.000 έως και 4.000 mg/L σε φλαβονοειδή φαιολικά συστατικά (Arnous et al., 2001).



Εικόνα 6: Βασική δομή φλαβονοειδών φαιολικών συστατικών (Martens & Mithöfer, 2005).

1.7.1.1 Φλαβονόλες

Οι φλαβονόλες στη χημική τους δομή διαθέτουν έναν 3-υδροξυ-υποκαταστάτη (Εικόνα 7) (Martens & Mithöfer, 2005). Ουσιαστικά είναι κίτρινες χρωστικές που βρίσκονται στο φλοιό του σταφυλιού και η βασική τους λειτουργία είναι να προστατεύουν τη σάρκα από την UV ακτινοβολία (Chynier, 2006; Ribereau-Gayon et al., 2006). Σε σχέση με τα υπόλοιπα φλαβονοειδή φαιολικά συστατικά του κρασιού, οι φλαβονόλες βρίσκονται στη μικρότερη συγκέντρωση. Οι συγκεντρώσεις τους στους ερυθρούς οίνους έχουν βρεθεί ότι είναι υψηλότερες (100 mg/L), σε σχέση με τους λευκούς (1-3 mg/L) (Ribereau-Gayon et al., 2006).



R=glucose or glucuronic acid
 Kaempferol: $R_1=H$; $R_2=H$
 Quercetin: $R_1=OH$; $R_2=H$
 Myricetin: $R_1=OH$; $R_2=OH$
 Isorhamnetin: $R_1=H$; $R_2=OCH_3$
 Laricitrin: $R_1=OH$; $R_2=OCH_3$
 Syringetin: $R_1=OCH_3$; $R_2=OCH_3$

Εικόνα 7: Δομή των φλαβονολών των κρασιού (Ribereau-Gayon et al., 2006).

1.7.1.2 Φλαβανόνες

Οι φλαβανόνες διαφέρουν δομικά από τις φλαβονόλες λόγω της απουσίας του δραστικού -OH στη θέση 3. Τα παράγωγα των φλαβανονών δεν προέρχονται από το σταφύλι, αλλά εκχυλίζονται στους οίνους κατά την ωρίμανσή μέσα στο δρύινο βαρέλι, καθώς αποτελούν συστατικά του ξύλου της δρυός (Κουράκου, 1998).

1.7.1.3 Φλαβανόλες

Οι φλαβαν-3-όλες, ή αλλιώς φλαβανόλες, προκύπτουν μετά από υδρογόνωση του κεντρικού C-δακτυλίου της δομής της φλαβονόλης. Η ομάδα των φλαβανολών περιλαμβάνει όλα τα μονομερή, ολιγομερή και πολυμερή φλαβονοειδή του κρασιού που εμπεριέχουν τουλάχιστον ένα μόριο φλαβανόλης στο μόριο τους (Buckingham, & Munasinghe, 2015). Το επικρατέστερο από τα μονομερή είναι η (+)-κατεχίνη, με αποτέλεσμα όλες οι φλαβανόλες να χαρακτηρίζονται και ως κατεχίνες. Επίσης βασικά μονομερή των σταφυλιών και των οίνων είναι και η (-)-επικατεχίνη και ο (-)-3-γαλλικός εστέρας της επικατεχίνης. Σε έρευνα τους, οι Kallithra et al. (2006) διαπίστωσαν ότι η κατεχίνη και η επικατεχίνη ήταν από τις κυριότερες ενώσεις φλαβονοειδών συστατικών που ανιχνεύθηκαν σε ερυθρά κρασιά οινοποιήσιμων ποικιλιών. Επιπλέον υπάρχουν και τα συμπυκνωμένα φαινολικά παράγωγα που ονομάζονται προανθοκυανιδίνες και προέρχονται από τον πολυμερισμό των ευοξειδωτών κατεχινών. Οι προανθοκυανιδίνες κατά τη θέρμανση τους και υπό τη παρουσία ανόργανων οξέων, αποσυντίθενται και παράγουν τις έγχρωμες ανθοκυανιδίνες. Η πιο σημαντική ομάδα προανθοκυανιδινών είναι οι προκυανιδίνες, που αποτελούνται από μονομερή κατεχίνης και επικατεχίνης τα οποία με τη σειρά τους αποσυντίθενται παράγοντας κυανιδίνη. Αντίστοιχα, οι προδελφινιδίνες υπό τις ίδιες συνθήκες παράγουν δελφινιδίνη (Buckingham, & Munasinghe, 2015). Σημειώνεται ότι κατά την παλαίωση των κρασιών οι προκυανιδίνες μεταξύ τους σχηματίζουν πολυμερή που αποτελούνται από 3 έως 10 μονομερή φλαβανολών και ονομάζονται συμπυκνωμένες ταννίνες.

1.7.1.4 Ταννίνες

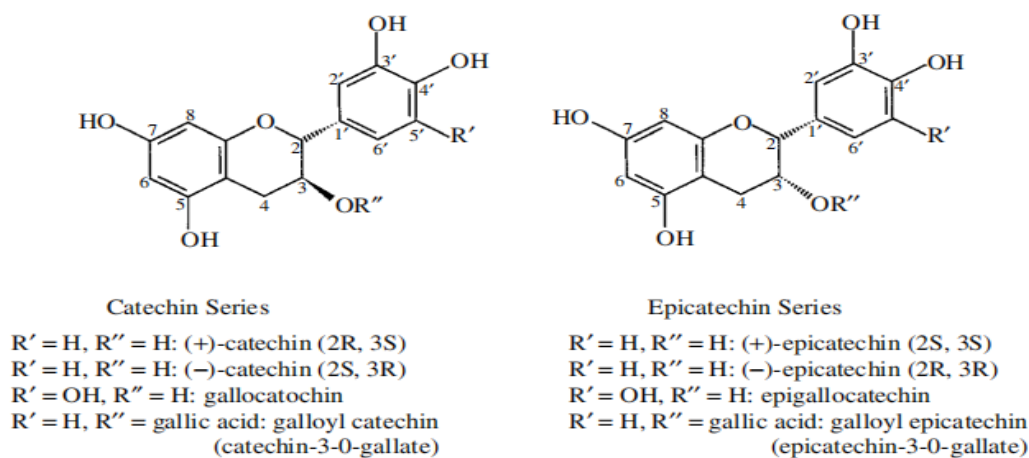
Οι ταννίνες των σταφυλιών και των οίνων είναι φαινολικές ενώσεις με μεγάλο μοριακό βάρος και παράγονται από τον πολυμερισμό στοιχειακών μορίων με φαινολικές λειτουργίες (Ribereau-Gayon et al., 2006). Η σημαντικότερη ιδιότητα των ταννινών έγκειται στο γεγονός ότι μπορούν και ενώνονται με τις πρωτεΐνες και άλλα πολυμερή όπως τους πολυσακχαρίτες. Έτσι, η ικανότητα τους να ενώνονται με τις γλυκοπρωτεΐνες του σάλιου και να τις καταβυθίζουν τους δίνει τη δυνατότητα να επεμβαίνουν στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των οίνων δημιουργώντας την αίσθηση του στυφού. Επίσης οι ταννίνες ενώνονται με τις ανθοκυάνες των νεαρών ερυθρών οίνων ενισχύοντας έτσι την πικρή γεύση στο στόμα (Ribereau-Gayon et al., 2006). Η κοινή ιδιότητα των ταννινών να ενώνονται με άλλα πολυμερή πραγματοποιείται είτε μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων είτε με δεσμούς υδρογόνου, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις πραγματοποιείται η δημιουργία ιοντικών ή ομοιοπολικών δεσμών (Κουράκου, 1998). Οι ταννίνες των οίνων χωρίζονται σε δυο κατηγορίες τις συμπυκνωμένες ταννίνες ή αλλιώς ταννίνες κατεχίνης και τις υδρολύσιμες ταννίνες, δηλαδή τις ταννίνες του γαλλικού οξέος (Ribereau-Gayon et al., 2006).

Συμπυκνωμένες ταννίνες

Οι συμπυκνωμένες ταννίνες των σταφυλιών και των οίνων αποτελούν πολυμερή των φλαβαν-3-ολών (κατεχινών), των οποίων η βασική δομική μονάδα είναι η (+)-κατεχίνη και η (-)-επικατεχίνη (Ribereau-Gayon et al., 2006) (Εικόνα 8). Οι ταννίνες του σταφυλιού κατηγοριοποιούνται σε διαφορετικές κατηγορίες ανάλογα με το βαθμό πολυμερισμού τους. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει τις ταννίνες που εντοπίζονται στους φλοιούς των ραγών, η δεύτερη αφορά αυτές των βοστρύχων και η τρίτη αυτές των γιγάρτων (Ribereau-Gayon et al., 2006). Αυτές που βρίσκονται στους φλοιούς χαρακτηρίζονται από πιο πολύπλοκες δομές και με μεγαλύτερο βαθμό πολυμερισμού από αυτές των γιγάρτων, οι οποίες είναι προκυανιδίνες με μικρό βαθμό πολυμερισμού και χαρακτηρίζονται για την έντονη στυπτικότητα τους (Cheynier, 2006). Παράλληλα, οι ταννίνες του φλοιού είναι πλούσιες σε επιγαλλοκατεχίνες, σε αντίθεση με αυτές των γιγάρτων που εμφανίζουν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις γαλλικού εστέρα της επικατεχίνης (Cheynier, 2006). Στους οίνους εκχυλίζονται κατά την παραμονή του γλεύκους με τα στέμφυλα (Ribereau-Gayon et al., 2006). Αρχικά, οι μονομοριακές προκυανιδίνες οξειδώνονται και ενώνονται με άλλα μόρια με αποτέλεσμα τη δημιουργία ταννινών μικρού μοριακού βάρους, κίτρινου χρώματος και έντονα πικρής και στυφής γεύσης. Συγκεκριμένα η πικρή γεύση των οίνων οφείλεται κυρίως στα μονομερή των ταννινών ενώ όσο αυξάνεται ο βαθμός πολυμερισμού τους συμμετέχουν λιγότερο στη γεύση του πικρού και περισσότερο στην αίσθηση του στυφού στο στόμα (συμπυκνωμένες ταννίνες) (Ribereau-Gayon et al., 2006).

Η περιεκτικότητα ενός ερυθρού οίνου σε συμπυκνωμένες ταννίνες εξαρτάται από την ποικιλία και τις διάφορες οινοποιητικές τεχνικές που εφαρμόζονται στο οινοποιείο, κυρίως από τη διαβροχή και την εκχύλιση (Ribereau-Gayon et al., 2006). Επομένως οι τιμές των συγκεντρώσεων τους μπορεί να κυμανθούν από 1 έως 4 g/L. Για τους λευκούς οίνους, οι συγκεντρώσεις τους κυρίως επηρεάζονται από την ένταση της απολάσπωσης και κυμαίνονται από 100 mg/L στους οίνους που απολασπώνουν

με τον σύνηθες τρόπο, έως και 200 με 300 mg/L στους οίνους που η ζύμωση λαμβάνει χώρα παρουσία οινολασπών (Ribereau-Gayon et al., 2006).



Εικόνα 8: Δομή των πρόδρομων φλαβαν-3-ολών των προκυανιδινών και των ταννινών (Ribereau-Gayon et al., 2006).

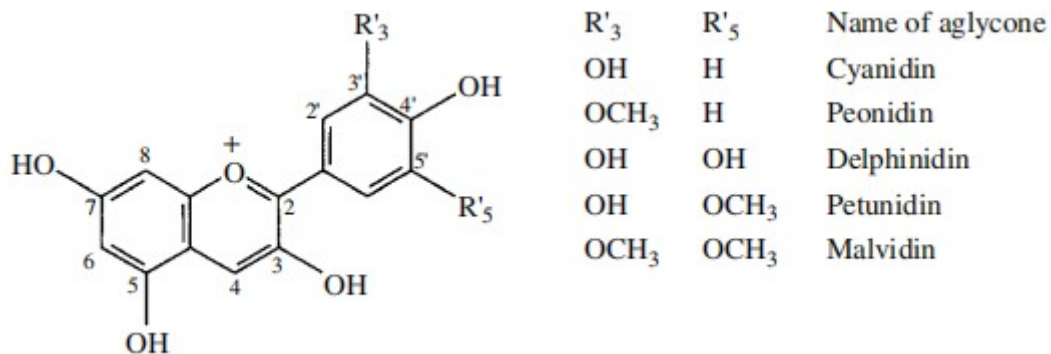
Επιπλέον, ένας σημαντικός ρόλος των συμπυκνωμένων ταννινών είναι ότι συμμετέχουν και διαμορφώνουν το σώμα του κρασιού. Παράλληλα αντιπροσωπεύουν το 30 - 60 % των ολικών φαινολών, με το ποσοστό τους να αυξάνει καθώς αυξάνεται και η ηλικία του οίνου (Κουράκου, 1998). Κατά το στάδιο της παλαίωσης οι προκυανιδίνες σχηματίζουν πολυμερή και έτσι το μοριακό τους βάρος παρουσιάζει αύξηση (Jackson, 2008). Στο σκελετό αυτό μπορεί να ενώνονται και άλλα μόρια όπως πολυσακχαρίτες, πεπτίδια, νερό και τρυγικό οξύ, με αποτέλεσμα να ενισχύεται το γευστικό μαλάκωμα των οίνων και συνεπώς να επέρχεται βελτίωση των οργανοληπτικών τους χαρακτηριστικών.

Υδρολύσιμες ταννίνες

Οι υδρολύσιμες ταννίνες αποτελούνται από ένα μόριο μονοσακχαρίτη (κυρίως γλυκόζης) ή ένα μόριο πολυσακχαρίτη του οποίου κάποια υδροξύλια βρίσκονται εστεροποιημένα με φαινολικά οξέα, όπως είναι το γαλλικό (γαλλοταννίνες) και το ελλαγικό οξύ (ελλαγιταννίνες). Η συγκεκριμένη ομάδα ταννινών δεν ανιχνεύεται στο σταφύλι, αλλά βρίσκεται στο ξύλο δρυός των βαρελιών (Ribereau-Gayon et al., 2006). Οι σημαντικότερες υδρολύσιμες ταννίνες του ξύλου των βαρελιών είναι η βεσκαλαγίνη και η κασταλαγίνη, οι οποίες με μερική υδρόλυση αποδίδουν ενώσεις μικρότερου μοριακού βάρους, τη βισκαλίνη και την κασταλίνη (Ribereau-Gayon et al., 2006). Γενικότερα η σύνθεση των ελλαγικών ταννινών που εκχυλίζονται από το ξύλο του βαρελιού στους οίνους, εξαρτάται από το είδος της βελανιδιάς από όπου προήλθαν (ευρωπαϊκά είδη – αμερικάνικο είδος βελανιδιάς). Η ομάδα των ελλαγικών ταννινών αποτελούν ρυθμιστές οξείδωσης των οίνων καθώς μπορούν να απορροφούν με γρήγορο ρυθμό το εν διαλύσει οξυγόνο, παρεμποδίζοντας έτσι την οξείδωση των φαινολικών ενώσεων (Vivas & Glories, 1996). Επιπλέον, στη κατηγορία των υδρολύσιμων ταννινών υπάγονται και οι οινολιγικές ταννίνες που χρησιμοποιούνται για τη διαύγαση των οίνων (Ribereau-Gayon et al., 2006).

1.7.1.5 Ανθοκυανιδίνες και ανθοκυάνες

Οι ανθοκυάνες αποτελούν τις κόκκινες χρωστικές που βρίσκονται κυρίως στο φλοιό των σταφυλιών, με αποτέλεσμα από εκεί να εκχυλίζονται και να περνάνε στους ερυθρούς οίνους (Ribereau-Gayon et al., 2006). Τα μόρια τους βρίσκονται υπό μορφή ετεροζιτών, αποτελούμενα από ένα άγλυκο τμήμα και ένα ή περισσότερα μόρια σακχάρων, κυρίως γλυκόζης. Το άγλυκο μέρος ονομάζεται ανθοκυανιδίνη και έχει σκελετό C₆-C₃-C₆. Η βασική δομή των ανθοκυανιδινών είναι το κατιόν φλαβυλίου, που περιλαμβάνει δυο βενζολικούς δακτύλιους (A και B) που συνδέονται με έναν ακόρεστο κατιονικό οξυγονωμένο ετεροκυκλικό δακτύλιο πυριλίου. Μέχρι στιγμής, στα σταφύλια και στους οίνους έχουν ταυτοποιηθεί πέντε βασικές ανθοκυανιδίνες: η μαλβιδίνη, η πετουνιδίνη, η πεονιδίνη, η κυανιδίνη και η δελφινιδίνη (Ribereau-Gayon et al., 2006) (Εικόνα 9). Η μαλβιδίνη χαρακτηρίζεται ως η βασική ανθοκυανιδίνη όλων των ποικιλιών καθώς μπορεί να κυμανθεί σε ποσοστό από 50% (ποικιλία Sangiovese) έως και 90% (ποικιλία Grenache) (Ribereau-Gayon et al., 2006). Στην ερευνά τους οι Kallithraka et al. (2006), διαπίστωσαν ότι ανάμεσα στα κρασιά διαφόρων οινοποιήσιμων ερυθρών ποικιλιών οι ελληνικές ποικιλίες: Βερτζαμί, Αγιωργίτικο και Μανδηλαριά παρουσίασαν τα υψηλότερα ποσοστά ολικών ανθοκυανών. Σε αντίθεση με τις γηγενείς ποικιλίες: Κοτσελίνα, Βοϊδομάτης, Κρασάτο και Μαύρο Μεσενικόλα που εμφάνισαν μειωμένη συγκέντρωση ολικών ανθοκυανών (Kallithraka, et al., 2006). Οι ανθοκυάνες στα σταφύλια των λευκών ποικιλιών είτε απουσιάζουν είτε υπάρχουν σε ίχνη (Σουφλερός, 2000).



Εικόνα 9: Οι ανθοκυανιδίνες του σταφυλιού και των οίνων (Ribereau-Gayon et al., 2006).

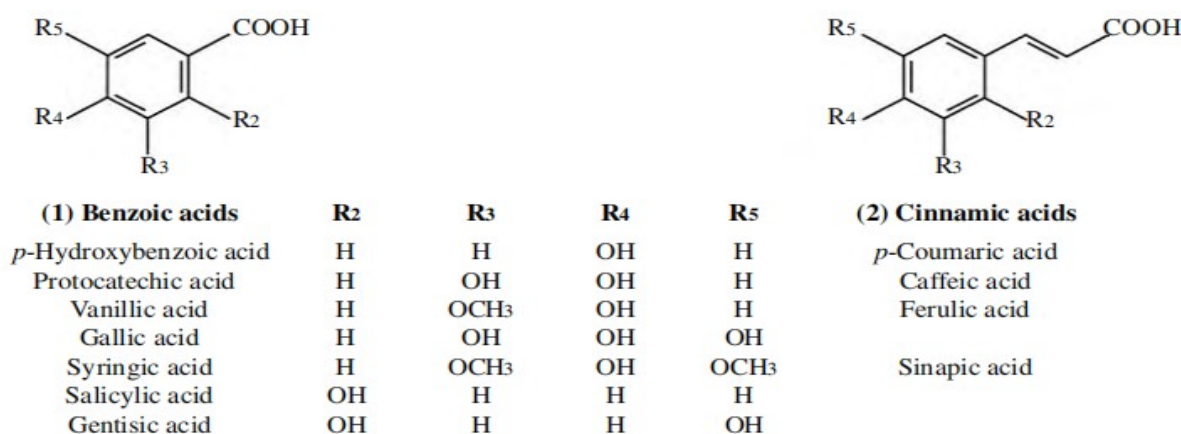
Σε σταφύλια *Vitis vinifera* και στα παραγόμενα κρασιά έχουν αναγνωριστεί μόνο μονογλυκοζυλιομένες μορφές ανθοκυανών, που είναι και οι πιο σταθερές από τις άγλυκες, αλλά και μονογλυκοζυλιομένες ακυλιωμένες μορφές με p-κουμαρικό, καφεϊκό και οξικό οξύ (Ribereau-Gayon et al., 2006). Επιπροσθέτως, το χρώμα των ανθοκυανών εξαρτάται από το pH, τον ελεύθερο θειώδη ανυδρίτη, τη σύσταση των γλευκών και των οίνων, καθώς και από τη μοριακή δομή των ανθοκυανιδινών και την υδροξυλίωση του B-δακτυλίου, η οποία ελέγχει τόσο την απόχρωση όσο και τη σταθερότητα του χρώματος.

1.7.2 Μη φλαβονοειδή φαινολικά συστατικά

Οι μη φλαβονοειδείς φαινόλες στους οίνους προέρχονται είτε από το σταφύλι, από όπου ανιχνεύονται στο φλοιό και στη σάρκα του, είτε από το ξύλο των βαρελιών που χρησιμοποιήθηκαν κατά την ωρίμανση (Ribereau Gayon et al., 2006). Οι ερυθρές ποικιλίες τις περιέχουν σε μεγαλύτερες ποσότητες από ότι οι λευκές ποικιλίες, με αποτέλεσμα να ισχύει το αντίστοιχο και για τους παραγόμενους οίνους τους (Ribereau-Gayon et al., 2006). Κύριοι εκπρόσωποι αυτής της κατηγορίας είναι: α) τα φαινολικά οξέα και συγκεκριμένα τα παράγωγα του βενζοϊκού και κινναμωμικού οξέος και β) τα στυλβένια. (Κουράκου, 1998; Ribereau-Gayon et al., 2006).

1.7.2.1 Φαινολικά οξέα

Τα φαινολικά οξέα είναι τα κυριότερα φαινολικά συστατικά της σάρκας των ραγών του σταφυλιού (Ribereau-Gayon et al., 2000). Οι συγκεντρώσεις τους είναι της τάξης των 100 - 200 mg/L για τους ερυθρούς οίνους και 10 - 20 mg/L για τους λευκούς. Τόσο τα σταφύλια όσο και οι οίνοι περιέχουν παράγωγα του βενζοϊκού (C₆-C₁) και του κινναμωμικού οξέος (C₆-C₃) (Εικόνα 10) (Ribereau-Gayon et al., 2006). Τα βενζοϊκά οξέα, όπως είναι το γαλλικό οξύ, στο σταφύλι βρίσκονται συνήθως υπό τη μορφή εστέρων των φλαβανολών αλλά και ως εστέρες με σάκχαρα. Αντιθέτως κατά την παλαίωση των οίνων εμφανίζονται με ελεύθερη μορφή. Όσον αφορά τα κινναμωμικά οξέα των σταφυλιών και του γλεύκους βρίσκονται κυρίως εστεροποιημένα με τρυγικό οξύ (p-κουμαροτρυγικό, φερουλοτρυγικό, καφεοτρυγικό), ενώ στο κρασί μικρές ποσότητες μπορεί να υποστούν υδρόλυση και βρίσκονται σε ελεύθερη μορφή.



Εικόνα 10: Φαινολικά οξέα του σταφυλιού και των οίνων (Ribereau-Gayon et al., 2006).

Μια από τις σημαντικότερες λειτουργίες των υδροξυκινναμωμικών οξέων είναι ότι επηρεάζουν τον αρωματικό χαρακτήρα ορισμένων ερυθρών οίνων, καθώς αποτελούν πρόδρομες ενώσεις των πτητικών φαινολών οι οποίες παράγονται από την δράση ορισμένων ζυμομυκήτων του γένους

Brettanomyces/ Dekkera, όπως είναι οι αιθύλ-φαινόλες (οσμή δέρματος ζώου), βινύλ-φαινόλες και αιθύλ-γουαϊακόλες (Ribereau-Gayon et al., 2006). Σε λευκά κρασιά έχουν βρεθεί βινύλ-φαινόλες και βινύλ-γουαϊακόλες οι οποίες διαπιστώθηκε ότι προέρχονται από τη διάσπαση του p-κουμαρικού και του φερουλικού οξέος (Chatonnet et al., 1995).

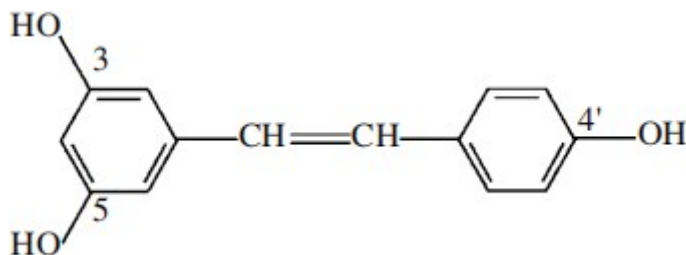
Σε επόμενο θέμα που αφορά τα κρασιά που ωριμάζουν μέσα σε καινούργια δρύινα βαρέλια, έχει διαπιστωθεί ότι εμφανίζουν μια ποικιλία αρωματικών οσμών καπνιστού, τοστ και καμένου η οποία οφείλεται στις ακόλουθες ενώσεις: γουαϊακόλη, μεθυλ-γουαϊακόλη, προπυλ-γουαϊακόλη, ισοευγενόλη, συριγγόλη, μεθυλ-συριγγόλη (Ribereau-Gayon et al., 2006). Οι ενώσεις αυτές εμφανίζονται από τη διάσπαση των λιγνινών στο στάδιο της εφαρμογής του καψίματος του ξύλου των βαρελιών που εφαρμόζεται για κατασκευή τους (Ribereau-Gayon et al., 2006). Επιπλέον στους οίνους εμφανίζονται κάποια βενζοϊκά οξέα, όπως είναι το γαλλικό οξύ, τα οποία αποτελούν βασικά συστατικά των υδρολύσιμων ταννινών του ξύλου των βαρελιών (γαλλοταννίνες και ελλαγιταννίνες). Επομένως, οι υδρολύσιμες ταννίνες ανιχνεύονται μόνο στους οίνους που έχουν παλαιωθεί σε δρύινο βαρέλι (Ribereau-Gayon et al., 2006). Παράλληλα, από το ξύλο του βαρελιού της δρυός κατά την παλαίωση εκχυλίζονται και διάφορα πτητικά κινναμο-αλδεϋδικά και βενζο-αλδεϋδικά παράγωγα, όπως είναι η βανιλίνη και η σιναπαλδεϋδη, ενώ ακόμα εκχυλίζονται και μικρές ποσότητες άλλων φαινολικών ενώσεων όπως είναι οι κουμαρίνες, η εσκουλίνη και η σκοπολίνη. Οι κουμαρίνες είναι παράγωγα των κινναμωμικών οξέων και ακόμη και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις επηρεάζουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των ερυθρών παλαιωμένων οίνων (Ribereau-Gayon et al., 2006).

Επιπλέον, στη κατηγορία των μη φλαβονοειδών φαινολικών συστατικών υπαγεται και η τυροσόλη (Ribereau-Gayon & Sapis, 1965), η οποία παράγεται από το μεταβολισμό των ζυμομυκήτων. Η τυροσόλη απαντάται τόσο σε κόκκινους όσο και σε λευκούς οίνους σε συγκεντρώσεις 20-30 mg/L (Ribereau-Gayon et al., 2006). Η ένωση σχηματίζεται κατά την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης από τη τυροσίνη (p-hydroxyphenylalanine) (Ribereau-Gayon et al., 2006).

1.7.2.2 Στυλβένια

Μια επιπλέον ομάδα ενώσεων που υπάγεται στα μη φλαβονοειδή φαινολικά συστατικά είναι τα στυλβένια. Τα στυλβένια ανιχνεύονται στα σταφύλια, στους οίνους αλλά και στο ξύλο της βελανιδιάς των βαρελιών. Σε αυτά συγκαταλέγεται η ρεσβερατρόλη (3,5,4'-τριυδροξυστυλβένιο) (Εικόνα 11), μια φυτοαλεξίνη η οποία βρίσκεται στους φλοιούς των σταφυλιών από τα οποία εκχυλίζεται κατά την αλκοολική ζύμωση και περνάει στους οίνους (Jeandet et al., 1995). Η οينوποιητική διαδικασία που εφαρμόζεται για την παραγωγή των ερυθρών οίνων (παραμονή του χυμού με τους φλοιούς και τα στέμφυλα), τους επιτρέπει να έχουν στη διάθεση τους τη ρεσβερατρόλη σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, σε σχέση με τους λευκούς. Στο ίδιο συμπέρασμα έχουν καταλήξει πολλές έρευνες με τη χρήση της HPLC (Siemann & Creasy, 1992; Lamuela-Raventos and Waterhouse, 1993; Pezet et al., 1994) και GC-MS (Jeandet et al., 1993; Goldberg et al., 1993; Soleas et al., 1993). Γενικότερα, η συγκέντρωση της στα κρασιά είναι χαμηλή και κυμαίνεται από 0,5 έως 10 mg/L στους ερυθρούς οίνους (Jeandet et al., 1995). Έρευνες έχουν δείξει ότι εμπλέκεται σε μηχανισμούς άμυνας των φυτών ενάντια σε μυκητολογικές προσβολές, καθώς

μπορεί να παραχθεί στη ράγα ως απόκριση στη μυκητολογική λοίμωξη ή στο αβιοτικό στρες (Langcake, 1981; Jeandet et al., 1995). Το 1993 ερευνητές διαπίστωσαν την παρουσία του ισομερούς cis-ρεσβερατρόλης στο κρασί (Jeandet et al., 1993). Σημειώνεται ότι πολλές είναι οι έρευνες που έχουν διαπιστώσει ότι η ρεσβερατρόλη αποδίδει πληθώρα ευεργετικών ιδιοτήτων στην υγεία του ανθρώπινου οργανισμού (Seigneur et al., 1990; Dell'Agli et al., 2004; Ribéreau-Gayon et al., 2006; Nikfardjam et al., 2006). Επίσης, ερευνητές μελέτησαν την περιεκτικότητα της trans-ρεσβερατρόλης ανάμεσα σε 29 ερυθρούς οίνους ελληνικών ποικιλιών με Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης και διαπίστωσαν ότι η ποικιλία Μαντηλαριά ήταν εκείνη με την υψηλότερη περιεκτικότητα σε trans-ρεσβερατρόλη (Kallithraka et al., 2001).



Εικόνα 11: Ρεσβερατρόλη (3,5,4'-τριυδροξυστιλβένιο) (Ribereau-Gayon et al., 2006)

2. Η οξείδωση των οίνων

Η οξείδωση είναι η διαδικασία με την οποία ένα ηλεκτρόνιο αφαιρείται από ένα άτομο ή μια ομάδα ατόμων μέσω αντιδράσεων που μπορεί είτε να περιλαμβάνουν την προσθήκη οξυγόνου ή την απώλεια υδρογόνου (Waterhouse & Laurie, 2006). Η μέγιστη διαλυτότητα του οξυγόνου στο κρασί επηρεάζεται από την περιεκτικότητα του σε αιθανόλη και σε στερεά σωματίδια, κυρίως όμως εξαρτάται από τη θερμοκρασία (Waterhouse & Laurie, 2006). Έχουν αναφερθεί τιμές διαλυτότητας οξυγόνου της τάξης των 8,6 mg/L σε κορεσμένο με αέρα οίνο, σε θερμοκρασία δωματίου και πίεση ίση με την ατμοσφαιρική (Singleton, 1987). Η οξείδωση του κρασιού αρχικά περιλαμβάνει την ενεργοποίηση του οξυγόνου, το οποίο στη συνέχεια θα σχηματίσει νέα πιο δραστικά παράγωγα όπως είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) και οι ρίζες υδροξυλίου (\cdot OH), δημιουργώντας έτσι μια κλιμακωτή σκάλα παραγωγής ελεύθερων ριζών με ενδιάμεσες οξειδωτικές αντιδράσεις (Waterhouse & Laurie, 2006). Το κυριότερο υπόστρωμα οξείδωσης στο κρασί αποτελούν οι πολυφαινόλες, οι οποίες αντιδρούν με τις σχηματισθείσες ελεύθερες ρίζες και μετατρέπονται σε κινόνες. Οι κινόνες με την σειρά τους πολυμερίζονται και παράγουν ενώσεις καστανού χρώματος (browning). Οι αντιδράσεις οξείδωσης - καστανώσης μπορεί να είναι ενζυματικές (Nagel & Graber, 1988) δηλαδή να οφείλονται στη καταλυτική δράση των ενζύμων, ή μη ενζυματικές (Cilliers & Singleton, 1990), δηλαδή να πραγματοποιούνται χωρίς ενζυμική κατάλυση.

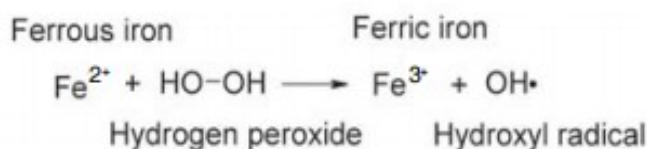
Από το σπάσιμο των σταφυλιών, την γλυκοποίηση, την οινοποίηση (πιέσεις, μεταγίσεις σε δεξαμενές και βαρέλια κ.α.) αλλά και κατά την αποθήκευση του, το προϊόν υπόκειται σε διαφορετικές οξειδώσεις οι οποίες το αλλοιώνουν χημικά και οργανοληπτικά, υποβαθμίζοντας έτσι την ποιότητα του (Waterhouse & Laurie, 2006). Ωστόσο, η εφαρμογή της αργής και ελεγχόμενης

οξειδωσης στα δρύινα βαρέλια κρατά χαμηλό το επίπεδο οξειδοαναγωγής και μπορεί να προσδώσει πολλά οφέλη σε ένα ευρύ φάσμα (ερυθρών κυρίως) κρασιών, καθώς μέσω του πολυμερισμού των φαινολικών ενώσεων σταθεροποιείται το χρώμα και μειώνεται η στυπτικότητα τους (Jackson, 2008). Επομένως, η κατανόηση των μηχανισμών οξειδωσης είναι πολύ σημαντική, καθώς βοηθά στον αποτελεσματικότερο έλεγχο της ωρίμανσης – γήρανσης των οίνων και συνεπώς στη βελτίωση και καλύτερη διατήρηση της ποιότητάς τους (Waterhouse & Laurie, 2006).

Εξίσου σημαντικός είναι και ο έλεγχος της οξειδωσης κατά την αποθήκευση των οίνων στη φιάλη, ιδιαίτερα των λευκών, όπου η αλλοίωση τους τόσο στο χρώμα, όσο και στη συνολική τους ποιότητα υπονομεύουν την εμπορευσιμότητά τους. Λόγω της χαμηλής περιεκτικότητας των λευκών γλευκών και οίνων σε πολυφαινόλες, η αντιοξειδωτική τους δυνατότητα ελαχιστοποιείται με αποτέλεσμα να υπόκεινται πολύ πιο εύκολα σε οξειδωση σε σχέση με τους ερυθρούς. Στην περίπτωση του γλεύκους η οξειδωση αποτελεί ενζυμικό φαινόμενο, ενώ στην περίπτωση του οίνου η οξειδωση είναι κυρίως μη ενζυματική (χημική οξειδωση). Οι οξειδωτικές διεργασίες, τόσο οι ενζυμικές όσο και οι μη ενζυμικές, διαδραματίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην αλλαγή της φαινολικής σύνθεσης (Kallithraka et al., 2009).

2.1 Η αντίδραση οξειδωσης Fenton

Ο Fenton το 1894 διατύπωσε την ισχυρή οξειδωτική δράση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) υπό την παρουσία αλάτων σιδήρου. Στην αντίδραση Fenton περιγράφεται ότι η καταλυόμενη από μέταλλο, όπως είναι ο Fe^{2+} , μείωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου αποδίδει τις ρίζες υδροξυλίου ($\bullet OH$) (Εικόνα 12).

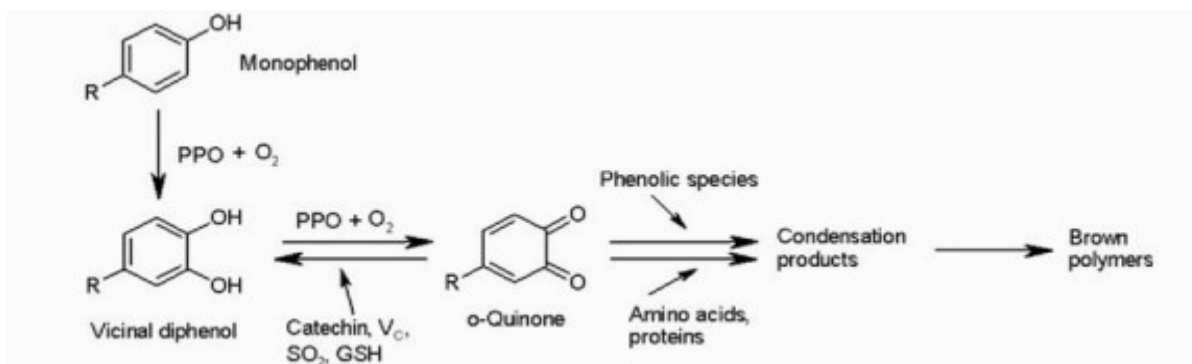


Εικόνα 12: Αντίδραση Fenton (1894) (Waterhouse & Laurie, 2006).

Αργότερα και οι Haber & Weiss (1934) διαπίστωσαν ότι η οξειδωτική δράση οφείλεται στις σχηματισθείσες και εξαιρετικά δραστικές ρίζες υδροξυλίου. Στη συνέχεια και άλλοι ερευνητές αναγνώρισαν ότι αυτό είναι το κλειδί για την κατανόηση της οξειδωσης του κρασιού (Danilewicz, 2003; Boulton, 2003). Ο Danilewicz (2003) επίσης ανέφερε ότι το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) δεν αντιδρά άμεσα ως οξειδωτικός παράγοντας, αλλά σε συνδυασμό με την καταλυτική δράση των μετάλλων σιδήρου δημιουργούν τις ρίζες υδροξυλίου. Η δραστικότητα των μορίων αυτών οφείλεται στην παρουσία ενός ή περισσοτέρων ζευγών ηλεκτρονίων, με αποτέλεσμα να μπορούν να οξειδώσουν σχεδόν όλα τα οργανικά συστατικά του κρασιού. Μια πολύ σημαντική επίδραση των ριζών υδροξυλίου είναι ο σχηματισμός πολλών αλδεϋδών και κετονών από την οξειδωση των αλκοολών του κρασιού (Waterhouse & Laurie, 2006).

2.2 Ενζυμική οξείδωση

Κατά την έκθλιψη και το σπάσιμο των ραγών του σταφυλιού απελευθερώνονται και ενεργοποιούνται τα οξειδωτικά ένζυμα που εμπλέκονται στην οξείδωση των φαινολικών συστατικών του γλεύκους. Τα ένζυμα αυτά ονομάζονται πολυφαινολοξειδάσες (PPO) και παρουσία οξυγόνου κατά τα στάδια της γλυκοποίησης χρησιμοποιούν ως υπόστρωμα απλές δομές φαινολικών συστατικών, όπως είναι τα υδροξυκιναμωμικά οξέα, οι εστέρες του τρυγικού οξέος, trans-καφαρικό, κουταρικό οξύ και τα μονομερή των φλαβαν-3-ολών, μετατρέποντάς τα σε κινόνες (Singleton, 1987; Hornsey, 2007) (Εικόνα 13). Οι ο-κινόνες που παράγονται είναι πολύ ενεργά μόρια και μπορούν να αντιδράσουν με τις σουλφρυδρυλομάδες, τις αμινομάδες, και γενικότερα με τις αμίνες, τα αμινοξέα, τις πρωτεΐνες, την γλουταθειόνη και το θειώδη ανυδρίτη του γλεύκους παράγοντας ένα μεγάλο εύρος πολυμερισμένων προϊόντων (Cheynier et al., 1990). Παράλληλα, οι κινόνες μπορούν να συμμετέχουν και σε άλλες αντιδράσεις οξείδωσης σε συνδυασμό με τα φλαβονοειδή και να συμπυκνωθούν με άλλες φαινολικές ενώσεις προς σχηματισμό πολυμερισμένων προϊόντων προσθήκης (Cheynier et al., 1990). Η αύξηση του αριθμού συμπύκνωσης αυτών των ενώσεων θα οδηγήσει τελικά στο σχηματισμό κίτρινων και καφέ χρωστικών ουσιών στο γλεύκος (Singleton, 1987). Επιπλέον, οι ο-δικινόνες είναι ασταθή μόρια και μπορούν να αναχθούν και να σχηματίσουν ξανά δι-φαινόλες (με γειτονικά υδροξύλια) μέσω της οξείδωσης του ασκορβικού οξέος, των κατεχικών και των προκυανιδινών. Έτσι ενεργοποιείται ο πολυμερισμός και η πρόωμη καθίζηση των ήδη οξειδωμένων φαινολών κατά την αλκοολική ζύμωση (Jackson, 2008). Σημειώνεται ότι μόνο η οξείδωση για τον σχηματισμό των κινονών είναι ενζυμικής φύσεως. Οι περαιτέρω αντιδράσεις που οδηγούν στο οξειδωτικό καφέτιασμα είναι μη ενζυμικής (Oliveira et al., 2011).



Εικόνα 13: Ο μηχανισμός της ενζυματικής οξείδωσης της ο-διφαινόλης. (Hornsey, 2007).

Οι ποικιλίες σταφυλιών μεταξύ τους εμφανίζουν διαφορές όσον αφορά την παρουσία των πολυφαινολοξειδάσων στο σταφύλι. (Jackson, 2008). Πιο συγκεκριμένα, για το ενζυμικό καφέτιασμα, κυρίως των γλευκών και δευτερευόντως των νεαρών οίνων, υπεύθυνα είναι τα εξής ένζυμα: οι τυροσινάσες, κρεζολάση και κατεχολάση (ο-διφαινολοξειδάσες), και η λακκάση (π-διφαινολοξειδάσες). Οι λακκάσες παράγονται από τον φυτοπαθογόνο μύκητα *Botrytis cinerea* και εισέρχονται στο μούστο μόνο από προσβεβλημένα σταφύλια (Claus, 2017). Σημαντική διαφορά

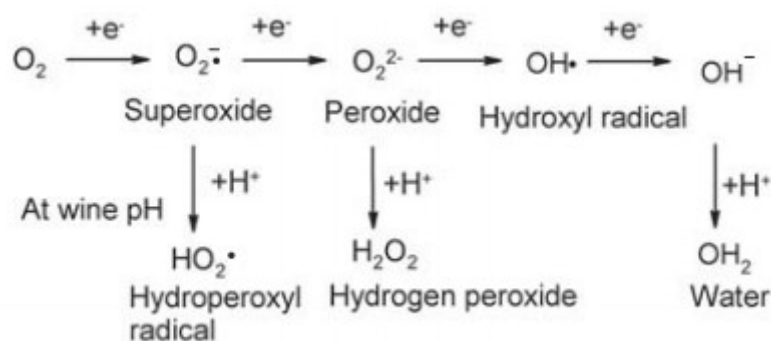
τους είναι ότι η κατεχολάση και η κρεοζολάση οξειδώνουν μόνο ο-διφαινόλες ενώ η λακκάση ο- και π-διφαινόλες (Mayer & Harel, 1979). Οι οξειδάσες αυξάνουν σημαντικά τη ταχύτητα κατανάλωσης του οξυγόνου από τα γλεύκη, ενώ στο στάδιο αυτό η χημική οξείδωση είναι ουσιαστικά αμελητέα (Ribereau-Gayon et al., 2006). Η αναστολή της δράσης των οξειδασών (εκτός της λακκάσης) μπορεί να επιτευχθεί με την προσθήκη θειώδους ανυδρίτη (Ribereau-Gayon et al., 2006; Oliveira et al., 2011). Επιπλέον, η προσθήκη γλουταθειόνης περιορίζει το οξειδωτικό καφέτιασμα, καθώς μπορεί να δεσμεύει τις κινόνες, περιορίζοντας έτσι τη δράση των οξειδασών (Jackson, 2008). Συνεπώς, το καφέτιασμα εξαρτάται και από τη συγκέντρωση γλουταθειόνης στο γλεύκος (Ribereau-Gayon et al., 2006; Nunez-Delicado et al., 2007). Τέλος, τα οξειδωτικά ένζυμα απομακρύνονται με την απολάσπωση.

Κατά γενικό κανόνα, η δραστηριότητα των πολυφαινολοξειδασών εξαφανίζεται κατά την οινοποίηση και η δράση τους απενεργοποιείται από τη στιγμή που η ζύμωση ολοκληρώνεται (Wissemann & Lee, 1980; Ribereau-Gayon et al., 2006). Επομένως, είναι σαφές ότι η οξείδωση των οίνων αποτελεί μη ενζυμικό φαινόμενο και πραγματοποιείται υπό την παρουσία οξυγόνου μέσω της χημικής οξείδωσης.

2.3 Χημική οξείδωση

Λόγω της μειωμένης ικανότητας του μοριακού οξυγόνου να αντιδρά άμεσα με τα φαινολικά και τα υπόλοιπα οργανικά μόρια στο pH των οίνων [βλ. Κεφ. 2.4], το οξειδωτικό του δυναμικό αξιοποιείται με τη δημιουργία δραστικών μορφών οξυγόνου ROS. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου σηματοδοτούν την εκκίνηση μιας συνεχόμενης αναγωγικής πορείας αντιδράσεων και μεταφοράς ηλεκτρονίων (Waterhouse & Laurie, 2006) (Εικόνα 14). Η πρώτη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου οδηγεί στο σχηματισμό ιόντων υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot -}$), που στο pH του οίνου εντοπίζεται ως ρίζα υπεροξειδίου ($\bullet OOH$). Εδώ σημειώνεται ότι για τη διεκπεραίωση του σταδίου αυτού απαιτείται η παρουσία ενός καταλύτη πιθανώς κάποιου μετάλλου όπως ο δισθενής σίδηρος και ο χαλκός. Τότε η μεταφορά ενός δεύτερου ηλεκτρονίου θα οδηγήσει στο σχηματισμό υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) στο κρασί (Waterhouse & Laurie, 2006). Η επόμενη όμως μείωση ηλεκτρονίου μέσω της αντίδρασης Fenton μεταξύ του υπεροξειδίου του υδρογόνου και των ιόντων σιδήρου, δημιουργεί έναν ακόμα πιο ισχυρό οξειδωτικό παράγοντα από τον προηγούμενο, την ρίζα υδροξυλίου ($\bullet OH$) (Green and Hill, 1984; Boulton, 2003; Danilewicz, 2003; Waterhouse & Laurie, 2006).

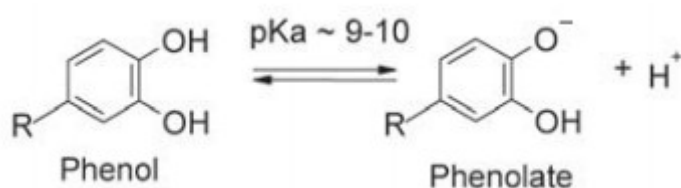
Πολλά προϊόντα του οίνου λειτουργούν ως υποστρώματα, από τα οποία οι ρίζες υδροξυλίου αντλούν ένα H^+ . Αρχικά, οξειδώνουν τα φαινολικά συστατικά, ξεκινώντας μια αλληλουχία οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων (Waterhouse & Laurie, 2006). Η οξείδωση των πολυφαινολών οδηγεί στο σχηματισμό των ο-κινονών, οι οποίες πολυμερίζονται και δημιουργούν ενώσεις κίτρινου - καστανού χρώματος στους οίνους (browning) (Waterhouse & Laurie, 2006).



Εικόνα 14: Αναγωγική πορεία του οξυγόνου (Waterhouse & Laurie, 2006).

2.4 Αλληλεπίδραση φαινολικών συστατικών του οίνου με το οξυγόνο.

Οι Rossi και Singleton (1966) παρατήρησαν ότι οι ποσότητες του οξυγόνου που μπορεί να προσροφήσει ένας οίνος εξαρτώνται από τη συγκέντρωση του σε φαινολικά συστατικά. Οι φαινολικές ενώσεις υπό συνθήκες υψηλού pH μπορούν να αντιδράσουν άμεσα με το οξυγόνο, λόγω του ασθενούς όξινου χαρακτήρα τους. Διαθέτουν τιμές pKa από 9 έως 10, με αποτέλεσμα σε αλκαλικό περιβάλλον να βρίσκονται με τη μορφή φαινολικών ανιόντων, τα οποία αντιδρούν άμεσα με το οξυγόνο (Waterhouse & Laurie, 2006) (Εικόνα 15). Η αφαίρεση ενός ηλεκτρονίου από το φαινολικό ανιόν οδηγεί στο σχηματισμό ημι-κινόνης (Waterhouse & Laurie, 2006). Ωστόσο στο όξινο περιβάλλον του οίνου με τιμές pH 3.0 έως 4.0 (πολύ χαμηλότερες από την pKa των πολυφαινολών) μόνο ένα μικρό κλάσμα φαινολικών συστατικών βρίσκεται με την ιοντική του μορφή, έχοντας ως αποτέλεσμα την εξάλειψη του φαινομένου της άμεσης οξείδωσης. Παρ'όλα αυτά εξακολουθεί να υπάρχει ένα σημαντικό ποσοστό φαινολικών συστατικών στο κρασί, το οποίο συνεχίζει να υφίσταται οξείδωση. Σημειώνεται ότι τη μεγαλύτερη αντίσταση στη οξείδωση παρουσιάζουν οι οίνοι με χαμηλότερο pH.



Εικόνα 15: Ισορροπία μεταξύ φαινόλης και φαινολικών ανιόντων (Waterhouse & Laurie, 2006).

Η αυτοοξείδωση των φαινολικών συστατικών του κρασιού αποτελεί περίπτωση αυτοκατάλυσης (αυξάνεται καθώς η οξείδωση συνεχίζεται) (Singleton, 1989). Στην αρχή το φαινόμενο είναι αργό, αλλά με την αύξηση των πολυμερισμένων μορφών η ταχύτητα του αυξάνει. Επιπλέον, η αυξημένη ταχύτητα οξείδωσης συνδέεται και με την αύξηση της θερμοκρασίας, η οποία επιταχύνει και το οξειδωτικό καφέτιασμα των οίνων. Ειδικότερα όμως, τον βασικότερο ρόλο στην ενεργοποίηση του οξυγόνου φαίνεται να έχει η καταλυτική δράση των μετάλλων σιδήρου ή χαλκού, καθώς και οι ελεύθερες ρίζες που παράγονται κατά την αλληλεπίδρασή τους (Waterhouse & Laurie, 2006).

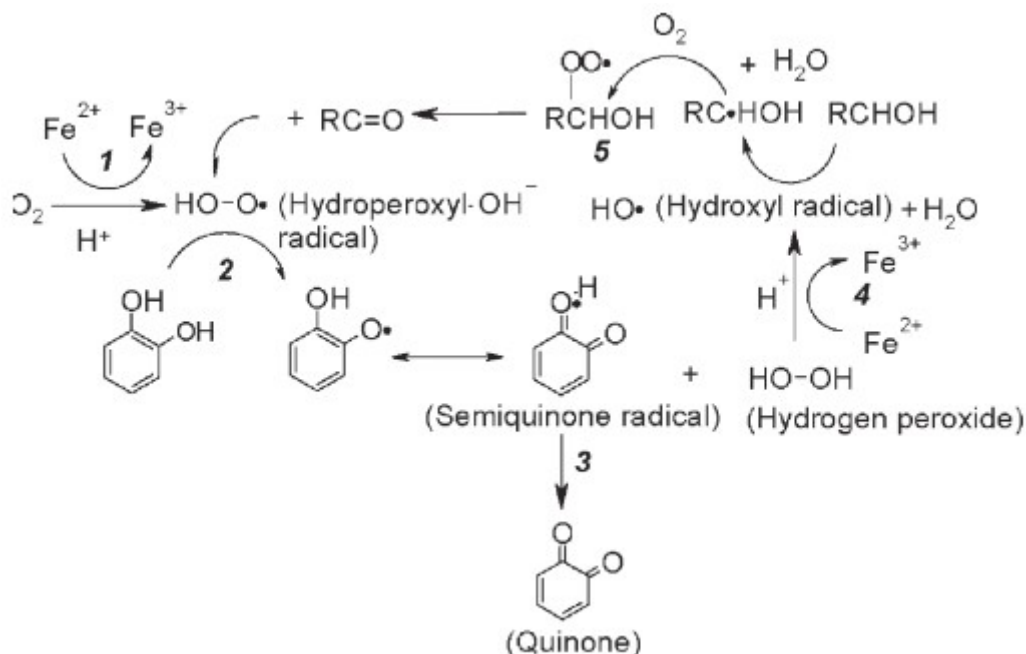
2.5 Ο ρόλος των μετάλλων σιδήρου (Fe) στην οξείδωση των οίνων.

Τα μέταλλα σιδήρου λειτουργούν ως καταλύτες στις αντιδράσεις οξείδωσης των οίνων. Σύμφωνα με τους Fenton και Jackson (1899) ο συνδυασμός υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) και δισθενούς σιδήρου (Fe^{2+}) εμφανίζει ισχυρότερη οξειδωτική ισχύ, σε σχέση με το H_2O_2 μόνο του. Αυτό το επιβεβαίωσαν αργότερα και οι Laurie και Waterhouse (2006). Επιπλέον και ο Ribereau-Gayon το 1933 είχε διαπιστώσει την καταλυτική δράση των μεταλλικών αλάτων σιδήρου και χαλκού στην οξείδωση του κρασιού. Αργότερα και οι Berg και Akiyoshi (1956) παρατήρησαν ότι οι υψηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου (600 mg/L), χαλκού και σιδήρου (προστιθέμενα με τη μορφή αλάτων) επιταχύνουν τις αντιδράσεις οξειδωτικής αμαύρωσης στον οίνο. Παράλληλα οι Cacho et al. (1995), σε μελέτη που αφορούσε την οξείδωση των φαινολικών συστατικών του κόκκινου κρασιού, ανέλυσαν τα διάφορα αποτελέσματα που προέκυψαν έπειτα από προσθήκη σιδήρου, χαλκού και θεικού μαγγανίου και διαπίστωσαν ότι η οξειδωτική διαδικασία εξαρτάται από τις συγκεντρώσεις των μετάλλων αυτών. Επιπροσθέτως, ερευνητές διαπίστωσαν την καταλυτική επίδραση των ιόντων δισθενούς σιδήρου (Fe^{2+}) στην οξείδωση της κατεχίνης σε μοντέλο οίνου (Oszmianski et al., 1996), ενώ σε επόμενη έρευνα οι Makris και Rossiter (2000) παρατήρησαν μια αύξηση στο ρυθμό οξείδωσης της κερκετίνης και της ρουτίνης υπό την καταλυτική δράση του δισθενούς σιδήρου και του χαλκού στους 97 °C. Επίσης, οι Benitez et al. (2002) παρατήρησαν ότι οι υψηλές συγκεντρώσεις του δισθενούς σιδήρου (εκτός δηλαδή των τυπικών συγκεντρώσεων που μπορεί να βρεθούν στο κρασί) σχετίζονται με την αύξηση της οξειδωτικής αμαύρωσης σε λευκό οίνο. Στους οίνους τα μέταλλα σιδήρου μπορούν ακόμη να σχηματίσουν σύμπλοκα με τις πρωτεΐνες, τις πηκτίνες και τα φαινολικά συστατικά. Οι διάφορες αλληλεπιδράσεις που δημιουργούνται μεταξύ ταννινών και μετάλλων φανερώνουν ότι η διαθεσιμότητα των μετάλλων στο κρασί τροποποιείται με την πάροδο της οξείδωσης, αλλά και με τον πολυμερισμό των φαινολών (Kilmartin, 2010).

2.6 Η χημική οξείδωση των φαινολικών συστατικών και τα παραγόμενα προϊόντα της.

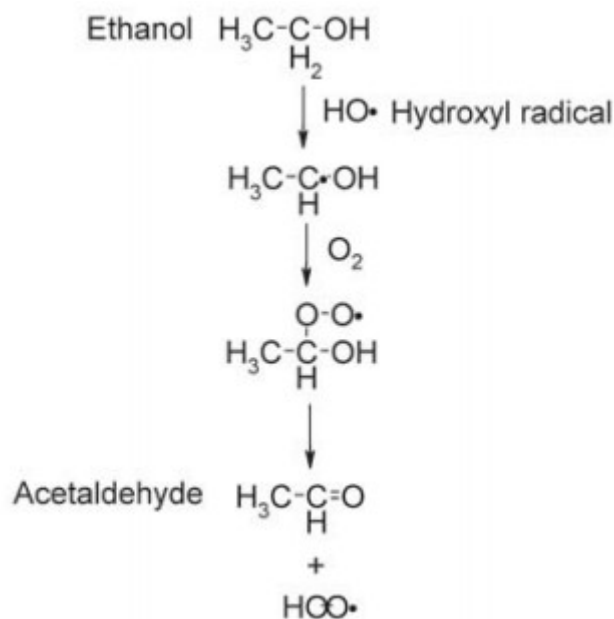
Σχεδόν όλα τα φαινολικά συστατικά του κρασιού αντιδρούν με τη ρίζα υδροξυλίου, η οποία τα χρησιμοποιεί ως υποστρώματα προκειμένου να τους αφαιρέσει ένα H^+ . Οι φαινολικές ενώσεις που μπορούν να υποστούν ευκολότερα οξείδωση στον οίνο είναι το καφεϊκό οξύ, η κατεχίνη, η επικατεχίνη, ο γαλλικός εστέρας της επικατεχίνης, το γαλλικό οξύ, οι προανθοκυανιδίνες, η κερκετίνη και οι υδρολύσιμες ταννίνες διότι οι ημι-κινονικές ρίζες που προκύπτουν από τις αντιδράσεις οξείδωσης μπορούν να σταθεροποιηθούν και με ένα επιπλέον άτομο οξυγόνου (Waterhouse & Laurie, 2006). Αντιθέτως, οι μονοφαινόλες δεν οξειδώνονται τόσο εύκολα (Waterhouse & Laurie, 2006). Γενικότερα, τα ολιγομερή και πολυμερή φαινολικά (προκυανιδίνες, συμπυκνωμένες ταννίνες) αντιδρούν με παρόμοιο τρόπο με τις ρίζες υδροξυλίου, σε σύγκριση με τα μονομερή φαινολικά συστατικά (Lotito et al., 2000).

Σύμφωνα με τους Waterhouse και Laurie (2006), φαίνεται πως στο κρασί η ομάδα της κατεχόλης των φαινολών αντιδρά πρώτη με τη ρίζα υδροξυλίου, σχηματίζοντας μια ημικινονική ρίζα και υπεροξείδιο του υδρογόνου. Η ημικινονική ρίζα με τη σειρά της θα μετατραπεί σε κινόνη, ενώ το υπεροξείδιο του υδρογόνου αντιδρά με το δισθενή σίδηρο αποδίδοντας μια ρίζα υδροξυλίου (Εικόνα 16). Έτσι το οξυγόνο στους οίνους μειώνεται όλο και περισσότερο με κάθε αντίδραση οξείδωσης. Οι παραγόμενες ρίζες υδροξυλίου είναι πολύ δραστικά και μη εκλεκτικά μόρια καθώς μπορούν να οξειδώσουν σχεδόν όλα τα οργανικά συστατικά του κρασιού (Waterhouse & Laurie, 2006).



Εικόνα 16: Αναγωγική κλίμακα οξείδωσης και πρωτογενή προϊόντα οξείδωσης (Waterhouse & Laurie, 2006).

Το πρώτο συστατικό που θα οξειδωθεί είναι η αιθανόλη και στη συνέχεια θα ακολουθήσουν και άλλα προϊόντα που βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις, όπως είναι τα οργανικά οξέα, η γλυκερόλη και τα σάκχαρα. Η οξείδωση της αιθανόλης οδηγεί στο σχηματισμό ακεταλδεύδης (Waterhouse & Laurie, 2006) (Εικόνα 17). Η σχηματισθείσα ακεταλδεύδη μπορεί να αντιδράσει με πολλά από τα φλαβονοειδή συστατικά του οίνου. Παραδείγματος χάρη η αντίδραση συμπύκνωσης με τα φαινολικά συστατικά του κρασιού υπό αναερόβιες συνθήκες όπως είναι αυτές που εκτυλίσσονται κατά την αναγωγική παλαίωση μέσα στη φιάλη (Waterhouse, 2002). Επιπλέον, οι κύριες ενώσεις που έχουν ταυτοποιηθεί ότι παράγονται από την οξείδωση της γλυκερόλης είναι η γλυκεραλδεύδη και η διϋδροξυακετόνη (Laurie & Waterhouse, 2006). Όσον αφορά τα κύρια οξέα του κρασιού, το μηλικό οξύ σχηματίζει πυρουβικό οξύ, ενώ το τρυγικό σχηματίζει πολλά και μικρά μόρια αλδευδών (Fenton, 1894). Στο τελευταίο στάδιο αναγωγής, η ρίζα υδροξυλίου σχηματίζει νερό. Ωστόσο, οι σχηματισθείσες ανθρακικές ρίζες (από την οξείδωση της αιθανόλης) μπορούν να αντιδράσουν με το εναπομείναν οξυγόνο στο κρασί και να αναγεννήσουν νέες ρίζες ROS, οι οποίες μπορούν με τη σειρά τους να οξειδώσουν περισσότερα φαινολικά συστατικά (Waterhouse & Laurie, 2006).



Εικόνα 17: Η οξείδωση της αιθανόλης από τη ρίζα υδροξυλίου και η παραγωγή ακεταλδεΐδης (Waterhouse & Laurie, 2006).

Τα περισσότερα παράγωγα των κινονών αντιδρούν είτε με την ομάδα των θειολών είτε με άλλα φαινολικά συστατικά. Η αντίδραση των κινονών με τα φαινολικά συστατικά βοηθάει στο σχηματισμό φαινολικών πολυμερών (Singleton, 2001; Cheynier et al., 2002; Danilewicz, 2003; Waterhouse & Laurie, 2006).

2.7 Η οξείδωση στους λευκούς οίνους

Οι λευκοί οίνοι κατά την αποθήκευσή τους στη φιάλη μπορεί να υποστούν σημαντικές αλλαγές στο χρώμα (καφέτιασμα) καθώς και στη σύνθεσή τους, με κίνδυνο την επιδείνωση της συνολικής τους ποιότητας και εμπορευσιμότητας. Παρ'όλα αυτά μερικά λευκά κρασιά με το χρόνο μπορεί να εμφανίσουν πολλά οφέλη με την αποθήκευσή τους μέσα στη φιάλη, όπως είναι η ανάπτυξη ενός χαρακτηριστικού αρωματικού μπουκέτου (Marais & Pool, 1980). Κυρίως όμως η αποθήκευση αποτελεί μια περισσότερο σημαντική διαδικασία στη βελτίωση της ποιότητας των ερυθρών οίνων (Somers & Pocock, 1990). Επιπλέον, όπως προαναφέρθηκε, οι οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις στο λευκό κρασί μετά τη διαδικασία της αλκοολικής ζύμωσης είναι κατ'εξοχήν μη ενζυματικές αντιδράσεις αμαύρωσης (Ribéreau-Gayon et al., 2000). Ειδικότερα το οξειδωτικό καφέτιασμα των λευκών οίνων σχετίζεται περισσότερο με την περιεκτικότητά τους σε φλαβονοειδή συστατικά, παρά με τις συγκεντρώσεις των υδροξυκινναμικών οξέων και των ολικών φαινολικών συστατικών (Singleton, 1987).

Το κύριο υπόστρωμα οξείδωσης στους λευκούς οίνους είναι οι ορθο-διυδροξυφαινόλες, κυρίως η (+)-κατεχίνη, η (-)-επικατεχίνη, το καφεϊκό και το καφταρικό οξύ. Τα συστατικά αυτά μέσω του πολυμερισμού των ορθο-κινονών σχηματίζουν ενώσεις κίτρινου-καφέ χρώματος (browning) (Guyot et al., 1996). Σύμφωνα με τους Rossi και Singleton (1966) οι φαινολικές ενώσεις δεν παρουσιάζουν όλες την ίδια ικανότητα να οξειδωθούν, ούτε όλα τα παραγόμενα προϊόντα τους εμφανίζουν τον

ίδιο καστανό μεταχρωματισμό. Επιπλέον η κάθε ποικιλία παρουσιάζει διαφορές όσον αφορά την ευαισθησία της στο οξειδωτικό καφέτιασμα. Σε έρευνα οι λευκοί οίνοι των ποικιλιών Ροδίτη, Μαλβαζία και Αθήρη παρουσίασαν ανθεκτικότητα στο οξειδωτικό καφέτιασμα, σε αντίθεση με τους οίνους ποικιλίας Chardonnay και Ασύρτικο όπου εμφάνισαν μεγαλύτερη ευαισθησία στην οξείδωση (Salacha et al., 2008). Επιπλέον, σύμφωνα με τα συμπεράσματα των ερευνητών, η δημιουργία του οξειδωτικού καφετιάσματος στους οίνους έδειξε να σχετίζεται περισσότερο με τη συγκέντρωση του συνόλου των φλαβονολών, από εκείνης των ολικών φαινολών (Sioumis et al., 2005; Salacha et al., 2008).

Για τη μελέτη του οξειδωτικού καφετιάσματος αλλά και των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων των λευκών οίνων, οι Singleton και Kramlinga (1976) πρότειναν τη χρήση ενός πειραματικού μοντέλου επιταχυνόμενης αμαύρωσης - οξείδωσης των οίνων. Η μέθοδος περιλάμβανε την επεξεργασία των οίνων με μπεντονίτη με σκοπό την καθίζηση των πρωτεϊνών και των πολυπεπτιδίων. Οι ερευνητές πρότειναν την επώαση του δείγματος με 25 % υπερκείμενο οξυγόνο στους 55 °C για 5 ημέρες και μέτρηση της απορρόφησης στα 420 nm (A_{420nm}) (Singleton & Kramlinga, 1976). Το μοντέλο των Singleton & Kramlinga (1976) χρησιμοποιείται έως και σήμερα ως πρότυπη μέθοδος σε πολλές ερευνητικές μελέτες. Επίσης, οι Sioumis et al. (2005) εφάρμοσαν τη μέθοδο της επιταχυνόμενης αμαύρωσης με μια παραλλαγή από αυτή που περιγράφηκε από τους Singleton & Kramling (1976), προκειμένου να αξιολογήσουν το οξειδωτικό καφέτιασμα σε λευκούς οίνους. Ύστερα στην ερευνητική μελέτη των Kallithraka et al. (2009) εφαρμόστηκε η μέθοδος των Sioumis et al., (2006) σε 11 λευκά κρασιά διαφορετικών ποικιλιών. Με βάση τα συμπεράσματα τους η εφαρμογή της επιταχυνόμενης αμαύρωσης δεν άλλαξε σημαντικά τις συγκεντρώσεις των εστέρων του τρυγικού οξέος ενώ δεν επηρέασε τη συγκέντρωση της (+)-κατεχίνης. Αντίθετα, οι συγκεντρώσεις των υδροξυκιναμωμικών οξέων και του γαλλικού οξέος αυξήθηκαν ενώ η συγκέντρωση της (-)-επικατεχίνης μειώθηκε (Kallithraka et al., 2009). Παράλληλα εξετάστηκε και αλλαγή της φαινολικής σύστασης ορισμένων λευκών οίνων κατά την αποθήκευσή τους για 9 μήνες μέσα στη φιάλη (Kallithraka et al., 2009). Οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι η περιεκτικότητα των περισσότερων φαινολικών συστατικών που μελετήθηκαν μειώνεται με τη πάροδο του χρόνου, με εξαίρεση τα υδροξυκιναμωμικά οξέα όπου η συγκέντρωσή τους παρουσίασε αύξηση μετά τον έκτο μήνα αποθήκευσης μέσα στη φιάλη (Kallithraka et al., 2009). Αντίθετα, οι συγκεντρώσεις των εστέρων του τρυγικού οξέος, του γαλλικού οξέος, της (+)-κατεχίνης και της (-)-επικατεχίνης παρουσίασαν σημαντική μείωση από τον 6 μήνα αποθήκευσης σε φιάλες (Kallithraka et al., 2009).

Σε επόμενη έρευνα διαπιστώθηκε ότι τα λευκά κρασιά κατά την αποθήκευσή τους για 12 μήνες μέσα στη φιάλη παρουσίασαν μείωση στη συγκέντρωση των πολυφαινολών και αλλαγή του χρώματος από ανοιχτό κίτρινο σε κίτρινο-καφέ (Recamales et al., 2006). Επίσης, η αλλαγή του χρώματος ήταν μεγαλύτερη στο κρασί που αποθηκεύτηκε σε καθεστώς μεταβλητών θερμοκρασιών, από αυτό που αποθηκεύτηκε σε σταθερή θερμοκρασία (Recamales et al., 2006). Σημειώνεται ότι μόλις ένα κρασί εμφιαλωθεί, η πρόσβαση σε οξυγόνο πρακτικά τερματίζεται και οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στον οίνο συμβαίνουν υπό αναερόβιες συνθήκες - αναγωγικό περιβάλλον. Παρ'όλα αυτά μια μικρή ποσότητα οξυγόνου εξακολουθεί να εισέρχεται στο κρασί από τους πόρους του φελλού, με αποτέλεσμα οι αργές αντιδράσεις πολυμερισμού και συμπύκνωσης των πολυφαινολών να συνεχίζουν να υφίστανται (Kilmartin, 2010).

2.8 Οι επιπτώσεις της οξείδωσης στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των λευκών οίνων.

Οι οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις και το καφέτιασμα των λευκών οίνων τόσο κατά την οινοποίηση, όσο και κατά την αποθήκευση τους έχουν σημαντική επίδραση στα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά και συνεπώς στη ποιότητά τους, καθώς μπορεί να την υποβαθμίσουν σημαντικά.

2.8.1 Επίδραση στο χρώμα

Το χρώμα των οίνων είναι αποτέλεσμα εκλεκτικής απορρόφησης ορισμένων ακτινοβολιών του ηλιακού φάσματος και η ύπαρξη του συνδέεται στενά με τις φαινολικές ενώσεις (Κοτσερίδης & Προξενιά, 2015). Για τη μέτρηση του χρώματος των λευκών οίνων χρησιμοποιείται η απορρόφηση στα 420 nm (κίτρινο), η οποία βοηθά και στην εκτίμηση του βαθμού οξείδωσής τους. Όσο μεγαλύτερο βαθμό οξείδωσης παρουσιάζει ένας λευκός οίνος, τόσο μεγαλύτερη απορρόφηση εμφανίζει στα 420 nm ($A_{420\text{nm}}$) (Κοτσερίδης & Προξενιά, 2015). Η εφαρμογή του πειράματος επιταχυνόμενης αμαύρωσης σε λευκά κρασιά αυξάνει σημαντικά την απορρόφηση στα 420 nm (Kallithraka et al., 2009). Η ανάπτυξη και η εμφάνιση του καφέ χρώματος οφείλεται κυρίως στην οξείδωση της φλαβανόλης (Salacha et al., 2008). Το οξειδωτικό καφέτιασμα είναι το αποτέλεσμα μιας σύνθετης σειράς αντιδράσεων, όπου η δημιουργία καφέ χρώματος αυξάνει την ένταση ενώ μειώνει τη φωτεινότητα και αυξάνει το δείκτη καστανώσης (browning index) (Singleton & Kramlinga, 1976; Gonzales et al., 1994).

2.8.2 Επίδραση στο άρωμα

Η οξείδωση έχει σημαντική επίδραση στα αρωματικά χαρακτηριστικά των οίνων και σχετίζεται κυρίως με την απώλεια ενώσεων του ποικιλιακού τους αρώματος, όπως είναι η απομάκρυνση των πτητικών ενώσεων που περιέχουν θείο (θειόλες). Επιπλέον, η παρατεταμένη οξείδωση οδηγεί και στην εμφάνιση ενός νέου και χαρακτηριστικού αρώματος οξείδωσης (Chinnici et al., 2013). Βασικός παράγοντας που συμβάλει στο άρωμα των οξειδωμένων κρασιών είναι η ακεταλδεΐδη και τα παράγωγά της. Η ακεταλδεΐδη αποτελεί προϊόν χημικής οξείδωσης της αλκοόλης και προσδίδει στους οίνους τη χαρακτηριστική ελαττωματική οσμή οξείδωσης - οξειδωμένου μήλου. Υψηλότερες συγκεντρώσεις πτητικών αλδευδών έχουν βρεθεί σε οξειδωμένα λευκά αλλά και παλαιωμένα ερυθρά κρασιά, σε σύγκριση με νεαρά λευκά και ερυθρά κρασιά αντίστοιχα (Cullère et al., 2007).

Επιπλέον, το φαινόμενο της οξείδωσης μπορεί να συμβάλει και στην απώλεια των θειολών, οι οποίες έχουν θετική συνεισφορά στο άρωμα του κρασιού. Για παράδειγμα το διμεθυλοσουλφίδιο συμβάλλει στην ενίσχυση των φρουτώδους αρώματος του κρασιού (Segurel et al., 2004; Escudero et al., 2007) ενώ η ένωση 3-μερκαπτοεξανόλη χαρακτηρίζει τα κρασιά Sauvignon blanc μέσω του χαρακτηριστικού αρώματος γκρέιπφρουτ που τους προσδίδει (Roland et al., 2011). Πράγματι, οι

πητικές θειόλες αντιδρούν με τις παραγόμενες ο-κινόνες, ιδιαίτερος με την ομάδα της κατεχόλης (Nikolantonaki et al., 2012). Τα σχηματιζόμενα προϊόντα αυτής της αντίδρασης είναι μη πτητικά και ο σχηματισμός τους συμβάλλει στην απώλεια της έντασης του αρώματος. Η αποτελεσματικότητα της αντίδρασης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ισχύ της πυρηνόφιλης βάσης της θειόλης, την ηλεκτρονιόφιλη δραστηριότητα των κινονών και το ρυθμό οξειδωσης της κατεχόλης (Charles-Bernard et al., 2005; Nikolantonaki et al., 2010; Nikolantonaki, M. et al., 2012). Επίσης, αναμενόμενη είναι και η άμεση οξειδωση των θειολών (μερκαπτάνες) και η δημιουργία δισουλφιδικών ενώσεων (Rauhut et al., 1996; Mestres et al., 2000). Σε παλαιωμένους οίνους έχουν βρεθεί υψηλότερες συγκεντρώσεις διμεθυλ-δισουλφιδίου και διαιθυλο-δισουλφιδίου, αλλά χαμηλότερες συγκεντρώσεις αιθυλ-μερκαπτάνης και 2-μερκαπτοαιθανόλης, τα οποία θεωρήθηκαν ως αποτέλεσμα των διεργασιών οξειδωσης (Fedrizzi et al., 2007). Η απελευθέρωση των μερκαπτανών έχει αναφερθεί ότι προέρχεται από την υδρόλυση των θειοοξικών εστέρων κατά την αποθήκευση στη φιάλη (Rauhut et al., 1996).

Οι οίνοι που παλαιώνουν παρουσία οξυγόνου σε βαρέλια συνθέτουν το οξειδωτικό μπουκέτο, ενώ αυτοί που παλαιώνουν στη φιάλη συνθέτουν το αναγωγικό μπουκέτο. Το οξειδωτικό μπουκέτο, εκτός από το άρωμα που οφείλετε στην παρουσία ακεταλδεϋδης, περιλαμβάνει σε χαμηλές συγκεντρώσεις κάποιες αλδεϋδες με πολύ χαμηλό κατώφλι αντίληψης, οι οποίες προέρχονται από την οξειδωση των ανώτερων αλκοολών. Η ανάπτυξη αυτών των νέων και ανεπιθύμητων αρωμάτων από την οξειδωση είναι επίσης ένα σημαντικό ζήτημα που αφορά τους οίνους που υπόκεινται σε παλαίωση (Escudero et al., 2002; Silva Ferreira et al., 2003). Μερικές ενώσεις που έχουν συνδεθεί με το φαινόμενο της οξειδωσης, εμφανίζουν οσμές που θυμίζουν ζωοτροφές και ξύλο όπως είναι η 3-μεθυλθειο-προπιοναλδεϋδη ή η φαινύλακεταλδεϋδη. Ακόμη άλλες ενώσεις είναι η σοτολόνη αλλά και η 1,1,6-τριμεθυλο-1,2-διυδροαφθαλένιο (TDN) που συνδέεται με οσμές κηροζίνης και αποτελεί χαρακτηριστικό συστατικό του αρώματος των παλαιωμένων Riesling (Silva Ferreira et al., 2003). Η συγκέντρωση της σοτολόνης συνδέεται με τη συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου σε εμφιαλωμένο κρασί, επισημαίνοντας έτσι τη σημασία που έχει ο φελλός στη διαπερατότητα σε οξυγόνο (Lavigne et al., 2008). Επίσης, αποτελεί βασικό συστατικό των οξειδωμένων οίνων και οι οσμές που τους προσδίδει θυμίζουν κάρυ ή σφένδαμο, ενώ στα λευκά κρασιά μπορεί να υποσκιάσει το ποικιλιακό άρωμα.

Όσον αφορά το άρωμα των λευκών οίνων, η μη ελεγχόμενη έκθεση τους στο οξυγόνο μπορεί να τροποποιήσει ακόμα και να ελαττώσει τα αρωματικά τους συστατικά. Στη μελέτη τους, οι Silva Ferreira et al. (2002) εφάρμοσαν μια επιταχυνόμενη δοκιμή οξειδωσης σε λευκούς οίνους κορεσμένους με οξυγόνο και τους αποθήκευσαν στη θερμοκρασία των 45°C για 3 μήνες. Τα αποτελέσματά τους φανέρωσαν μείωση στη συγκέντρωση των τερπενίων και των νορισοπρενοειδών (ανθικά αρώματα), ενώ αυξήθηκαν οι συγκεντρώσεις φαινυλ-ακεταλδεϋδης (οσμή μελιού), μεθιονάλης (οσμή ζωοτροφών) και TDN (Silva Ferreira et al., 2002). Ακόμη, οι Blanchard et al. (2004) διαπίστωσαν πως όταν η κατεχίνη οξειδώνεται προς κινόνη αντιδρά με την 3-μερκαπτοεξανόλη, έχοντας ως αποτέλεσμα την απώλεια ενός σημαντικού παράγοντα στο ποικιλιακό φρουτώδες άρωμα των Cabernet Sauvignon, Merlot και Cabernet Franc. Σε επόμενη έρευνα, οι Patrianakou και Roussis (2013) μελέτησαν την επίδραση που φέρει η οξειδωση στα επίπεδα των πτητικών αρωματικών εστέρων σε κρασί ποικιλίας Chardonnay. Στα κρασιά που εμφιαλώθηκαν παρουσία οξυγόνου και αποθηκεύτηκαν για το διάστημα των 9 μηνών οι ερευνητές παρατήρησαν υψηλότερους δείκτες αμαύρωσης και χαμηλότερα επίπεδα διαφόρων εστέρων, όπως

είναι ο οξικός αιθυλεστέρας, ο οξικός ισοαμυλεστέρας, ο εξανοϊκός αιθυλεστέρας, ο οκτανοϊκός αιθυλεστέρας και ο δεκανοϊκός αιθυλεστέρας. Επίσης, η προσθήκη Fe (II) και H₂O₂ παρουσία οξυγόνου οδήγησε στην εμφάνιση ακόμη υψηλότερου δείκτη καστανώσης και χαμηλότερα επίπεδα πτητικών εστέρων με την αποθήκευση του λευκού οίνου έως και 40 ημέρες. Με βάση τα αποτελέσματα τους οι ερευνητές επισήμαναν ότι κατά την αποθήκευση του κρασιού θα πρέπει να λαμβάνετε υπόψη η μείωση των αρωματικών εστέρων μέσω του φαινομένου της οξειδωτικής (Patrianakou & Roussis, 2013). Στο σημείο αυτό σημειώνεται ότι η μείωση των εστέρων έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της φρεσκάδας και τη μείωση του φρουτώδους αρώματος των οίνων. Επίσης η συγκέντρωση των εστέρων στο κρασί μεταβάλλεται κατά την παλαίωση και κατά την αποθήκευση του οίνου λόγω αντιδράσεων υδρόλυσης (σε οξέα και αλκοόλες), αλλά και λόγω εστεροποίησης (από οξέα και αλκοόλες) (Ramey & Ough, 1980). Ακόμη, κι άλλοι ερευνητές στις μελέτες τους κατέγραψαν μείωση των εστέρων μέσω του φαινομένου της οξειδωτικής κατά την αποθήκευση των οίνων (Ferreira et al., 1997; Roussis et al., 2005). Παράλληλα και σε άλλες μελέτες παρατηρήθηκε μείωση των πτητικών εστέρων, κυρίως των αιθυλ-εστέρων, αλλά και μείωση στη συγκέντρωση των τερπενίων (Lambropoulos & Roussis, 2007; Papadopoulou & Roussis, 2008).

2.9 Αντιοξειδωτική δράση φαινολικών συστατικών

Τα φαινολικά συστατικά διαθέτουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες καθώς μπορούν να τερματίσουν τη δράση των ελεύθερων ριζών, ελαχιστοποιώντας έτσι τις βλάβες στα κύτταρα που προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες (Villano et al., 2005). Ο όρος 'ελεύθερη ρίζα' (free radical) εκφράζει κάθε άτομο ή μόριο που έχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική του στιβάδα. Οι φαινολικές ενώσεις εντάσσονται στην κατηγορία των φυσικών αντιοξειδωτικών. Τα φαινολικά συστατικά με τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες εμπλέκονται στις αντιδράσεις οξειδωτικής διαφόρων μορίων, δίνοντας κάθε φορά ένα άτομο υδρογόνου (H⁺) στις ελεύθερες ρίζες. Τα προϊόντα των αντιδράσεων αυτών είναι σχετικά σταθερά, εμποδίζοντας έτσι την οξειδωτική άλλων συστατικών. Παράλληλα οι φαινολικές ενώσεις αντιδρούν με τις εναπομείνουσες ελεύθερες ρίζες, τερματίζοντας έτσι τον πολλαπλασιασμό τους.

Η αντιοξειδωτική δράση των φαινολών εξαρτάται από την χημική τους δομή, και κυρίως από την ικανότητά τους να μπορούν να δώσουν ένα άτομο υδρογόνου ή ένα ηλεκτρόνιο. Ο Letan (1966) ανέφερε ότι οι 3,5-διυδροξυ και οι 3',4'-διυδροξυ υποκαταστάτες, ο 2,3 διπλός δεσμός και η 4-κετο ομάδα απονέμουν στα φλαβονοειδή φαινολικά συστατικά τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες. Η ένωση της φαινόλης από μόνη της έχει ανενεργή αντιοξειδωτική δράση, αλλά τα όρθο- και παρά-δифαινολικά διαθέτουν μια αντιοξειδωτική ικανότητα η οποία αυξάνεται μέσω της αντικατάστασης με αιθυλ- ή n-βουτυλ- ομάδες ατόμων (Shahidi et al., 1992). Στην κατηγορία των πιο ισχυρών αντιοξειδωτικών εντάσσονται οι φλαβονοειδείς ενώσεις. Οι φλαβονοειδείς αγλυκόνες (ανθοκυανιδίνες) εμφανίζουν μια πιο ισχυρή αντιοξειδωτική δράση από τους αντίστοιχους γλυκοζίτες τους (Ratty & Das, 1988). Σε μελέτη τους, οι Ratty και Das (1988) διαπίστωσαν ότι το μόριο του φλαβονοειδούς παρουσιάζει ισχυρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα εάν στη δομή του εμφανίζει:

α) Πολυυδροξυλιωμένους υποκαταστάτες στον δακτύλιο Α και Β της δομής του.

β) Έναν 2,3- διπλό δεσμό σε συζυγία με τη 4-κετονομάδα του δακτυλίου C.

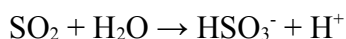
γ) Έναν ελεύθερο 3-υδροξυ υποκαταστάτη και απαραίτητως μια 4-κετονομάδα.

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των οίνων εξαρχής θεωρήθηκε ότι σχετίζεται με την παρουσία των φλαβονοειδών φαινολικών ουσιών σε αυτούς, λόγω του ότι μπορούν να λειτουργήσουν ως τερματιστές των ελεύθερων ριζών (Benítez et al., 2002a).

2.10 Αντιοξειδωτικοί παράγοντες των οίνων

2.10.1 Θειώδης ανυδρίτης

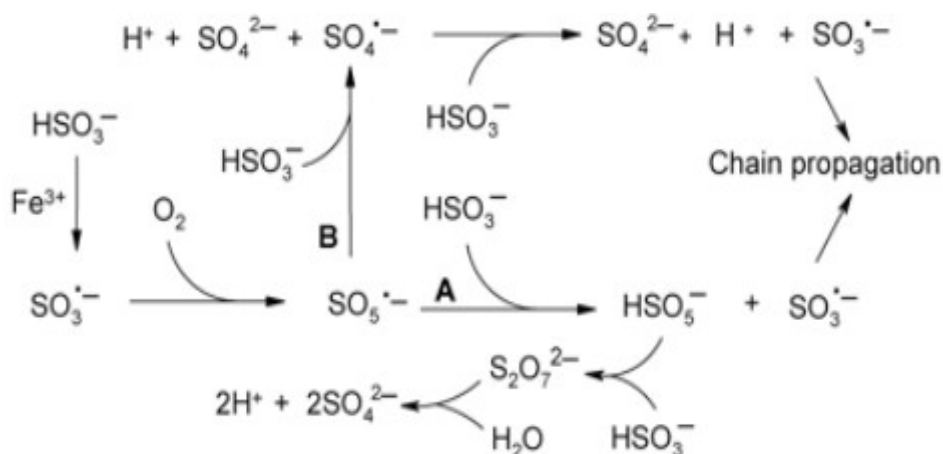
Οι Laszlo et al. (1978) παρατήρησαν τη συσχέτιση που αναπτύχθηκε μεταξύ της οξείδωσης του οίνου στη φιάλη και της συγκέντρωσης του διοξειδίου του θείου (SO₂). Το διοξείδιο του θείου είναι το κύριο συντηρητικό που χρησιμοποιείται στην οινολογία για την πρόληψη των οξειδωτικών αλλοιώσεων. Οι δόσεις καθορίζονται από τις συνθήκες ορθολογικής χρήσης του σε όλα τα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας, ώστε ο οινοποιός να επωφελείται των ιδιοτήτων του χρησιμοποιώντας τη μικρότερη δυνατή ποσότητα (Κοτσερίδης & Προξενιά, 2015). Προκειμένου να επιτευχθεί αυτό είναι απαραίτητη η γνώση των μορφών με τις οποίες ο θειώδης ανυδρίτης απαντά στο γλεύκος και στον οίνο, τη δραστηριότητα της κάθε μορφής και τους παράγοντες που επηρεάζουν την δράση του, όπως είναι το pH, η θερμοκρασία, η συγκέντρωση αλκοόλης και οι ουσίες που τον αδρανοποιούν (Κοτσερίδης & Προξενιά, 2015). Όταν ο θειώδης ανυδρίτης βρεθεί σε διάλυμα με pH 3.0 – 4.0 αυτός δίσταται όπως φαίνεται στη παρακάτω αντίδραση (Αντίδραση 3). Το SO₂ είναι ο θειώδης ανυδρίτης που παραμένει διαλυμένος ως μοριακός και το HSO₃⁻ είναι τα ανιόντα του εξουδετερωμένου θειώδους οξέος. Η διάσταση εξαρτάται από το pH και από την θερμοκρασία (Κοτσερίδης & Προξενιά, 2015). Το άθροισμα αυτών των δύο μορφών αποτελεί τον ελεύθερο θειώδη ανυδρίτη. Τα ιόντα του ελεύθερου θειώδους είναι και η πιο δραστική μορφή έναντι των αντιδράσεων οξείδωσης (αναγωγική ικανότητα HSO₃⁻ > SO₂).



Αντίδραση 3: Διάσταση του θειώδους ανυδρίτη.

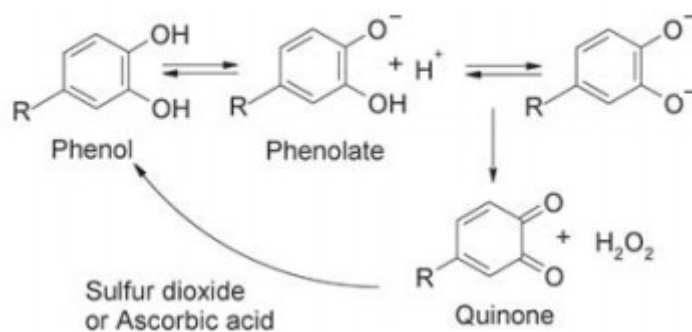
Η χρήση του ασκεί άμεση αντιοξειδωτική προστασία, καθώς οξειδώνεται ο ίδιος και συνεπώς προφυλάσσει τα ευοξειδωτα συστατικά του οίνου (όπως τα φαινολικά), αλλά και έμμεση εφόσον μπορεί να απενεργοποιεί τις οξειδάσες που καταλύουν τις ενζυμικές οξειδώσεις των γλευκών. Ωστόσο, με την πάροδο του χρόνου η αντιοξειδωτική του δράση μειώνεται, γι' αυτό και ένα από τα μειονεκτήματά του είναι ότι απαιτούνται μεγάλες ποσότητες SO₂ ώστε υπάρξει αποτέλεσμα και να εξακολουθεί να είναι ενεργός. Η δράση του αμβλύνεται είτε μέσω της οξείδωσης του με το σχηματισμό θειικών ιόντων, είτε μέσω της δέσμευσης του από τα διάφορα συστατικά του οίνου. Ο δεσμευμένος θειώδης ανυδρίτης δε διαθέτει αντιοξειδωτικές ιδιότητες.

Αρχικά, οι ερευνητές μελέτησαν το ρόλο του SO₂ ως αναστολέα της δράσης των πολυφαινολοξειδασών (Singleton et al., 1985). Ο Danilewicz (2003; 2007) διαπίστωσε ότι ένας από τους πιο σημαντικούς ρόλους του SO₂ είναι ότι αντιδρά ταχύτατα με το υπεροξείδιο του υδρογόνου, παρεμποδίζοντας έτσι τις περαιτέρω αντιδράσεις οξείδωσης στο κρασί. Σε επόμενη μελέτη οι ερευνητές παρατήρησαν ότι η άμεση οξείδωση του θειώδους ανυδρίτη από το οξυγόνο (Εικόνα 18), αύξησε την οξείδωση της αιθανόλης, έχοντας ως αποτέλεσμα την συσσώρευση ακεταλδεΐδης στον οίνο (Danilewicz, 2007; Danilewicz et al., 2008). Επιπλέον, η οξείδωση των πολυφαινολών που περιείχαν την ομάδα της κατεχόλης αύξησε τις απώλειες του SO₂, ενώ η οξείδωση της αιθανόλης στην περίπτωση αυτή ελαχιστοποιήθηκε. Επομένως, βάσει αυτού του φαινομένου, επιβεβαιώνεται ότι ο θειώδης ανυδρίτης δρα ως αναστολέας της οξείδωσης των πολυφαινολών. Παράλληλα, σε επόμενη μελέτη αναφέρεται ότι ένας πολύ σημαντικός ρόλος του SO₂ είναι ότι δεσμεύει την ακεταλδεΐδη, όπως και άλλες αλδεΐδες και κετόνες που έχουν παραχθεί από τη χημική οξείδωση στους οίνους (Boulton, 2003).



Εικόνα 18: Η οξείδωση των ανιόντων θειώδους οξέος και οι αλυσιδωτές αντιδράσεις των ριζών (Danilewicz et al., 2008).

Επιπροσθέτως, η δράση του διοξειδίου του θείου περιλαμβάνει και τη ταχεία μείωση των οξειδωμένων πολυφαινολών (κινόνες) στον οίνο (Cheynier et al., 1989a; 1993). Το διοξείδιο του θείου (πυρηνόφιλο) μπορεί να μειώσει τη συγκέντρωση των κινονών, ενώ παράλληλα μπορεί να μετατρέψει τις κινόνες ξανά σε φαινόλες, ανακυκλώνοντας και εξαλείφοντας έτσι ένα εξαιρετικά δραστικό ηλεκτρονιόφιλο προϊόν οξείδωσης (Εικόνα 19). Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξε και ο Danilewicz (2007), καθώς ανέφερε ότι το SO₂ μπορεί να μετατρέψει τις ο-κινόνες ξανά σε ο-διυδροξυφαινόλες, οι οποίες αντιδρούν με τις υπολειπόμενες ο-κινόνες με σκοπό το σχηματισμό σουλφονικών οξέων. Η ικανότητα αυτή του SO₂ είχε επιβεβαιωθεί και από τη μελέτη των Saucier και Waterhouse (1999), οι οποίοι μελέτησαν τη συνεργιστική δραστηριότητα του SO₂ και της κατεχίνης τόσο με την μέθοδο Folin – Ciocalteu όσο και με την ανάλυση Randox (ABTS), με σκοπό τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων.



Εικόνα 19: Η προστατευτική δράση του διοξειδίου θείου και του ασκορβικού οξέος (Waterhouse & Laurie, 2006).

Όσον αφορά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των οίνων, σε έρευνα μελετήθηκε η απώλεια των πτητικών εστέρων του κρασιού με σκοπό τη μείωση των επιπέδων του ελεύθερου SO₂ που εφαρμόζεται κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης (δόση 35 mg/L αντί 50 mg/L). Οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι η προσθήκη γλουταθειόνης επιβραδύνει τη μείωση αρκετών εστέρων, ενώ το SO₂ παρείχε περιορισμένη προστασία στα πτητικά συστατικά του κρασιού (Roussis et al., 2007). Επίσης οι ερευνητές ανέφεραν ότι η προστασία αρκετών πτητικών συστατικών του κρασιού διασφαλίζεται με την προσθήκη καφεϊκού οξέος, γλουταθειόνης ή και μειγμάτων αυτών των δύο με ταυτόχρονη προσθήκη SO₂. Μια επόμενη μελέτη περιλάμβανε κάποιες επιλεγμένες αρωματικές ενώσεις σε μοντέλο οίνου (model wine), όπως είναι ο οξικός ισοαμυλεστέρας, ο εξανοϊκός αιθυλεστέρας και η λιναλόλη, μελετήθηκε η αντιοξειδωτική προστασία με την προσθήκη SO₂ αλλά και με μίγματα προσθηκών γλουταθειόνης με καφεϊκό ή με γαλλικό οξύ σε συγκεντρώσεις παρόμοιες με αυτές του κρασιού (Roussis & Sergianitis, 2008). Οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι οι προσθήκες SO₂ σε υψηλές συγκεντρώσεις προστατεύουν τις πτητικές ενώσεις από την οξείδωση (Roussis & Sergianitis, 2008). Επιπλέον, σε διαφορετική μελέτη, οι ερευνητές συμπέραναν ότι το διοξείδιο του θείου αύξησε την ανασταλτική δράση του καφεϊκού και του γαλλικού οξέος ως προς την απώλεια των αρωματικών πτητικών εστέρων και των τερπενίων που μελέτησαν στα κρασιά (Lambropoulos & Roussis, 2007).

Συχνά το διοξείδιο του θείου χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με το ασκορβικό οξύ ή τη γλουταθειόνη, προκειμένου να μειωθούν οι προστιθέμενες ποσότητες SO₂ κατά την οινοποίηση αλλά και να αποφευχθούν τόσο οι αρνητικές επιπτώσεις στην ποιότητα και στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του κρασιού, όσο και αυτές που έχουν αναφερθεί ως επιβλαβείς για την ανθρώπινη υγεία, όπως είναι τα ασθματικά προβλήματα (Walker, 1985). Γενικότερα οι τελευταίες τάσεις διεθνώς, στοχεύουν ολοένα και περισσότερο στη μείωση των προστιθέμενων ποσοτήτων θειώδη ανυδρίτη στους παραγόμενους οίνους.

2.10.2 Ασκορβικό οξύ

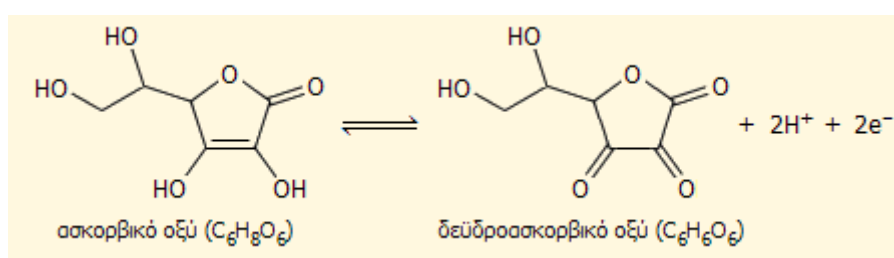
Το L-ασκορβικό οξύ (C₆H₈O₆) αποτελεί ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό και ο ρόλος του είναι ζωτικής σημασίας για την υγεία των ζωικών οργανισμών, ιδιαίτερος του ανθρώπινου. Βιοσυνθετικά,

δημιουργείται στα φυτά απευθείας από την D-γλυκόζη. Η ένωση ανιχνεύεται στα σταφύλια όπως και σε άλλα φρούτα και λαχανικά στη φύση. Ωστόσο στο μούστο η συγκέντρωσή του μειώνεται ταχύτατα, καθώς αυξάνεται η έκθεση στο οξυγόνο (Singleton, 1987).

Ευρύτατα στη βιομηχανία τροφίμων το ασκορβικό οξύ χρησιμοποιείται ως αντιοξειδωτικό - συντηρητικό. Έτσι και στην οινολογία εφαρμόζεται ως πρόσθετο. Στη περίπτωση όπου προστεθεί πριν από την έκθλιψη των σταφυλιών λόγω της αντιοξειδωτικής του δράσης μπορεί να προστατεύσει τα αρωματικά συστατικά από την οξείδωση, συμβάλλοντας έτσι στη διατήρηση του ποικιλιακού αρώματος των παραγόμενων οίνων. Επιπλέον, προστατεύει από τα σιδηρικά θολώματα καθώς ανάγει το Fe^{3+} σε Fe^{2+} , ενώ παράλληλα δε αφήνει τον Fe^{2+} να οξειδωθεί σε Fe^{3+} .

Παράλληλα, πολλές είναι οι μελέτες που έχουν διαπιστώσει μείωση στη συγκέντρωση των ο-κινονών, την οποία απέδωσαν στη προσθήκη ασκορβικού οξέος (Singleton, 1987; Peng et al., 1998; Danilewicz, 2003). Με παρόμοιο τρόπο όπως ο θειώδης ανυδρίτης, το ασκορβικό οξύ έχει την ικανότητα να μετατρέπει τις ο-κινόνες ξανά σε ο-διυδροξυφαινόλες (Waterhouse & Laurie, 2006). Αντίθετα οι Makhotkina και Kilmartin (2009) με βάση τα αποτελέσματά τους ανέφεραν πως δεν σημειώθηκε καμία ένδειξη αλληλεπίδρασης μεταξύ ασκορβικού οξέος και ο-κινονών κατά την παρατήρηση των κυκλικών βολταμογραμμάτων (CV) των πολυφαινόλων του κρασιού, υποδηλώνοντας έτσι ότι το ασκορβικό οξύ έδρασε ως ένα αδύναμο ή αργό αναγωγικό μέσο.

Υπό την παρουσία της καταλυτικής δράσης του δισθενούς μετάλλου σιδήρου το ασκορβικό οξύ ευκόλως οξειδώνεται από το οξυγόνο που υπάρχει στον οίνο, σχηματίζοντας δεϋδροασκορβικό οξύ (DHA) (Danilewicz, 2003) (Εικόνα 20). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την άμεση αφαίρεση του οξυγόνου που είχε απομείνει στο κρασί και δεν είχε απομακρυνθεί από τη δράση του θειώδους ανυδρίτη ή της γλουταθειόνης. Όταν όμως το διαλυμένο οξυγόνο βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στο κρασί, το ασκορβικό οξύ οξειδώνεται παράγοντας υπεροξειδίο του υδρογόνου (όπως οι κατεχόλες) (Bradshaw et al., 2001). Αυτός είναι και ένας από τους λόγους όπου η εφαρμογή του συνίσταται να πραγματοποιείται σε συνδυασμό με την προσθήκη του διοξειδίου του θείου, το οποίο δεσμεύει το παραγόμενο υπεροξειδίο του υδρογόνου. Αντιθέτως, ο SO_2 μπορεί να εφαρμόζεται μόνος του και να αναστείλει αποτελεσματικά το οξειδωτικό καφέτιασμα (Kilmartin, 2010).



Εικόνα 20: Οξειδοαναγωγικό σύστημα ασκορβικού - δεϋδροασκορβικού οξέος (DHA) (Βαλαβανίδης & Ευσταθίου, 2014).

Στους οίνους το ασκορβικό οξύ προστίθεται κυρίως λίγο πριν την εμφιάλωση, λόγω της ικανότητας του να δεσμεύει ταχύτατα το μοριακό οξυγόνο (Bradshaw et al., 2011), αν και το διοξειδίο του θείου, ακόμα και σε αυτή τη περίπτωση, δεν παύει να είναι παρόν προκειμένου να δεσμεύει το υπεροξειδίο του υδρογόνου και το δεϋδροασκορβικό οξύ (DHA) που σχηματίζονται από την οξείδωση του ασκορβικού οξέος. Μετά από μελέτες αποδείχθηκε ότι η προσθήκη ασκορβικού

οξέος σε μοντέλο οίνου που περιείχε αιθανόλη, οδήγησε άμεσα στην παραγωγή ακεταλδεΐδης μέσω του φαινομένου της οξειδωσης. Σύμφωνα με τους ερευνητές το φαινόμενο αυτό θα μπορούσε να επιβραδυνθεί μέσω της προσθήκηςθειώδους ανυδρίτη (Wildenradt & Singleton, 1974). Επιπλέον, σε άλλη μελέτη εξετάστηκε η προσθήκη ασκορβικού οξέος και SO₂ σε αφρώδη κρασιά για το διάστημα των 11 μηνών (Marks & Morris, 1993). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η συχνότητα εμφάνισης του οξειδωτικού καφετίσματος ήταν χαμηλότερη στα κρασιά τα οποία είχε προστεθεί το SO₂. Παράλληλα, τα αποτελέσματα από την προσθήκη ασκορβικού οξέος φανέρωσαν ότι μπορεί να μειώσει το οξειδωτικό καφετίσμα αλλά χωρίς κανένα επιπλέον όφελος σε σχέση με την επεξεργασία με τη χρήση του SO₂. Σε επιπλέον μελέτη με λευκό οίνο που περιείχε κατεχίνη και καφεϊκό οξύ, η προσθήκη ασκορβικού οξέος αρχικά μείωσε το οξειδωτικό καφετίσμα ενώ στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ταχύτατη κατανάλωση του SO₂ και αμαύρωση όταν εφαρμόστηκε η επιταχυνόμενη δοκιμή οξειδωσης σε θερμοκρασία 45 °C (Kilmartin, 2010). Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν σε πείραμα στο οποίο τα κρασιά είχαν αποθηκευτεί σε φιάλες για αρκετούς μήνες έως και 5 χρόνια (Peng et al., 1998). Επίσης, οι Bradshaw et al. (2001) στη μελέτη τους ανέφεραν ότι μετά από κάποιο διάστημα η προσθήκη ασκορβικού οξέος άρχισε να επιταχύνει την οξείδωση της κατεχίνης και συνεπώς την αμαύρωση των οίνων στους 45 °C (Bradshaw et al., 2001).

Έτσι γεννήθηκε το ερώτημα μήπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου, που παράγεται μέσω της οξείδωσης του ασκορβικού οξέος, είναι αυτό που προκαλεί την αμαύρωση. Ωστόσο, σε έρευνα με τη χρήση της HPLC βρέθηκε ότι η προσθήκη H₂O₂ δεν αύξησε την καστανότητα στον ίδιο βαθμό (Kilmartin, 2010). Περαιτέρω μελέτες διαπίστωσαν ότι μετά τη πλήρη οξείδωση του ασκορβικού οξέος, τα κατιόντα ξανθυλίου ήταν υπεύθυνα για την αυξημένη τιμή της απορρόφησης στα 420 nm (Bradshaw et al., 2003). Σε επόμενη μελέτη, οι ερευνητές εξέτασαν την επίδραση της προσθήκης του ασκορβικού οξέος κατά τη παλαίωση των κρασιών Chardonnay και Riesling στη φιάλη για 3 χρόνια. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η χρήση του ασκορβικού οξέος σε κάποιους οίνους δεν επηρέασε καθόλου το άρωμά τους, ενώ σε διαφορετική περίπτωση αυτοί εμφάνισαν τις χαρακτηριστικές ελαττωματικές οσμές οξείδωσης αλλά σε μικρό βαθμό με τη ταυτόχρονη παραμονή των φρουτωδών αρωμάτων (Skouroumounis et al., 2005).

2.10.3 Γλουταθειόνη

Η γλουταθειόνη (GSH) είναι έναθειούχο τριπεπτίδιο ενώ αποτελεί και ένα φυσικό αντιοξειδωτικό, το οποίο περιέχεται και στα σταφύλια (Cheynier et al., 1989b). Η ένωση αυτή συντίθεται ενζυμικά στο σταφύλι από τη συνθετάση της γλουταθειόνης και η συγκέντρωσή της αυξάνεται σε μεγάλο βαθμό στη φάση ταχείας ανάπτυξης της ράγας. Η ανηγμένη μορφή της γλουταθειόνης είναι και η πιο άφθονη ελεύθερη ένωσηθειόλης σε συγκέντρωση στη ράγα κατά τη συγκομιδή. Ωστόσο εφαρμόζεται ως πρόσθετο - αντιοξειδωτικό κατά την οινοποίηση καθώς μέσω της δράσης της παγιδεύει τις ο-κινόνες που παράγονται από την οξείδωση του γλεύκους (Cheynier et al., 1986; 1990; Singleton et al., 1985). Επιπλέον, μέσω της αντίδρασής της με τις ο-κινόνες, έχει βρεθεί ότι συμβάλλει σημαντικά και στο περιορισμό των επιπτώσεων της χημικής οξείδωσης των οίνων (Makhotkina & Kilmartin, 2009).

Το προϊόν που σχηματίζεται από την αντίδραση της γλουταθειόνης και της ο-κινόνης είναι ένας θειοαιθέρας, το 2-S-γλουταθειόνυλο καφταρικό οξύ ή αλλιώς 'Grape Reaction Product' (GRP) (Εικόνα 22). Κατά την ενζυμική οξειδωση η δραστηριότητα της πολυφαινολοξειδάσης (PPO) μετατρέπει τον εστέρα του τρυγικού οξέος (κουταρικό οξύ) σε trans-καφταρικό οξύ, το οποίο στη συνέχεια οξειδώνεται περαιτέρω και υπό την παρουσία γλουταθειόνης μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό του προϊόντος GRP (Singleton et al., 1985). Το trans-καφταρικό οξύ είναι το προϊόν οξείδωσης που μπορεί να αντιδράσει και να παγιδευτεί πιο εύκολα από την γλουταθειόνη, ενώ άλλες φαινόλες όπως η (+)-κατεχίνη ή η κερκετίνη μπορούν επίσης να αντιδράσουν και να σχηματίσουν παράγωγα γλουταθειόνης. Το σχηματιζόμενο GRP είναι μια άχρωμη ένωση και έτσι η ανάπτυξη της αμαύρωσης του γλεύκους περιορίζεται σε μεγάλο βαθμό. Η ικανότητα της γλουταθειόνης να ενώνεται με τις ο-κινόνες είναι προστατευτική για τα λευκά γλεύκη προκειμένου να εξαντληθούν τα υποστρώματα των αντιδράσεων οξείδωσης. Όσο η προστιθέμενη γλουταθειόνη παραμένει διαθέσιμη, ο σχηματισμός της ένωσης GRP εμποδίζει τις ο-κινόνες να συμμετέχουν σε αντιδράσεις πολυμερισμού και συνεπώς στη δημιουργία των καφέ χρωστικών. Επιπλέον η γλουταθειόνη μπορεί από μόνη της να οξειδωθεί και να σχηματιστεί δισουλφίδιο (Singleton et al., 1985).

Για την προστασία του γλεύκους από την οξείδωση απαιτείται η παρουσία ελεύθερης γλουταθειόνης σε υψηλές συγκεντρώσεις (50-100 mg/L) (Kilmartin, 2010). Σε οξειδωμένο γλεύκος σταφυλιών ποικιλίας 'Ντεμπίνα', η προσθήκη γλουταθειόνης βρέθηκε ότι μπορεί να περιορίσει τη μείωση των φαινολικών συστατικών που έχει προκληθεί από την ενζυματική οξείδωση (Vaimakis & Roussis, 1996). Επίσης, οι Vaimakis και Roussis (1996) διαπίστωσαν πως η προσθήκη της οδηγεί σε υψηλότερες συγκεντρώσεις φαινολικών συστατικών με αποτέλεσμα η τάση προς αμαύρωση στους παραγόμενους λευκούς οίνους να ενισχύεται. Επιπλέον οι ερευνητές ανέφεραν πως οι οίνοι που παρήχθησαν από τα οξυγονωμένα γλεύκη στα οποία είχε προστεθεί η γλουταθειόνη, διέθεταν θετικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (φρουτώδες άρωμα, φρεσκάδα), χωρίς την εμφάνιση των χαρακτηριστικών οσμών και γεύσεων που παρουσιάζονται στους οξειδωμένους οίνους. Παράλληλα τα κρασιά που παρήχθησαν από λιγότερο οξυγονωμένα γλεύκη και με την προσθήκη γλουταθειόνης, παρουσίασαν ένα σύνθετο φρουτώδες ποικιλιακό άρωμα και φρεσκάδα με μια πιο ισορροπημένη γεύση και αρωματική επίγευση (Vaimakis & Roussis, 1996). Επίσης και σε επόμενη μελέτη, οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι με την προσθήκη γλουταθειόνης τα αρωματικά χαρακτηριστικά των οίνων κατά κύριο λόγο βελτιώνονται (du Toit et al., 2006).

Οι Badea και Antoce (2015) ανέφεραν ότι ως αντιοξειδωτικό είναι ικανό να διατηρεί τις ενώσεις του ποικιλιακού αρώματος, να περιορίζει την αμαύρωση (καφέτιασμα) και να ελέγχει την ανάπτυξη ελαττωματικών οσμών κατά την διάρκεια της παλαίωσης των οίνων. Ακόμη, όσον αφορά το άρωμα των οίνων, οι Papadopoulou και Roussis (2001) διαπίστωσαν μια απώλεια στη συγκέντρωση των τερπενίων της λιναλόλης και της α-τερπινεόλης σε κρασιά ποικιλίας Μοσχάτο, η οποία αποδείχθηκε ότι αναστέλλεται με την προσθήκη 20 mg/L γλουταθειόνης στους οίνους που διατηρήθηκαν ανοιχτοί στους 20 °C για 3 ημέρες.

Επιπλέον, όσον αφορά τη συγκέντρωση της γλουταθειόνης στο γλεύκος έχει αναφερθεί ότι συνήθως παρουσιάζει ταχύτατη μείωση κατά τη διάρκεια της σύνθλιψης των σταφυλιών λόγω των οξειδοαναγωγικών και των ενζυμικών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα στο στάδιο αυτό (Adams & Liyanage, 1993). Σε επόμενη ερευνητική μελέτη διαπιστώθηκε ότι η συγκέντρωση γλουταθειόνης τόσο στο μούστο όσο και στο παραγόμενο κρασί παρουσιάζει ευαισθησία κατά το

στάδιο των πιέσεων (Maggu et al., 2007). Ακόμη, οι Patel et al. (2010) διαπίστωσαν ότι κατά την διάρκεια των πιέσεων οι συγκεντρώσεις της γλουταθειόνης παρουσίασαν υψηλές τιμές όσο ο χυμός κινούταν ελεύθερα, ενώ αυτές εμφανίστηκαν μειωμένες κατά την εφαρμογή των υψηλών πιέσεων με μια παράλληλη αύξηση του προϊόντος GRP (Patel et al., 2010). Επιπροσθέτως, οι συγκεντρώσεις της συνήθως μειώνονται και κατά το στάδιο της ζύμωσης, παρόλο που μόνο ένα μικρό ποσοστό οξειδωσης μπορεί να πραγματοποιηθεί στο στάδιο αυτό. Το φαινόμενο αυτό αποτελεί ένδειξη ότι τα διάφορα στελέχη ζύμης διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό της γλουταθειόνης (du Toit et al., 2007).

2.10.4 Σελήνιο

Το σελήνιο αποτελεί βασικό και απαραίτητο μικροστοιχείο για την εύρυθμη λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού (Λέτσιου, Σ., 2010). Η πρόσληψη του μέσω της διατροφής μπορεί να είναι είτε σε ανόργανη είτε σε οργανική μορφή (π.χ. σεληνομεθειονίνη) (Barbulescu, I. et al., 2012). Στο κρασί το σελήνιο εμπεριέχεται σε επίπεδο ιχνοστοιχείων (Eschnauer, H. et al., 2019) και γενικότερα οι συγκεντρώσεις του σε αυτό κυμαίνονται σε χαμηλότερες τιμές σε αντίθεση με άλλα τρόφιμα (Witkowska, A. et al., 2006). Ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η συγκέντρωση σεληνίου στα κρασιά ευρωπαϊκής προέλευσης ανέρχεται στα 0,8 έως 2 ng/L (Cvetkovic, J. et al., 2001; Frias, S. et al., 2003) ενώ σε διαφορετική μελέτη οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι η συγκέντρωση σεληνίου είναι υψηλότερη στο κόκκινο κρασί σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα (Witkowska, A. et al., 2006).

Επίσης, η συγκέντρωση σεληνίου στους οίνους εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη συγκέντρωση του στο έδαφος, αλλά και από τη γεωγραφική περιοχή όπου βρίσκεται ο αμπελώνας (Witkowska, A. et al., 2006). Ακόμη, η χημική σύνθεση του σεληνίου στο κρασί μπορεί να αλλάξει κατά το στάδιο της οινοποιητικής διαδικασίας. Σύμφωνα με τον Schrauzer, G. N. (2000) όταν οι ζυμομύκητες βρεθούν υπό κατάλληλες συνθήκες μπορούν να παράξουν βιομάζα με υψηλό πρωτεϊνικό περιεχόμενο και να συσσωρεύσουν μεγάλες ποσότητες ιχνοστοιχείων και κατ'επέκταση σεληνίου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ενσωμάτωση του σεληνίου στις πρωτεΐνες και τη μετατροπή του από την ανόργανη στην οργανική του μορφή, κυρίως με τη μορφή σεληνομεθειονίνης. Σε επόμενη μελέτη οι ερευνητές αναφέρουν ότι η προσθήκη σεληνιάδους νατρίου, κατά το στάδιο της εκθετικής φάσης της ζύμωσης του γλεύκους, αυξάνει την συνολική ποσότητα των πολυφαινολών στο τελικό προϊόν έχοντας ως αποτέλεσμα τη δημιουργία βιολογικών προϊόντων οινοποίησης με υψηλή προστιθέμενη αξία (Barbulescu, I. et al., 2012). Ακόμη πολύ σημαντικό ήταν ότι οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης των ολικών ανθοκυανών και των προστιθέμενων ποσοτήτων του σεληνιάδους νατρίου (Barbulescu, I. et al., 2012).

Επιπλέον, όπως έχει προαναφερθεί, το αντιοξειδωτικό δυναμικό των οίνων συνδέεται άρρηκτα με το φαινολικό τους περιεχόμενο (Simonetti, R., 1997; Minussi, R. C., 2003). Όπως οι φαινολικές ενώσεις έτσι και το σελήνιο διαθέτει αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Barbulescu, I. et al., 2012). Οι Battin, E. E. και Brumaghim, J. L. (2009) αναφέρουν ότι το σελήνιο διαθέτει τρεις διαφορετικούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς για την αποφυγή της οξειδωτικής βλάβης στα κύτταρα. Ο πρώτος

τρόπος περιλαμβάνει τους μηχανισμούς σάρωσης και απομάκρυνσης των ελεύθερων ριζών (ROS). Ο δεύτερος μηχανισμός αφορά την δημιουργία του ενζύμου υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx), το οποίο συμβάλλει στη διάσπαση των ελεύθερων ριζών που δημιουργούνται από το υπεροξείδιο του υδρογόνου, ενώ ο τρίτος αντιοξειδωτικός μηχανισμός περιλαμβάνει τη σύζευξη μεταξύ ενός μετάλλου (π.χ. σιδήρου) και του σεληνίου, αποτρέποντας έτσι την πραγματοποίηση της βασικής αντίδρασης της οξείδωσης (Battin, E. E. & Brumaghim, J. L., 2009).

2.11 Αντιμετώπιση της οξείδωσης των οίνων

Όπως έχει προαναφερθεί οι αντιδράσεις οξείδωσης που λαμβάνουν χώρα, όταν το γλεύκος ή ο οίνος έρθει σε επαφή με το οξυγόνο, είναι ανεπιθύμητες σε οποιοδήποτε στάδιο της παραγωγικής διαδικασίας. Εκδηλώνονται με αλλοίωση του χρώματος (καφέτιασμα) και συνοδεύονται από μεταβολή των οσμών και απώλεια των πτητικών ενώσεων που συνθέτουν την αρωματική παλέτα ενός κρασιού. Το πρόβλημα της οξείδωσης στους λευκούς οίνους πρωτοεμφανίζεται στο στάδιο της εμφιάλωσης και κυρίως κατά την μετέπειτα αποθήκευσή τους, με κίνδυνο οι προκύπτουσες αλλοιώσεις στο προϊόν να επηρεάσουν δυσμενώς την ποιότητα και την εμπορευσιμότητα του. Οι αλλοιώσεις αυτές προκύπτουν λόγω της παραμονής μιας εναπομείνουσας ποσότητας πολυφαινολών στο κρασί, οι οποίες κατά τη διάρκεια της αποθήκευσής του συμμετέχουν σε ανεπιθύμητες οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις μέσα στη φιάλη.

Στην οινοβιομηχανία το πρόβλημα αυτό μπορεί να αντιμετωπιστεί παρεμποδίζοντας τη δράση του οξυγόνου να οξειδώσει τα ευοξειδωτα συστατικά του κρασιού. Αυτό μπορεί να πραγματοποιηθεί με απογέμισμα των δεξαμενών αποθήκευσης, με την προσθήκη αδρανούς αερίου κατά τις διάφορες επεξεργασίες στο οινοποιείο και κατά την εμφιάλωση, καθώς και με την προσθήκη αντιοξειδωτικών, κυρίως θειώδους ανυδρίτη, ασκορβικού οξέος και γλουταθειόνης (Βαϊμάκης, 1998).

Ένας άλλος τρόπος αντιμετώπισης του προβλήματος αποσκοπεί στη μείωση - απομάκρυνση της συγκέντρωσης των πολυφαινολών, οι οποίες αποτελούν και το κύριο υπόστρωμα οξείδωσης στον οίνο. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με την προσθήκη ενεργού άνθρακα, ή καζεϊνικών αλάτων, ή τη χρήση πολυβινυλοπολυπυρολιδόνης (PVPP) αλλά και με την εφαρμογή της υπεροξειγόνωσης (Βαϊμάκης, 1998). Η μέθοδος της υπεροξειγόνωσης δεν αναστέλλει τη δράση των πολυφαινολοξειδασών που προκαλούν την οξείδωση στην αρχή της οινοποίησης, αλλά αντιθέτως τις υποβοηθά παρέχοντας τους οξυγόνο σε μεγάλες ποσότητες με σκοπό την μείωση της συγκέντρωσης των πολυφαινολών στο γλεύκος και αργότερα στο παραγόμενο οίνο (Schneider, 1998).

Μπορεί τόσο η οξείδωση, όσο και οι προαναφερόμενες τεχνικές να μειώνουν τις συγκεντρώσεις των φαινολικών συστατικών του κρασιού, όμως πολλές είναι οι μελέτες που υποστηρίζουν την ευεργετική τους δράση στην υγεία του ανθρώπινου οργανισμού (Frankel et al., 1993; Kinsella et al., 1993; Ali et al., 2010; Chong et al., 2010; Covas et al., 2010; Gonzalez-Gallego et al., 2010; Vauzour et al., 2010; Levantesi et al., 2013; Snopek et al., 2018).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Οι οξειδωτικές αλλοιώσεις σε ένα κρασί μπορεί να συμβούν τόσο κατά την οινοποίηση όσο και κατά το μετέπειτα στάδιο της αποθήκευσης του στη φιάλη. Το φαινόμενο της οξείδωσης, μετά την επαφή του οίνου με το οξυγόνο, σχετίζεται συνήθως με απώλεια των θρεπτικών συστατικών και με υποβάθμιση της ποιότητας του. Επίσης προκύπτουν αλλοιώσεις των οργανοληπτικών του χαρακτηριστικών οι οποίες συνδέονται κυρίως με τη δημιουργία καφέ χρώματος (browning), την απώλεια των φρέσκων αρωμάτων φρούτου και την εμφάνιση δυσάρεστων οσμών. Ωστόσο η οξείδωση έως ένα βαθμό μπορεί να είναι επιθυμητή σε ορισμένες περιπτώσεις, όπως για παράδειγμα είναι ορισμένοι ερυθροί οίνοι, τα κρασιά τύπου sherry, κάποια επιδόρπια κρασιά κ.α.

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας είναι η μελέτη του ρυθμού οξείδωσης των λευκών οίνων μετά από προσθήκη δισθενούς σιδήρου (Fe^{2+}) και υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) με ταυτόχρονη παρακολούθηση της μεταβολής της χημικής τους σύστασης (κυρίως της πολυφαινολικής). Επίσης η αντιοξειδωτική προστασία που ενδεχομένως θα προσέφερε η προσθήκη σεληνίου στον οίνο ήταν ένα πολύ ενδιαφέρον ερευνητικό ερώτημα το οποίο δεν είχε μελετηθεί έως σήμερα.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

A. Υλικά

1. Δείγμα οίνου

Το κρασί που χρησιμοποιήθηκε για την υλοποίηση της παρούσας μεταπτυχιακής ερευνητικής μελέτης ήταν λευκό ποικιλίας Ασύρτικο και εσοδείας 2020 από τον αμπελώνα του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών που βρίσκεται στην περιοχή των Σπάτων Αττικής. Ο οίνος είχε ολικό αλκοολικό τίτλο 13,5% vol, pH = 3,26 , ολική οξύτητα 6,08 g/L τρυγικού οξέος, πτητική οξύτητα 0,6 g/L οξικού οξέος και ανάγοντα σάκχαρα 0,64 g/L. Επιπλέον στον οίνο είχε προστεθεί θειώδης ανυδρίτης κατά την πορεία της οινοποίησης.

2. Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την υλοποίηση της πειραματικής διαδικασίας της πειραματικής μελέτης ήταν: Τα αντιδραστήρια του χλωριούχου δισθενούς σιδήρου ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2 30%), του σεληνίου (στοιχειακό Se), το φωσφορικό άλας καλίου (K_2HPO_4) και το φωσφορικό κάλιο (KH_2PO_4), το αντιδραστήριο 5,5'-dithiobis (2 - nitrobenzoic acid) (DTNB), το αντιδραστήριο Folin - Ciocalteu, η p-διμεθυλαμινοκιναμαλδεΐδη (DMACA), το αντιδραστήριο DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) , η γλουταθειόνη, το αντιδραστήριο Trolox, το ανθρακικό νάτριο (Na_2CO_3), το υδροχλωρικό οξύ (HCl), το θειικό οξύ (H_2SO_4), το καυστικό νάτριο (NaOH), το γαλλικό, καφεϊκό και τρυγικό οξύ, η κατεχίνη, η αιθανόλη καθαρότητας $\geq 99,8\%$ και η μεθανόλη καθαρότητας $\geq 99,8\%$. Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από την εταιρεία Sigma - Aldrich (Darmstadt, Germany).

3. Όργανα

3.1 Φασματοφωτόμετρο

Για τη μέτρηση των απορροφήσεων σε όλες τις μεθόδους χρησιμοποιήθηκε το όργανο UPLAB UV - VIS spectrophotometer της STEROGLOSS Company (STEROGLOSS S.r.l. Strada Romano di Sopra, 2/C 06132 San Martino in Campo - Perugia, Italy).

3.2 Αυτόματος τιτλοδότης

Η μέτρηση του ολικού και ελεύθερου θειώδους ανυδρίτη πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του αυτόματου τιτλοδότη OENO 20, ένα προϊόν της Oeno Bio SARL (Oeno Bio, Borde Neuve, 11170 Saint Martin le Vieil, France).

3.3 Σύστημα Υγρής Χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)

Για το διαχωρισμό και την ανίχνευση των φαινολικών ενώσεων των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο Waters 2695 HPLC Separations Module (Waters Corporation, 34 Maple Street Milford, MA 01757, U.S.A.) και ανιχνευτή Photodiode array Waters 2996.

B. Πειραματική πορεία

1. Δείγματα προς ανάλυση

Τα δείγματα που μελετήθηκαν ήταν:

- 1) Ο Μάρτυρας (control)
- 2) Το δείγμα με την ελάχιστη συγκέντρωση χλωριούχου δισθενούς σιδήρου: 0,025 mM $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ και υπεροξειδίου του υδρογόνου: 0,1575 mM H_2O_2 .
- 3) Το δείγμα με τη μέγιστη συγκέντρωση χλωριούχου δισθενούς σιδήρου: 0,10 mM $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ και υπεροξειδίου του υδρογόνου: 0,63 mM H_2O_2 .
- 4) Το δείγμα με την ελάχιστη συγκέντρωση σεληνίου: 1,5 mg/L (30 μg στοιχειακού Se σε 20 ml $\text{MeOH} \geq 99,8\%$).
- 5) Το δείγμα με τη μέγιστη συγκέντρωση σεληνίου: 3 mg/L (60 μg στοιχειακού Se σε 20 ml $\text{MeOH} \geq 99,8\%$).
- 6) Το δείγμα με την ελάχιστη συγκέντρωση χλωριούχου δισθενούς σιδήρου: 0,025 mM $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, υπεροξειδίου του υδρογόνου: 0,1575 mM H_2O_2 και σεληνίου: 1,5 mg/L (30 μg στοιχειακού Se σε 20 ml $\text{MeOH} \geq 99,8\%$).
- 7) Το δείγμα με τη μέγιστη συγκέντρωση χλωριούχου δισθενούς σιδήρου: 0,10 mM $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, υπεροξειδίου του υδρογόνου: 0,63 mM H_2O_2 και σεληνίου: 3 mg/L (60 μg στοιχειακού Se σε 20 ml $\text{MeOH} \geq 99,8\%$).

2. Θερμοκρασίες εφαρμογής του πειράματος της οξείδωσης

Η πειραματική μελέτη της οξείδωσης πραγματοποιήθηκε για δυο διαφορετικές θερμοκρασίες, για τους 35 °C και 50 °C.

3. Προετοιμασία των δειγμάτων

Αρχικά, για την παρασκευή του Μάρτυρα (control) τοποθετήθηκαν 400 ml δείγματος οίνου ποικιλίας Ασύρτικο σε ογκομετρικό κύλινδρο των 500 ml. Στη συνέχεια με τη βοήθεια ογκομετρικού κυλίνδρου των 50 ml μεταφέρονταν 30 ml από το δείγμα του μάρτυρα, τα οποία μοιράστηκαν σε γυάλινα vials με βιδωτό καπάκι χωρητικότητας 45 ml.

Για την παρασκευή του δείγματος με την ελάχιστη συγκέντρωση $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,025 mM και H_2O_2 0,1575 mM σε ογκομετρικό κύλινδρο των 500 ml μεταφέρθηκαν 400 ml οίνου ποικιλίας Ασύρτικο, από τα οποία αφαιρέθηκαν 5,7 ml με την βοήθεια μικροπιπέτας. Στη συνέχεια προστέθηκαν 2 ml από το διάλυμα $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,005 gr/L $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) και 3,7 ml από το διάλυμα με την ελάχιστη συγκέντρωση H_2O_2 (33 μl H_2O_2 30% σε 10 ml οίνου, όπου $C_{\text{H}_2\text{O}_2} = 9,79 \text{ M}$). Ακολούθησε ανάδευση και με τη βοήθεια ογκομετρικού κυλίνδρου των 50 ml μεταφέρονταν 30 ml από το δείγμα σε

γυάλινα vials με βιδωτό καπάκι χωρητικότητας 45 ml. Επιπλέον, για την παρασκευή του δείγματος με την μέγιστη συγκέντρωση $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,10 mM και H_2O_2 0,63 mM σε ογκομετρικό κύλινδρο των 500 ml μεταφέρθηκαν 400 ml οίνου ποικιλίας Ασύρτικο, από τα οποία αφαιρέθηκαν συνολικά 11,7 ml με την βοήθεια μικροπιπέτας. Αμέσως μετά προστέθηκαν 8 ml από το διάλυμα $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,02 gr/L $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) και 3,7 ml από το διάλυμα με την μέγιστη συγκέντρωση H_2O_2 (132 μl H_2O_2 30% σε 10 ml οίνου, όπου $C_{\text{H}_2\text{O}_2} = 9,79 \text{ M}$). Έπειτα πραγματοποιήθηκε ανάδευση και με τη βοήθεια ενός ογκομετρικού κυλίνδρου των 50 ml μεταφέρονταν 30 ml από το δείγμα σε γυάλινα vials με βιδωτό καπάκι χωρητικότητας 45 ml.

Για την παρασκευή του δείγματος με την ελάχιστη συγκέντρωση Se 1,5 mg/L σε ογκομετρικό κύλινδρο των 500 ml μεταφέρθηκαν 360 ml οίνου ποικιλίας Ασύρτικο και με τη βοήθεια πιπέτας προστέθηκαν 40 ml από το διάλυμα σεληνίου ενδιάμεσης αραιώσης με συγκέντρωση 15 mg/L (αραιώση 1:100 από αρχικό διάλυμα με $C_{\text{Se}} = 1500 \text{ mg/L}$). Ακολούθησε ανάδευση και με τη βοήθεια ογκομετρικού κυλίνδρου των 50 ml μεταφέρονταν 30 ml από το δείγμα σε γυάλινα vials με βιδωτό καπάκι χωρητικότητας 45 ml. Στη συνέχεια για την παρασκευή του δείγματος με τη μέγιστη συγκέντρωση Se 3 mg/L, σε ογκομετρικό κύλινδρο των 500 ml μεταφέρθηκαν 360 ml οίνου και με τη βοήθεια πιπέτας πραγματοποιήθηκε προσθήκη 80 ml από το διάλυμα σεληνίου ενδιάμεσης αραιώσης με συγκέντρωση 15 mg/L. Αμέσως μετά ακολούθησε ανάδευση και με τη βοήθεια ενός ογκομετρικού κυλίνδρου των 50 ml μεταφέρονταν 30 ml από το δείγμα σε γυάλινα vials με βιδωτό καπάκι χωρητικότητας 45 ml.

Επίσης, για την παρασκευή του δείγματος με την ελάχιστη συγκέντρωση $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,025 mM, H_2O_2 0,1575 mM και Se 1,5 mg/L σε ογκομετρικό κύλινδρο των 500 ml μεταφέρθηκαν 360 ml οίνου από τα οποία αφαιρέθηκαν συνολικά 5,7 ml με τη βοήθεια μικροπιπέτας. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η προσθήκη 2 ml από το διάλυμα $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,005 gr/L $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), 3,7 ml από το διάλυμα με την ελάχιστη συγκέντρωση H_2O_2 (33 μl H_2O_2 30% σε 10 ml οίνου, όπου $C_{\text{H}_2\text{O}_2} = 9,79 \text{ M}$) και τέλος 40 ml από το διάλυμα σεληνίου ενδιάμεσης αραιώσης με συγκέντρωση 15 mg/L. Ακολούθησε ανάδευση και με τη βοήθεια ογκομετρικού κυλίνδρου των 50 ml μεταφέρονταν 30 ml από το δείγμα σε γυάλινα vials με βιδωτό καπάκι χωρητικότητας 45 ml. Ακόμη, για την παρασκευή του δείγματος με τη μέγιστη συγκέντρωση $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,10 mM, H_2O_2 0,63mM και Se 1,5 mg/L σε ογκομετρικό κύλινδρο των 500 ml μεταφέρθηκαν 320 ml οίνου, από τα οποία αφαιρέθηκαν συνολικά 11,7 ml με την βοήθεια μικροπιπέτας. Έπειτα έγινε προσθήκη 8 ml από το διάλυμα $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,02 gr/L $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), 3,7 ml από το διάλυμα με την μέγιστη συγκέντρωση H_2O_2 (132 μl H_2O_2 30% σε 10 ml οίνου, όπου $C_{\text{H}_2\text{O}_2} = 9,79 \text{ M}$) και τέλος 80 ml από το διάλυμα σεληνίου ενδιάμεσης αραιώσης με συγκέντρωση 15 mg/L. Στο τέλος πραγματοποιήθηκε ανάδευση και με τη βοήθεια ογκομετρικού κυλίνδρου των 50 ml μεταφέρονταν 30 ml από το δείγμα σε γυάλινα vials με βιδωτό καπάκι χωρητικότητας 45 ml.

Αμέσως μετά πραγματοποιήθηκε η μέτρηση της απορρόφησης στα 420 nm στο φασματοφωτόμετρο για όλα τα δείγματα (ημέρα 0) και στη συνέχεια αυτά μεταφέρθηκαν σε επωαστικό κλίβανο. Η ίδια διαδικασία εκτελέστηκε για δυο διαφορετικές θερμοκρασίες: για τους 35 °C και 50 °C. Στην πειραματική μελέτη της οξειδωσης στους 35 °C, τα δείγματα κλείστηκαν στον επωαστικό κλίβανο σε θερμοκρασία 35 °C για 12 ημέρες. Ενώ για την πειραματική μελέτη της οξειδωσης στους 50 °C, τα δείγματα κλείστηκαν στον επωαστικό κλίβανο σε θερμοκρασία 50 °C για άλλες 12 ημέρες.

4. Δειγματοληψίες

Η μέτρηση της απορρόφησης στα 420 nm στο φασματοφωτόμετρο πραγματοποιήθηκε με βάση το μοντέλο των Sioumis et al. (2005) από την ημέρα 0 έως και την 12^η ημέρα σε κάθε ένα πείραμα ταχείας οξείδωσης στις θερμοκρασίες των 35 και 50 °C . Ωστόσο οι δειγματοληψίες για τον προσδιορισμό του θειώδους ανυδρίτη (ελεύθερου και ολικού) με τη βοήθεια του αυτόματου τιτλοδότη, των ολικών φαινολικών συστατικών με τη μέθοδο Follin-Ciocalteu, της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο DPPH, των υδροξυκιναμωμικών οξέων, των φλαβονολών με τη μέθοδο της p-διμεθυλαμινοκιναμαλδεϋδης (DMACA) και των ολικών ελεύθερων σουλφρυδολομάδων (SH) με τη μέθοδο Ellmann πραγματοποιήθηκαν την ημέρα 0, την 1^η, την 2^η, την 4^η, την 8^η και την 12^η ημέρα κάθε πειράματος επιταχυνόμενης οξείδωσης. Επιπλέον, κατά την 12^η ημέρα κάθε πειράματος οξείδωσης πραγματοποιήθηκε και η μέτρηση για τον προσδιορισμό των φαινολικών ενώσεων με τη μέθοδο της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography).

Γ. Μέθοδοι Ανάλυσης

1. Απορρόφηση στα 420 nm και δείκτης καστάνωσης

Η μέτρηση της απορρόφησης ενός οίνου στα 420 nm αποτελεί ένδειξη του βαθμού οξείδωσης του. Όσο μεγαλύτερη είναι απορρόφηση ενός λευκού οίνου στα 420 nm, τόσο πιο οξειδωμένος είναι. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα μελέτη για τον προσδιορισμό του δείκτη καστάνωσης ακολουθεί το μοντέλο των Sioumis et al. (2005), το οποίο αποτελεί τροποποίηση από αυτό που περιγράφηκε από τους Singleton και Kramling (1976). Την ημέρα 0 όλα τα δείγματα τοποθετήθηκαν στον επωαστικό κλίβανο, από τον οποίο αποσύρονταν κάθε 24 ώρες για το διάστημα των 12 ημερών προκειμένου στη συνέχεια να πραγματοποιηθεί η μέτρηση της απορρόφησης στα 420 nm ($A_{420\text{nm}}$) για κάθε ένα δείγμα. Αφού τα δείγματα αποσύρονταν από τον επωαστικό κλίβανο, ακολουθούσε η παραμονή τους για μια ώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στη συνέχεια η απαραίτητη ποσότητα από κάθε ένα δείγμα τοποθετούνταν σε κυψελίδα υάλου του 1 cm και με τη χρήση του φασματοφωτομέτρου πραγματοποιήθηκε η καταγραφή της απορρόφησης στα 420 nm. Για τον μηδενισμό του οργάνου χρησιμοποιείται απιονισμένο νερό. Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε για 12 ημέρες σε κάθε ένα τεστ επιταχυνόμενης δοκιμής στους 35 και στους 50 °C.

Για την αξιολόγηση των τιμών των απορροφήσεων από των τεστ επιταχυνόμενης οξείδωσης υπολογίστηκαν δυο παράμετροι:

α) Η επί τις εκατό μεταβολή του χρώματος ($\% \Delta A_{420\text{nm}}$) σύμφωνα με την ακόλουθη εξίσωση.

$$\% \Delta A_{420\text{nm}} = 100 * [(A_{420}^{d12} - A_{420}^{d0}) / A_{420}^{d0}] \quad [\text{Εξ. 1}] ,$$

Όπου A_{420}^{d0} : η τιμή της απορρόφησης την ημέρα 0 και

A_{420}^{d12} : η τιμή της απορρόφησης την 12^η ημέρα. (Κοτσερίδης et al., 2017)

β) Ο συντελεστής k, ο οποίος χρησιμοποιήθηκε για τον χαρακτηρισμό της ταχύτητας μεταβολής του χρώματος κάθε δείγματος στα 420 nm. Ο συντελεστής k υπολογίστηκε από την καμπύλη μεταβολής της απορρόφησης στα 420 nm, της οποίας η γραμμική τάση που προκύπτει είναι της μορφής:

$$A_{420} = A_{420}^0 + k t \quad [\text{Εξ. 2}] ,$$

Όπου A_{420} : η μεταβολή του χρώματος στον οίνο - απορροφήσεις στα 420 nm,

A_{420}^0 : η αρχική μέτρηση της απορρόφησης,

k : ο συντελεστής του ρυθμού μεταβολής του χρώματος,

t : το χρονικό διάστημα. (Κοτσερίδης et al., 2017)

2. Θειώδης ανυδρίτης

Για τον προσδιορισμό του ολικού και ελεύθερου θειώδους ανυδρίτη χρησιμοποιήθηκε ο αυτόματος τιτλοδότης (Iodolyser).

2.1 Ολικός θειώδης ανυδρίτης

Ο προσδιορισμός του ολικού θειώδους ανυδρίτη στα δείγματα πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του αυτόματου τιτλοδότη. Για τη μέτρηση του ολικού θειώδους ανυδρίτη χρειάστηκε η μετατροπή του pH του οίνου από όξινο σε ισχυρά αλκαλικό με την προσθήκη καυστικού νατρίου (NaOH), ώστε να μπορέσει να αποδεσμευτεί από τις ενώσεις του με την ακεταλδεΐδη (Κοτσερίδης & Προξενιά, 2015). Αρχικά σε ποτήρι ζέσεως με γυάλινη πιπέτα μεταφέρθηκαν 20 ml δείγματος οίνου και 2 ml NaOH. Ακολούθησε ήπια ανάδευση και το μίγμα αφέθηκε για 10 λεπτά σε ηρεμία. Στη συνέχεια προστέθηκαν 4 ml διαλύματος H_2SO_4 (πυκνό H_2SO_4 αραιωμένο κατά 1/3) και το διάλυμα μεταφέρθηκε στον κινητό δίσκο της βάσης του αυτόματου τιτλοδότη. Ακολούθησε η τιτλοδότηση με τη λήξη της οποίας λήφθηκε και η ένδειξη από την προχοΐδα. Ο όγκος (ml) του οξειδωτικού διαλύματος που καταναλώθηκε κατά την τιτλοδότηση ισοδυναμεί με τη συγκέντρωση του ολικού θειώδους ανυδρίτη στο δείγμα, η οποία εκφράστηκε σε χιλιοστογραμμάρια ολικού SO_2 ανά λίτρο (mg/L).

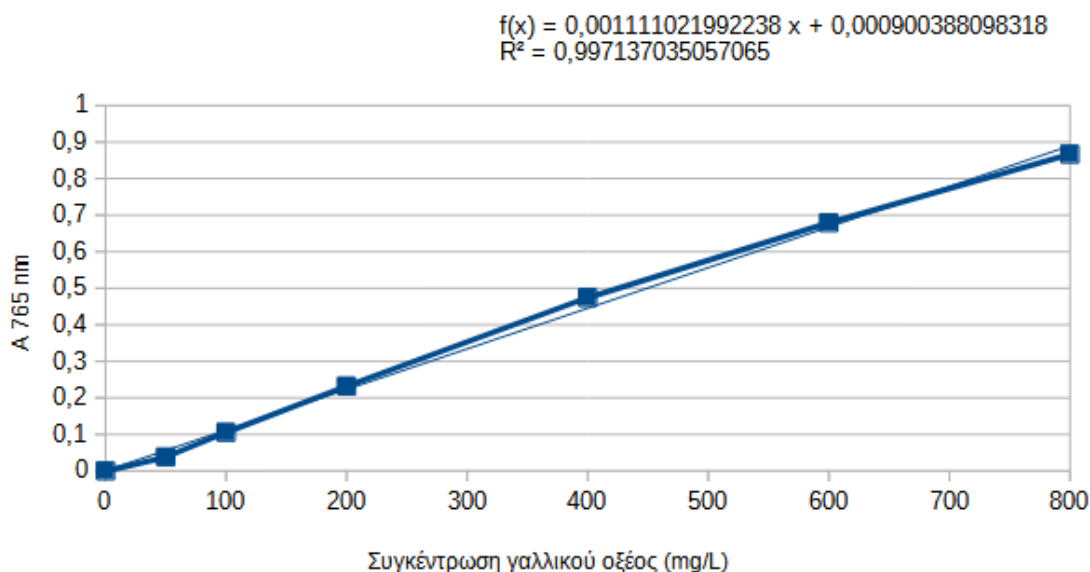
2.2 Ελεύθερος θειώδης ανυδρίτης

Ο προσδιορισμός του ελεύθερου θειώδους ανυδρίτη πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του αυτόματου τιτλοδότη. Αρχικά 20 ml δείγματος οίνου μεταφέρθηκαν με γυάλινη πιπέτα σε ποτήρι ζέσεως στο οποίο προστέθηκαν και 2 ml διαλύματος H_2SO_4 (πυκνό H_2SO_4 αραιωμένο κατά 1/3). Ακολούθησε η μεταφορά τους στον αυτόματο τιτλοδότη όπου εκεί αρχικά το μίγμα αναδεύεται και στη συνέχεια ακολουθεί η τιτλοδότηση. Με το πέρας της τιτλοδότησης λήφθηκε η ένδειξη από την προχοΐδα. Ο όγκος σε ml του οξειδωτικού διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε κατά την τιτλοδότηση αντιστοιχεί στη συγκέντρωση του ολικού θειώδους ανυδρίτη στο δείγμα, η οποία εκφράστηκε σε χιλιοστογραμμάρια ελεύθερου SO_2 ανά λίτρο (mg/L).

3. Ολικά φαινολικά συστατικά

Η φωτομετρική αυτή μέθοδος χρησιμοποιείται για τη μέτρηση του ολικού πολυφαινολικού περιεχομένου του κρασιού, χωρίς να πραγματοποιείται διάκριση μεταξύ μονομερών, διμερών και μεγαλύτερων φαινολικών ενώσεων. Ουσιαστικά βασίζεται στην οξείδωση των φαινολικών συστατικών του δείγματος από το κύριο αντιδραστήριο της μεθόδου Folin - Ciocalteu. Πρόκειται για ένα διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων 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 του αντιδραστηρίου Folin - Ciocalteu προς μείγμα κυανών οξειδίων του βολφραμίου (W_8O_{23}) και το μολυβδαινίου (Mo_8O_{23}) (OIV-MA-AS2-10, 2009). Το κυανό χρώμα που σχηματίζεται εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση στα 765 nm. Η αλκαλικότητα ρυθμίζεται με την προσθήκη διαλύματος Na_2CO_3 ενώ για τον μάρτυρα της μεθόδου, στην αντίδραση, χρησιμοποιείται νερό αντί για δείγμα.

Στο Διάγραμμα 1 παρουσιάζεται η πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος. Οι συγκέντρωσεις των φαινολικών συστατικών που ανιχνεύθηκαν σε κάθε δείγμα εκφράστηκαν σε χιλιοστογραμμάρια γαλλικού οξέος (GAE) στο λίτρο (mg/L) .



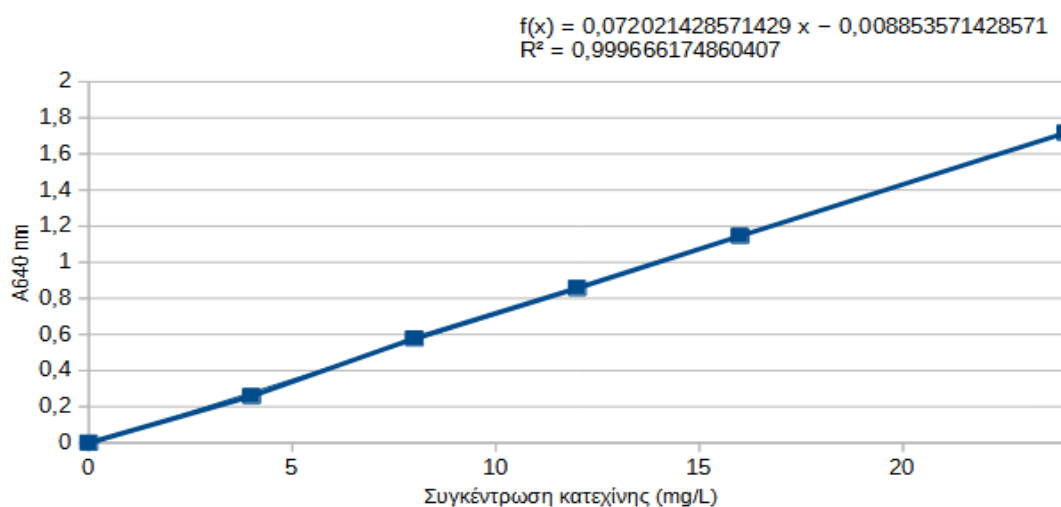
Διάγραμμα 1: Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος.

4. Φλαβανόλες

Για τον προσδιορισμό των φλαβανολών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της p-διμεθυλαμινοκιναμαλδεϋδης (DMACA) (Roussis et al., 2008). Αρχικά το δείγμα αραιώθηκε 1:2 με μεθανόλη σε σωλήνες erpendorf των 2 ml. Στη συνέχεια σε κυψελίδες στένωσης του 0,1 cm μεταφέρθηκαν 0,2 ml αραιωμένου δείγματος και 1 ml διαλύματος DMACA (0,1% w/v σε 1 N

διαλύματος HCl σε μεθανόλη) και ακολούθησε ανάδευση. Για κάθε ένα δείγμα παρασκευάζεται και το αντίστοιχο τυφλό, το οποίο χρησιμοποιείται για το μηδενισμό του οργάνου. Για την παρασκευή του τυφλού σε κυψελίδες στένωσης τοποθετήθηκαν 0,2 ml από το αραιωμένο δείγμα και 1 ml διαλύματος HCl 1 N σε μεθανόλη. Τα δείγματα αφήθηκαν σε ηρεμία για το χρονικό διάστημα των 10 λεπτών σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και κατόπιν μετρήθηκε η απορρόφηση στο φασματοφωτόμετρο στα 640 nm.

Στο Διάγραμμα 2 παρουσιάζεται η πρότυπη καμπύλη από την ευθεία της οποίας υπολογίστηκε η συγκέντρωση των φλαβονολών στο δείγμα. Οι συγκεντρώσεις τους εκφράστηκαν ως χιλιοστογραμμάρια κατεχίνης ανά λίτρο (mg/L).

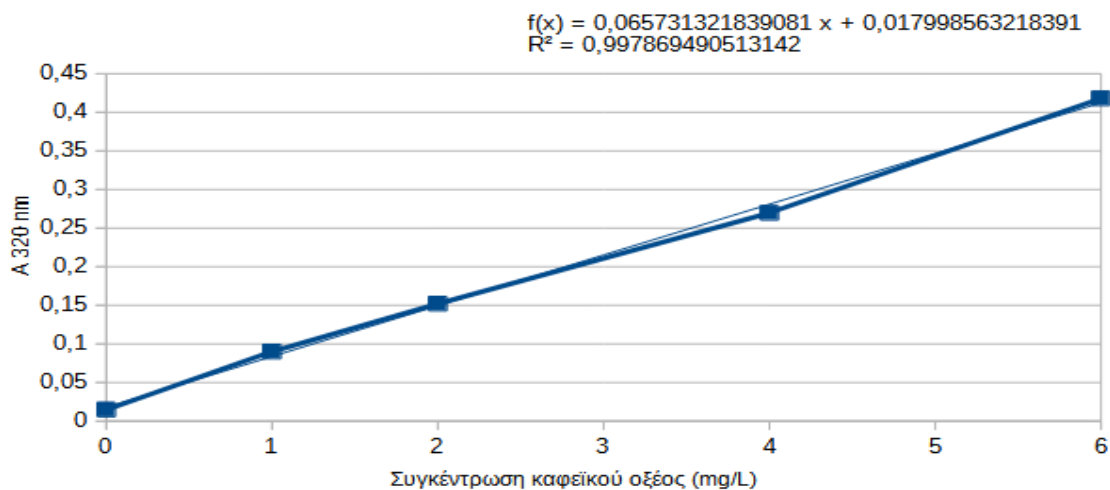


Διάγραμμα 2: Πρότυπη καμπύλη κατεχίνης.

5. Υδροξυκινναμωμικά οξέα

Για τον προσδιορισμό των υδροξυκινναμωμικών οξέων το δείγμα αραιώθηκε 1:10 με model wine (12% EtOH, 5 g/L τρυγικό οξύ, pH = 3,5). Στη συνέχεια μεταφέρθηκε σε κυψελίδα χαλαζία του 1 cm και πραγματοποιήθηκε η μέτρηση της απορρόφησης στα 320 nm στο φασματοφωτόμετρο. Για τον μηδενισμό του οργάνου χρησιμοποιήθηκε model wine.

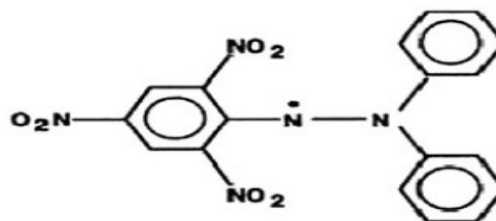
Ακολουθεί το Διάγραμμα 3 με την πρότυπη καμπύλη καφεϊκού οξέος από την ευθεία της οποίας υπολογίστηκε η συγκέντρωση των υδροξυκινναμωμικών οξέων του δείγματος σε χιλιοστογραμμάρια καφεϊκού οξέος ανά λίτρο (mg/L), λαμβάνοντας υπόψη και την αραιώση που είχε προηγηθεί.



Διάγραμμα 3: Πρότυπη καμπύλη καφεϊκού οξέος.

6. Αντιοξειδωτική ικανότητα

Η μέθοδος βασίζεται στη δράση της ελεύθερης ρίζας DPPH (2,2-διφαινυλο-1-πικρυλοϋδραζύλιο) (Εικόνα 21) η οποία λειτουργεί ως σαρωτής των αντιοξειδωτικών ενώσεων, άρα και των φαινολικών συστατικών (Sánchez-Moreno et al., 1997). Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας βασίζεται στη ικανότητα σάρωσης των αντιοξειδωτικών ενώσεων από το DPPH (Kedare & Singh, 2011). Ουσιαστικά το ελεύθερο ηλεκτρόνιο από το άτομο αζώτου της ελεύθερης ρίζας λαμβάνει άτομα υδρογόνου από τις αντιοξειδωτικές ενώσεις.



1: Diphenylpicrylhydrazyl (free radical)

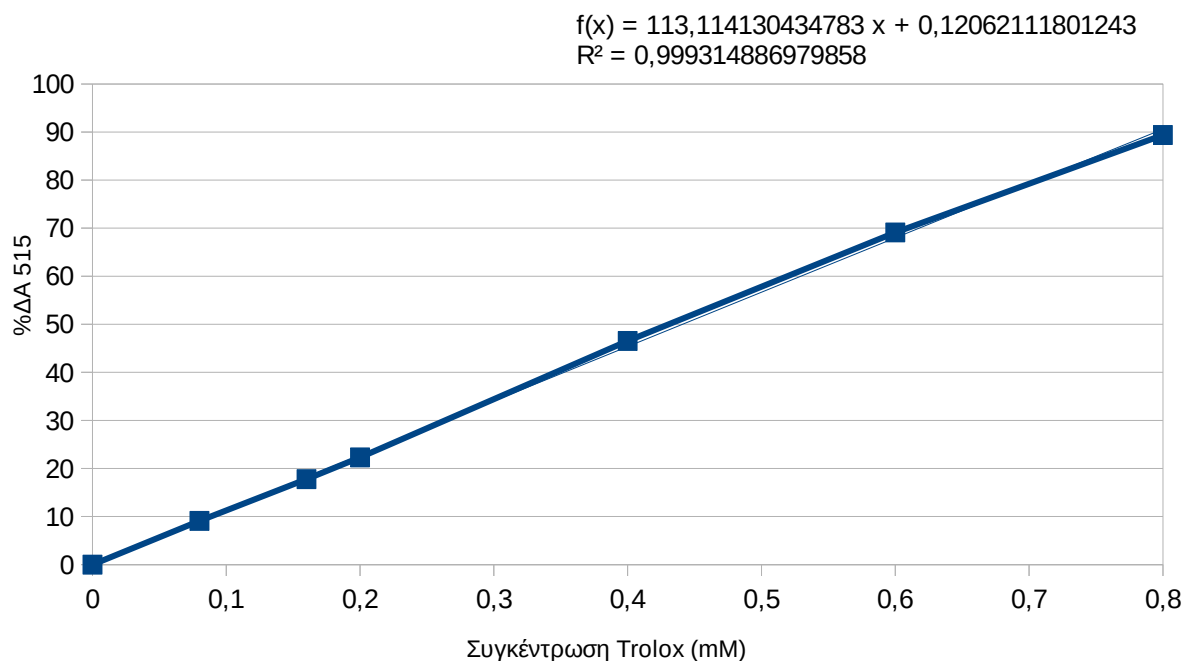
Εικόνα 21: Η ελεύθερη ρίζα DPPH (Kedare & Singh, 2011).

Ο υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Arnous et al. (2001) για τη μέθοδο. Στο εργαστήριο τα δείγματα αραιώθηκαν 1:5 με μεθανόλη και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η προσθήκη μεθανολικού διαλύματος DPPH στα δείγματα. Ακολούθησε η εις διπλούν μέτρηση των απορροφήσεων στα 515 nm στο φωτόμετρο. Το χρονικό διάστημα που μεσολάβησε ανάμεσα στις δυο μετρήσεις ήταν τα 30 λεπτά για κάθε ένα δείγμα. Από την ένδειξη των δυο απορροφήσεων υπολογίστηκε η % διαφορά στην απορρόφηση με βάση τον ακόλουθο τύπο:

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

Όπου $\% \Delta A_{515}$: η ποσοστιαία διαφορά μεταξύ των δυο απορροφήσεων,
 $A_{515}(t=0)$: η απορρόφηση του δείγματος στα 515 nm τον χρόνο $t = 0$ και
 $A_{515}(t=30)$: η απορρόφηση του δείγματος στα 515 nm τον χρόνο $t = 30$.

Ακολουθεί το Διάγραμμα 4 με την πρότυπη καμπύλη από την ευθεία της οποίας υπολογίστηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα του δείγματος σε Trolox (mM).

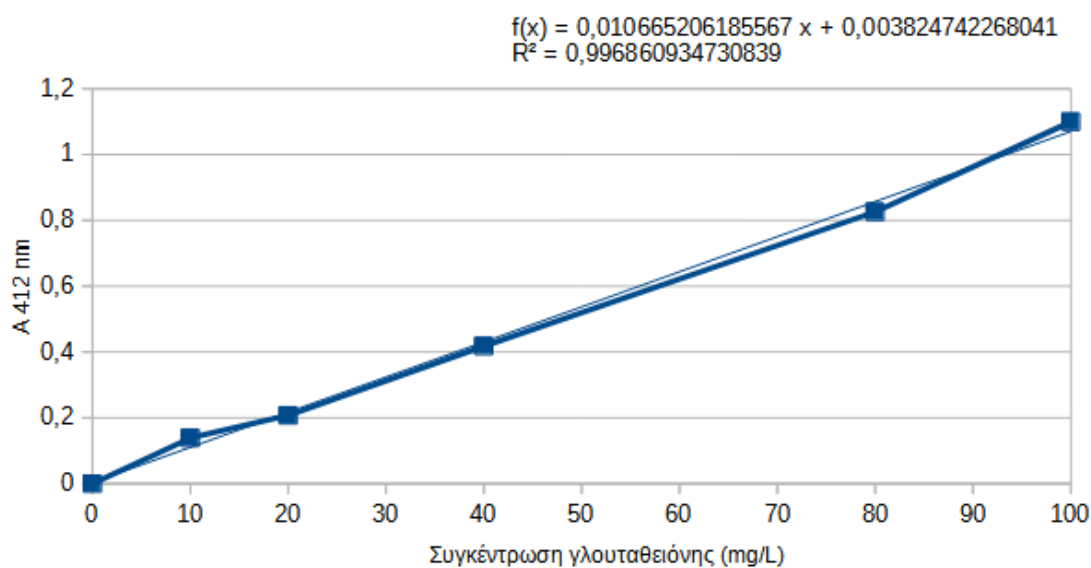


Διάγραμμα 4: Πρότυπη καμπύλη συγκεντρώσεων σε Trolox (mM).

7. Ολικές ελεύθερες σουλφρυδυλομάδες (SH)

Ο προσδιορισμός των ολικών ελεύθερων σουλφρυδυλομάδων πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή του αντιδραστηρίου Ellmann (Kontogeorgos & Roussis, 2014). Αρχικά σε κυψελίδες στένωσης του 0,1 cm μεταφέρθηκαν 0,8 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (K_2HPO_4/KH_2PO_4 , 200 mM, pH = 7,4), 0,3 ml δείγματος (χωρίς αραίωση) και 0,1 ml διαλύματος 5,5'-dithiois(2 - nitrobenzoic acid) (DTNB) (1 mM στο ίδιο φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα, pH = 7,4). Στη συνέχεια το διάλυμα αναδεύτηκε και παρέμεινε σε ηρεμία για 1 ώρα σε θερμοκρασία 20 °C και κατόπιν μετρήθηκε η απορρόφηση στα 412 nm στο φασματοφωτόμετρο. Για κάθε ένα δείγμα οίνου παρασκευάστηκε και το αντίστοιχο τυφλό, για το οποίο επίσης μετρήθηκε η απορρόφηση στα 412 nm. Για την παρασκευή του τυφλού σε κυψελίδες στένωσης μεταφέρθηκαν 0,9 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (K_2HPO_4/KH_2PO_4) και 0,3 ml δείγματος. Ο μηδενισμός του οργάνου έγινε με απιονισμένο νερό αντί δείγματος.

Στο Διάγραμμα 5 παρουσιάζεται η καμπύλη αναφοράς από την ευθεία της οποίας υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις των ολικών ελεύθερων σουλφρυδυλομάδων για κάθε ένα δείγμα που μελετήθηκε. Οι συγκεντρώσεις των ομάδων SH εκφράστηκαν ως χιλιοστογραμμάρια γλουταθειόνης ανά λίτρο (mg/L).



Διάγραμμα 5: Πρότυπη καμπύλη γλουταθειόνης (GSH).

8. Προσδιορισμός των επιπέδων των φαινολικών ενώσεων με τη χρήση HPLC

Στην Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography) ή Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (High Pressure Liquid Chromatography) το σύστημα παροχής της κινητής φάσης ρέει με την βοήθεια αντλίας. Αυτό συντελεί στη χρήση χρωματογραφικών στηλών με μικρό μέγεθος σωματιδίων υλικού πλήρωσης και μεγάλου εμβαδού επιφάνειας της στατικής φάσης. Επιπλέον, η αλληλεπίδραση μεταξύ των μορίων που μεταφέρονται μέσω της κινητής φάσης αυξάνεται ενώ ταυτόχρονα ο διαχωρισμός τους βελτιώνεται, έχοντας ως αποτέλεσμα την επιτάχυνση της ανάλυσης (Καρκαλούσος et al., 2015).

Στη παρούσα μεταπτυχιακή ερευνητική μελέτη η ανάλυση των δειγμάτων για τον προσδιορισμό των φαινολικών ενώσεων της 12^{ης} ημέρας δειγματοληψίας, για τα πειράματα ταχείας οξείδωσης στους 35 και 50 °C, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση HPLC αντίστροφης φάσης (RP-HPLC). Στην HPLC αντίστροφης φάσης ο διαχωρισμός των υδρόφοβων μορίων στη χρωματογραφική στήλη πραγματοποιείται με τη προσρόφησή τους σε μια υδρόφοβη στατική φάση υπό την ταυτόχρονη ροή κινητής φάσης με αυξανόμενη πολικότητα. Η στατική φάση είναι μη πολική και αποτελείται από διοξείδιο του πυριτίου συζευγμένο από διάφορες ομάδες όπως αλκύλια, φαινυλομάδες, αμινομάδες κ.α (Καρκαλούσος et al., 2015). Το προσροφητικό υλικό της στατικής φάσης έχει επίσης προσδεδεμένες μακριές αλυσίδες υδρόφοβων μορίων, όπως υδρογονανθράκων C4 ή C8 ή C18, με αποτέλεσμα τα μη πολικά μόρια του δείγματος να προσροφώνται ισχυρά σε αυτές ενώ αντίθετα τα πολικά μόρια διέρχονται διαμέσου της στήλης και εκλύονται νωρίτερα (κινητή φάση) (Καρκαλούσος et al., 2015).

Στο τέλος κάθε μια ένωση από το δείγμα που έχει εισαχθεί διαχωρίζεται από τις υπόλοιπες και ανιχνεύεται σε διαφορετικό χρόνο. Στη παρούσα μελέτη η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν C18. Αρχικά τα δείγματα οίνου διηθήθηκαν από φίλτρο σύριγγας 0,22 μm πριν από την ανάλυση. Στη συνέχεια ακολούθησε η ταυτοποίηση και η ποσοτικοποίηση των πολυφαινολικών ενώσεων με τη χρήση της μεθόδου HPLC, όπως περιγράφεται από τους Kallithraka et al. (2001). Ο προσδιορισμός των φαινολικών συστατικών πραγματοποιήθηκε για όλα τα δείγματα κατά την 12^η ημέρα δειγματοληψίας κάθε πειράματος οξείδωσης στις θερμοκρασίες των 35 και 50 °C και οι συγκεντρώσεις τους εκφράστηκαν σε χιλιοστογραμμάρια ανά λίτρο (mg/L).

9. Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

Σε κάθε ένα πείραμα ταχείας οξείδωσης στις θερμοκρασίες των 35 και 50 °C και για όλες τις περιπτώσεις οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν (2 επαναλήψεις) και οι τιμές των αποτελεσμάτων υπολογίστηκαν κατά μέσο όρο. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε και ο υπολογισμός της τυπικής απόκλισης σε κάθε τιμή.

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος STATISTICA 8.0.360.0. Για τη σύγκριση των τιμών κάθε δείγματος, σε κάθε μια πειραματική διαδικασία και για τις δυο θερμοκρασίες, χρησιμοποιήθηκε η Ανάλυση Διασποράς με έναν παράγοντα (One-way analysis of variance). Επίσης, για την εύρεση των τιμών που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Tukey HSD (honest significant difference) με επίπεδο σημαντικότητας 0,05 (5 %). Επομένως, στατιστικά σημαντικές διαφορές χαρακτηρίστηκαν οι τιμές των δειγμάτων με $p < 0,05$.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. Απορρόφηση στα 420 nm

Η χημική οξείδωση των οίνων ξεκινά με την ενεργοποίηση του οξυγόνου και τη δημιουργία των εξαιρετικά δραστικών ελεύθερων ριζών υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$), παρουσία μετάλλου όπως του δισθενούς σιδήρου (Fe^{2+}) που δρα ως καταλύτης. Οι ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου χρησιμοποιούν ως υπόστρωμα οξείδωσης τα φαινολικά συστατικά του οίνου, έχοντας σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία πολυμερών καστανού χρώματος (αμαύρωση – browning). Η οξείδωση και η αλλοίωση του χρώματος των δειγμάτων, έπειτα από κάθε προσθήκη και σε κάθε μια από τις δυο θερμοκρασίες του πειράματος 35 και 50 °C, αξιολογήθηκε με τη χρήση του φωτομέτρου και την παρακολούθηση της απορρόφησης στα 420 nm (κίτρινο) κάθε 24 ώρες, για το διάστημα των 12 ημερών. Επομένως η 12^η ημέρα επιλέχθηκε ως το τελικό σημείο μέτρησης. Το μοντέλο της παρούσας πειραματικής μελέτης της οξείδωσης πραγματοποιήθηκε με βάση τη μελέτη των Sioumis et al. (2005), οι οποίοι καθιέρωσαν μια αξιόπιστη δοκιμή για την αξιολόγηση της οξειδωτικής ικανότητας αλλά και την πορεία ανάπτυξης του οξειδωτικού καφετιάσματος των λευκών οίνων, ως μια παραλλαγή του πρωτοποριακού μοντέλου των Singleton και Kramling (1976).

Στη συνέχεια ακολουθούν οι Πίνακες 3 και 4 με τις διάφορες τιμές απορροφήσεων των δειγμάτων μετά από κάθε προσθήκη για τις θερμοκρασίες των 35 και 50 °C, για όλο το διάστημα των 12 ημερών. Σημειώνεται ότι οι τιμές που εμφανίζουν διαφορετικό εκθέτη παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05.

Πίνακας 3: Αποτελέσματα της απορρόφησης στα 420 nm στο πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 35 °C για το διάστημα των 12 ημερών.*

35 °C	Ημέρα 0	Ημέρα 1	Ημέρα 2	Ημέρα 3	Ημέρα 4	Ημέρα 5	Ημέρα 6	Ημέρα 7	Ημέρα 8	Ημέρα 9	Ημέρα 10	Ημέρα 11	Ημέρα 12
Μάρτυρας (Control) (M)	0,081 ^a ± 0,0	0,083 ^a ± 0,001	0,089 ^{ab} ± 0,001	0,097 ^a ± 0,002	0,099 ^a ± 0,001	0,087 ^a ± 0,005	0,091 ^a ± 0,002	0,097 ^a ± 0,004	0,080 ^a ± 0,001	0,090 ^a ± 0,001	0,102 ^a ± 0,001	0,097 ^a ± 0,001	0,098 ^a ± 0,001
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ min (Femin)	0,099 ^{a b} ± 0,001	0,095 ^a ± 0,0	0,102 ^b ± 0,001	0,102 ^a ± 0,002	0,107 ^a ± 0,001	0,099 ^a ± 0,0	0,102 ^a ± 0,004	0,108 ^a ± 0,002	0,109 ^b ± 0,001	0,106 ^a ± 0,001	0,123 ^a ± 0,001	0,094 ^a ± 0,0	0,116 ^b ± 0,001
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ max (Fe max)	0,118 ^{b c} ± 0,002	0,253 ^b ± 0,005	0,276 ^c ± 0,005	0,277 ^b ± 0,004	0,300 ^b ± 0,009	0,298 ^b ± 0,004	0,299 ^b ± 0,008	0,306 ^b ± 0,003	0,305 ^c ± 0,004	0,316 ^b ± 0,004	0,330 ^b ± 0,005	0,096 ^a ± 0,0	0,332 ^c ± 0,004
Se min	0,095 ^{a b} ± 0,005	0,087 ^a ± 0,001	0,088 ^{ab} ± 0,004	0,096 ^a ± 0,001	0,099 ^a ± 0,001	0,091 ^a ± 0,003	0,088 ^a ± 0,003	0,093 ^a ± 0,002	0,088 ^a ± 0,004	0,092 ^a ± 0,001	0,100 ^a ± 0,002	0,116 ^a ± 0,003	0,095 ^a ± 0,001
Se max	0,100 ^{a b} ± 0,001	0,088 ^a ± 0,001	0,085 ^a ± 0,0	0,096 ^a ± 0,001	0,098 ^a ± 0,002	0,088 ^a ± 0,004	0,090 ^a ± 0,001	0,094 ^a ± 0,006	0,084 ^a ± 0,0	0,098 ^a ± 0,001	0,116 ^a ± 0,001	0,117 ^a ± 0,0	0,094 ^a ± 0,0

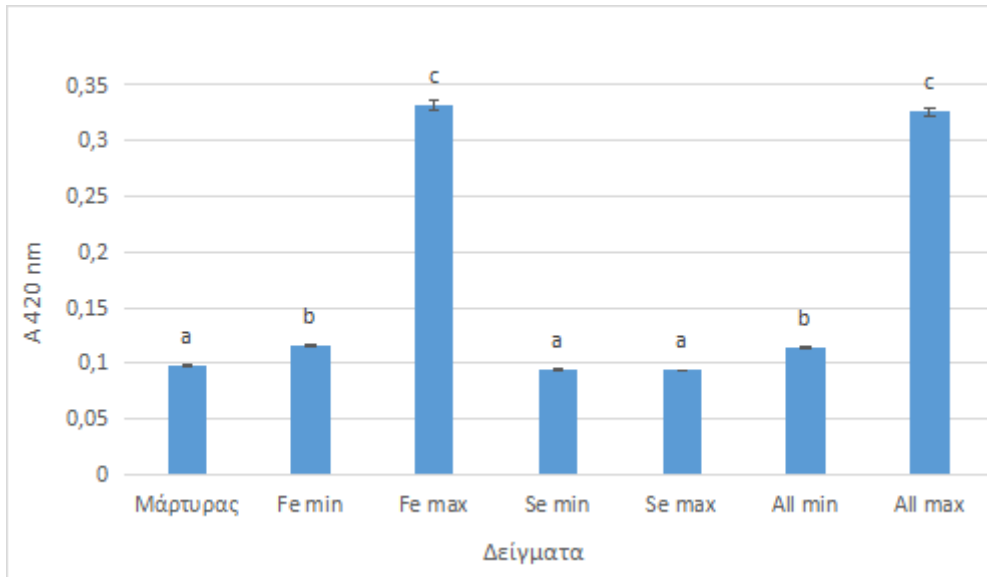
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se min (All min)	0,099 ^{a b} ± 0,006	0,093 ^a ± 0,001	0,097 ^{ab} ± 0,001	0,099 ^a ± 0,001	0,100 ^a ± 0,0	0,100 ^a ± 0,006	0,102 ^a ± 0,002	0,113 ^a ± 0,008	0,103 ^b ± 0,0	0,109 ^a ± 0,001	0,118 ^a ± 0,001	0,117 ^a ± 0,001	0,114 ^b ± 0,001
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se max (All max)	0,138 ^c ± 0,006	0,259 ^b ± 0,008	0,280 ^c ± 0,004	0,274 ^b ± 0,009	0,298 ^b ± 0,012	0,327 ^c ± 0,009	0,302 ^b ± 0,012	0,304 ^b ± 0,005	0,316 ^d ± 0,0	0,315 ^b ± 0,011	0,335 ^b ± 0,016	0,331 ^b ± 0,010	0,326 ^c ± 0,004

*Οι τιμές με διαφορετικό εκθέτη παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 και η σύγκρισή τους πραγματοποιήθηκε ανά στήλη.

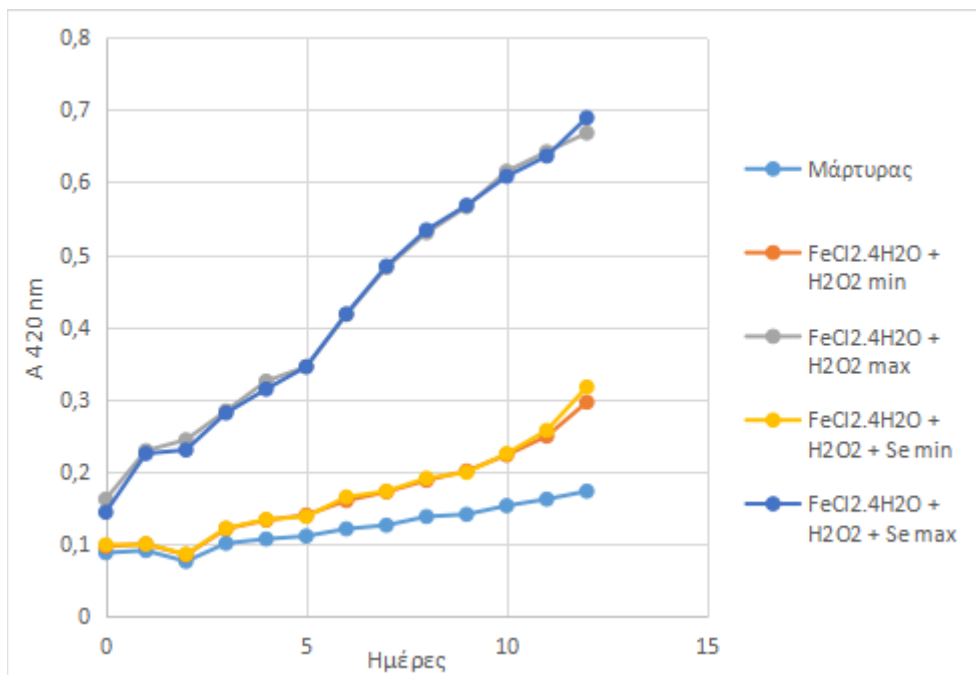
Πίνακας 4: Αποτελέσματα της απορρόφησης στα 420 nm στο πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 50°C για το διάστημα των 12 ημερών.*

50°C	Ημέρα 0	Ημέρα 1	Ημέρα 2	Ημέρα 3	Ημέρα 4	Ημέρα 5	Ημέρα 6	Ημέρα 7	Ημέρα 8	Ημέρα 9	Ημέρα 10	Ημέρα 11	Ημέρα 12
Μάρτυρας (Control) (M)	0,088 ^b ± 0,001	0,091 ^a ± 0,0	0,076 ^a ± 0,004	0,101 ^a ± 0,001	0,107 ^a ± 0,001	0,111 ^a ± 0,001	0,121 ^a ± 0,001	0,126 ^a ± 0,002	0,138 ^a ± 0,001	0,141 ^a ± 0,002	0,153 ^a ± 0,002	0,162 ^a ± 0,002	0,173 ^a ± 0,003
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ min (Fe min)	0,097 ^c ± 0,0	0,100 ^b ± 0,0	0,085 ^a ± 0,0	0,121 ^b ± 0,001	0,133 ^b ± 0,001	0,140 ^b ± 0,001	0,160 ^b ± 0,002	0,172 ^b ± 0,001	0,188 ^b ± 0,002	0,201 ^b ± 0,001	0,223 ^b ± 0,002	0,249 ^b ± 0,001	0,296 ^b ± 0,005
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ max (Fe max)	0,162 ^f ± 0,0	0,229 ^c ± 0,002	0,244 ^b ± 0,001	0,284 ^c ± 0,006	0,325 ^c ± 0,005	0,345 ^c ± 0,005	0,417 ^c ± 0,009	0,482 ^c ± 0,002	0,530 ^c ± 0,003	0,566 ^c ± 0,006	0,615 ^c ± 0,001	0,642 ^c ± 0,009	0,668 ^c ± 0,007
Se min	0,084 ^a ± 0,0	0,089 ^a ± 0,001	0,069 ^a ± 0,001	0,100 ^a ± 0,001	0,107 ^a ± 0,002	0,108 ^a ± 0,001	0,129 ^a ± 0,002	0,129 ^a ± 0,0	0,138 ^a ± 0,001	0,141 ^a ± 0,001	0,164 ^a ± 0,002	0,181 ^a ± 0,004	0,175 ^a ± 0,002
Se max	0,085 ^a ± 0,0	0,089 ^a ± 0,001	0,070 ^a ± 0,0	0,100 ^a ± 0,0	0,105 ^a ± 0,001	0,106 ^a ± 0,001	0,123 ^a ± 0,001	0,128 ^a ± 0,0	0,136 ^a ± 0,001	0,136 ^a ± 0,001	0,153 ^a ± 0,0	0,161 ^a ± 0,0	0,171 ^a ± 0,001
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se min (All min)	0,099 ^d ± 0,0	0,100 ^b ± 0,0	0,086 ^a ± 0,002	0,122 ^b ± 0,001	0,134 ^b ± 0,001	0,138 ^b ± 0,0	0,165 ^b ± 0,001	0,173 ^b ± 0,001	0,191 ^b ± 0,001	0,199 ^b ± 0,001	0,225 ^b ± 0,001	0,257 ^b ± 0,003	0,317 ^b ± 0,002
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se max (All max)	0,144 ^e ± 0,0	0,225 ^c ± 0,003	0,230 ^b ± 0,009	0,281 ^c ± 0,005	0,314 ^c ± 0,005	0,345 ^c ± 0,002	0,418 ^c ± 0,001	0,484 ^c ± 0,001	0,534 ^c ± 0,002	0,568 ^c ± 0,005	0,608 ^c ± 0,008	0,636 ^c ± 0,011	0,689 ^c ± 0,007

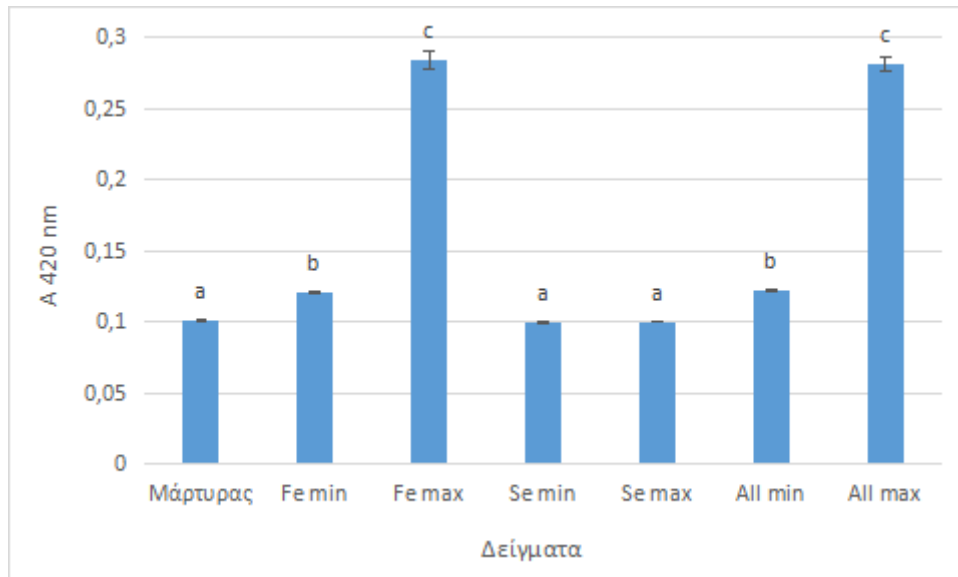
*Οι τιμές με διαφορετικό εκθέτη παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 και η σύγκρισή τους πραγματοποιήθηκε ανά στήλη.



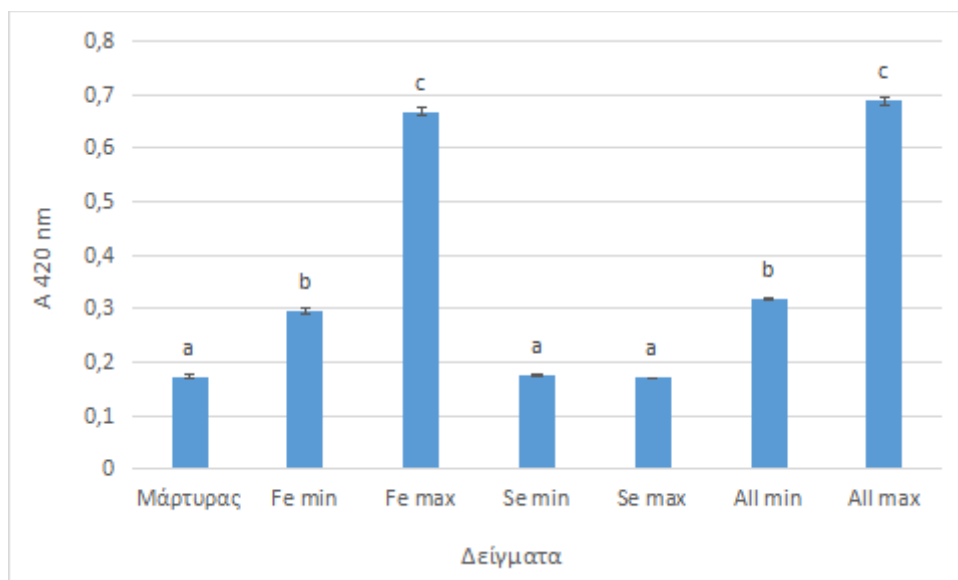
Διάγραμμα 6: Απορρόφηση στα 420 nm στα δείγματα την 12^η ημέρα για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 35 °C.



Διάγραμμα 7: Μεταβολές των απορροφήσεων από την ημέρα 0 έως και την 12^η για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 50 °C.



Διάγραμμα 8: Απορρόφηση στα 420 nm την 3^η ημέρα για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 50 °C.



Διάγραμμα 9: Απορρόφηση στα 420 nm στα δείγματα την 12^η ημέρα για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 50 °C.

Η μέτρηση της απορρόφησης των λευκών οίνων στα 420 nm είναι πολύ σημαντική για τον υπολογισμό του βαθμού οξείδωσής τους (Κοτσερίδης et al., 2015). Όσο περισσότερο οξειδωμένος είναι ο λευκός οίνος τόσο μεγαλύτερη είναι η απορρόφηση που θα παρουσιάζει στα 420 nm. Αυτός είναι και ο λόγος όπου οι τιμές των απορροφήσεων στα 420 nm τόσο στον Πίνακα 3, όσο και στον Πίνακα 4 αυξάνονται κατά το διάστημα των 12 ημερών. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα της μελέτης των Sioumis et al. (2005). Συγκεκριμένα μεγαλύτερη αύξηση των τιμών με το χρόνο παρουσιάζει ο Πίνακας 4, όπου η θερμοκρασία στην οποία παρέμειναν τα δείγματα για 12 ημέρες ήταν υψηλότερη (50 °C) από αυτή της πρώτης πειραματικής δοκιμής (35 °C). Συνεπώς η αύξηση της θερμοκρασίας συντέλεσε στην επιτάχυνση του φαινομένου της οξείδωσης των οίνων.

Με βάση τις τιμές του Πίνακα 3, στους 35°C διαπιστώνεται ότι το δείγμα του Μάρτυρα παρουσιάζει αύξηση της απορρόφησης στα 420 nm με το χρόνο. Ωστόσο τα δείγματα $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2$ max και $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se}$ max, όπου έχει προστεθεί ο $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ και το H_2O_2 στη μέγιστη συγκέντρωση, παρουσιάζουν μεγαλύτερη αύξηση στην απορρόφηση στα 420 nm σε σχέση με το Μάρτυρα, αλλά και με τα υπόλοιπα δείγματα κατά το διάστημα των 12 ημερών. Τα αποτελέσματά αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματά της Βολτέα (2014). Ήδη από την 1η ημέρα τα δείγματα $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2$ max και $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se}$ max παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα (Πίνακας 3). Ακόμη τα δείγματα $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2$ min και $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se}$ min, όπου έχει προστεθεί ο $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ και το H_2O_2 σε μικρότερες συγκεντρώσεις, παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 με το δείγμα του Μάρτυρα κατά την 12^η ημέρα (Διάγραμμα 6). Επίσης στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με το Μάρτυρα, αλλά και με τα υπόλοιπα δείγματα, συνέχισαν να παρουσιάζουν τα δείγματα με τις μέγιστες προσθήκες μίγματος $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ και H_2O_2 από την 1η ημέρα έως και την 12^η ημέρα, δηλαδή τα δείγματα $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2$ max και $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se}$ max (Διάγραμμα 6). Αντιθέτως, τα δείγματα με τις προσθήκες σεληνίου: Se min και Se max δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με το Μάρτυρα, από την 1^η έως και την 12^η ημέρα (Πίνακας 3).

Επιπλέον, με βάση τις τιμές των απορροφήσεων στα 420 nm του Πίνακα 4 παρατηρείται ότι σε όλα τα δείγματα αυτές αυξάνονται με το χρόνο, στο πείραμα ταχείας οξειδωσης στους 50 °C. Συγκεκριμένα τη μεγαλύτερη αύξηση στην απορρόφηση στα 420 nm με το χρόνο παρουσιάζουν τα δείγματα $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2$ max και $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se}$ max, όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 7, διότι οι προσθήκες του $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ και του H_2O_2 ήταν σε υψηλότερη συγκέντρωση έχοντας ως αποτέλεσμα την επιτάχυνση της οξειδωσης και συνεπώς τη δημιουργία του οξειδωτικού καφετιάσματος στον οίνο. Ακόμη τα δείγματα $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2$ max και $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se}$ max παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με το Μάρτυρα αλλά και με τα υπόλοιπα δείγματα καθ' όλο το διάστημα των 12 ημερών του πειράματος επιταχυνόμενης οξειδωσης στους 50 °C. Επίσης, με βάση τον Πίνακα 4 και το Διάγραμμα 8 διακρίνεται ότι ήδη από την 3^η ημέρα δειγματοληψίας τα δείγματα $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2$ min και $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se}$ min, με τις προθήκες $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ και H_2O_2 στην ελάχιστη συγκέντρωση, παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 σε σχέση με το δείγμα του Μάρτυρα. Αντιθέτως, στη πειραματική πορεία μελέτης της οξειδωσης στους 35 °C, τα δείγματα $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2$ min και $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se}$ min παρουσίασαν διακριτές στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 κυρίως κατά τη 12^η ημέρα δειγματοληψίας (Διάγραμμα 9).

Επομένως, η αύξηση της θερμοκρασίας στους 50 °C επιτάχυνε την αμαύρωση των δειγμάτων $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2$ min και $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se}$ min. Ακόμη τα δείγματα με τις προσθήκες σεληνίου: Se min και Se max δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με το Μάρτυρα από την 1^η έως και την 12^η ημέρα δειγματοληψίας (Πίνακας 4). Τα αποτελέσματα αυτά για τα δείγματα Se min και Se max συμφωνούν με τα αποτελέσματα του Πίνακα 3, γεγονός που υποδεικνύει ότι οι προσθήκες σεληνίου είτε στη ελάχιστη (Se min) είτε στην μέγιστη συγκέντρωση (Se max) δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με το δείγμα του Μάρτυρα ούτε στο πείραμα οξειδωσης των 35 °C αλλά ούτε και σε αυτό των 50 °C.

Στους Πίνακες 5 έως 8 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τις δυο παραμέτρους αξιολόγησης του τεστ της επιταχυνόμενης οξειδωσης και για τις δυο θερμοκρασίες όπου εφαρμόστηκε.

Σημειώνεται ότι οι τιμές όπου εμφανίζουν διαφορετικό εκθέτη παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05.

Πίνακας 5: Αποτελέσματα συντελεστή του ρυθμού μεταβολής του χρώματος k στο πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 35 °C για το διάστημα των 12 ημερών.*

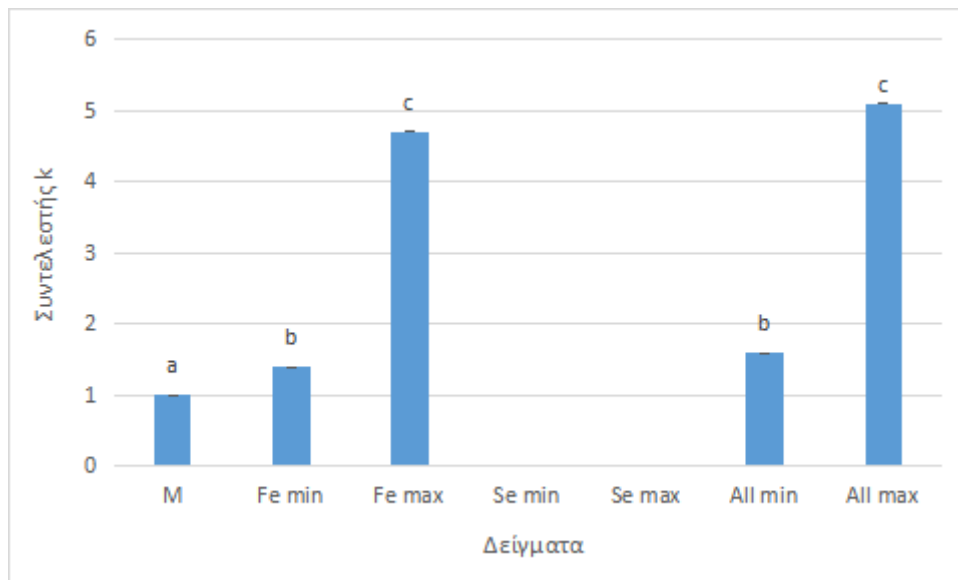
Δείγματα 35 °C	Συντελεστής ρυθμού μεταβολής του χρώματος k k (day⁻¹) x 10⁻³
Μάρτυρας (Control)	1,0 ^a ± 0,0
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ min (Fe min)	1,4 ^b ± 0,0
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ max (Fe max)	4,7 ^c ± 0,0
Se min	0
Se max	0
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se min (All min)	1,6 ^b ± 0,0003
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se max (All max)	5,1 ^c ± 0,0007

*Οι τιμές με διαφορετικό εκθέτη παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 και η σύγκρισή τους πραγματοποιήθηκε ανά στήλη.

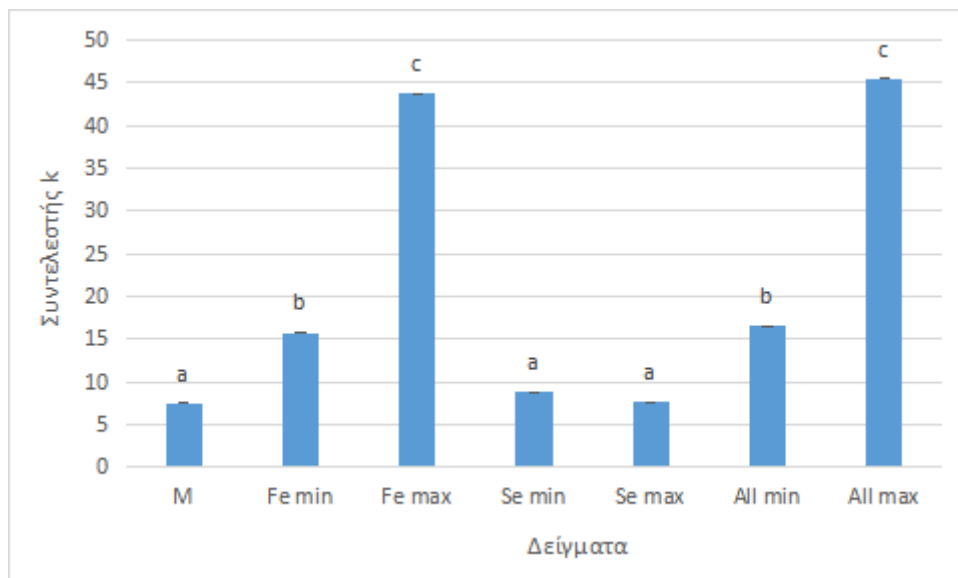
Πίνακας 6: Αποτελέσματα συντελεστή του ρυθμού μεταβολής του χρώματος k στο πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 50 °C για το διάστημα των 12 ημερών.*

Δείγματα 50 °C	Συντελεστής ρυθμού μεταβολής του χρώματος k k (day⁻¹) x 10⁻³
Μάρτυρας (Control)	7,5 ^a ± 0,0003
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ min (Fe min)	15,8 ^b ± 0,0003
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ max (Fe max)	43,8 ^c ± 0,0004
Se min	8,8 ^a ± 0,0
Se max	7,7 ^a ± 0,0001
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se min (All min)	16,6 ^b ± 0,0002
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se max (All max)	45,5 ^c ± 0,0004

*Οι τιμές με διαφορετικό εκθέτη παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 και η σύγκρισή τους πραγματοποιήθηκε ανά στήλη.



Διάγραμμα 10: Συντελεστής του ρυθμού μεταβολής του χρώματος k στο πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 35 °C για το διάστημα των 12 ημερών.



Διάγραμμα 11: Συντελεστής του ρυθμού μεταβολής του χρώματος k στο πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 50 °C για το διάστημα των 12 ημερών.

Πίνακας 7: Αποτελέσματα της επί τις εκατό μεταβολή του χρώματος (% $\Delta A_{420\text{ nm}}$) στο πείραμα ταχείας οξειδωσης στους 35 °C για το διάστημα των 12 ημερών.*

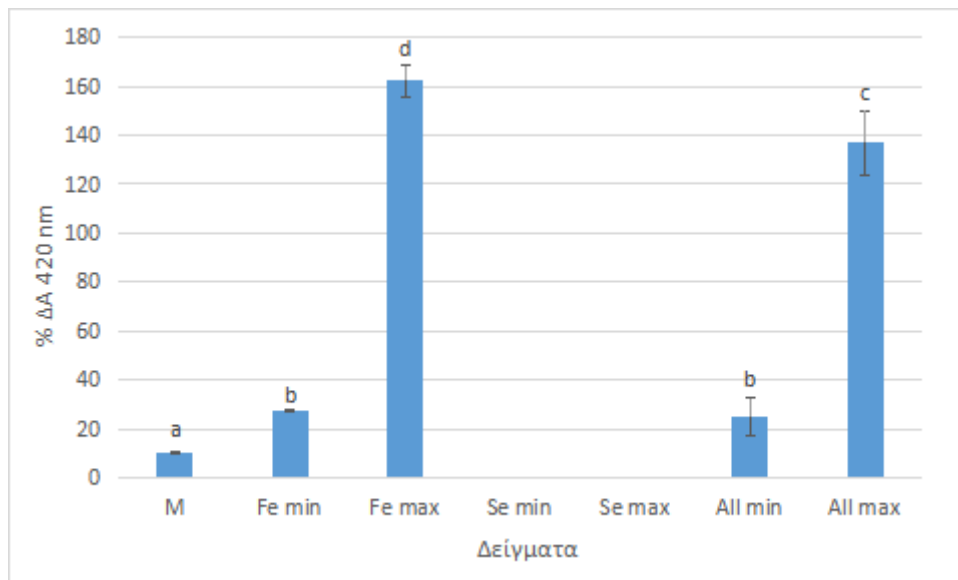
Δείγματα 35 °C	%$\Delta A_{420\text{ nm}}$
Μάρτυρας (Control)	10,370 ^a ± 0,617
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ min (Fe min)	27,764 ^b ± 0,417
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ max (Fe max)	162,212 ^d ± 6,581
Se min	0
Se max	0
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se min (All min)	25,100 ^b ± 7,481
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se max (All max)	136,806 ^c ± 13,194

*Οι τιμές με διαφορετικό εκθέτη παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 και η σύγκρισή τους πραγματοποιήθηκε ανά στήλη.

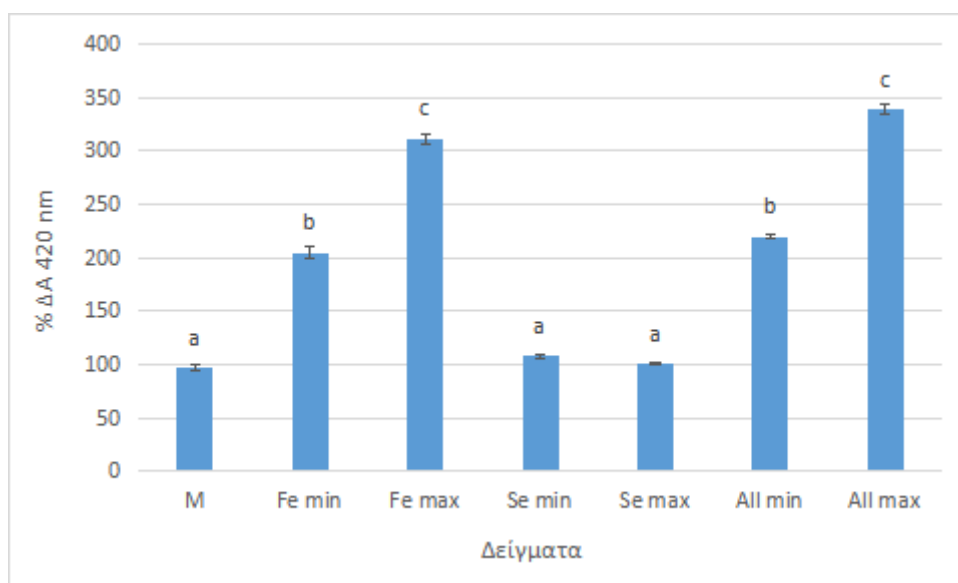
Πίνακας 8: Αποτελέσματα της επί τις εκατό μεταβολή του χρώματος (% $\Delta A_{420\text{ nm}}$) στο πείραμα ταχείας οξειδωσης στους 50 °C για το διάστημα των 12 ημερών.*

Δείγματα 50 °C	%$\Delta A_{420\text{ nm}}$
Μάρτυρας (Control)	97,701 ^a ± 2,299
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ min (Fe min)	205,155 ^b ± 5,155
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ max (Fe max)	312,037 ^c ± 4,630
Se min	107,738 ^a ± 1,786
Se max	101,176 ^a ± 1,176
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se min (All min)	220,202 ^b ± 2,020
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se max (All max)	338,74 ^c ± 4,861

*Οι τιμές με διαφορετικό εκθέτη παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 και η σύγκρισή τους πραγματοποιήθηκε ανά στήλη.



Διάγραμμα 12: Η επί τις εκατό μεταβολή του χρώματος (% $\Delta A_{420 \text{ nm}}$) στο πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 35 °C για το διάστημα των 12 ημερών.



Διάγραμμα 13: Η επί τις εκατό μεταβολή του χρώματος (% $\Delta A_{420 \text{ nm}}$) στο πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 50 °C για το διάστημα των 12 ημερών.

Ο συντελεστής k καθίσταται απαραίτητος για την εκτίμηση της οξειδωσιμότητας κάθε δείγματος και χαρακτηρίζει την ταχύτητα μεταβολής του χρώματός του στα 420 nm (Κοτσερίδης et al., 2017). Όσο υψηλότερη εμφανίζεται η τιμή του συντελεστή k ενός οίνου, τόσο πιο επιρρεπής είναι στην οξείδωση και τόσο πιο γρήγορα θα αναπτυχθούν οι καφέ αποχρώσεις οξείδωσης σε αυτόν. Επίσης, η επί τις εκατό μεταβολή του χρώματος % ΔA_{420} χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση του χρώματος ενός οίνου μετά από το τεστ της επιταχυνόμενης οξείδωσης και οι τιμές του > 70% φανερώνουν

πιθανότητα οξειδωτικής αμαύρωσης (browning) (Κοτσερίδης et al., 2017). Τα αποτελέσματα των Πινάκων 5 έως 8 υπολογίστηκαν σύμφωνα με τις εξισώσεις [1] και [2] [βλ. Κεφ. Υλικά και Μέθοδοι].

Με βάση τα αποτελέσματα που απεικονίζονται στους Πίνακες 5 και 6, το δείγμα $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2$ max και $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se}$ max στις δυο περιπτώσεις των πειραμάτων οξείδωσης διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 με το δείγμα του Μάρτυρα αλλά και με τα υπόλοιπα δείγματα (Διαγράμματα 10 και 11). Επίσης παρατηρείται ότι μετά το πείραμα οξείδωσης στους 35 και στους 50 °C, τα δείγματα με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις σιδήρου και υπεροξειδίου του υδρογόνου παρουσίασαν την υψηλότερη τιμή του συντελεστή k σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα, ιδιαιτέρως στο πείραμα ταχείας οξείδωσης στη θερμοκρασία των 50 °C. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν και με τα αποτελέσματα των Πινάκων 7 και 8, όπου οι τιμές του % ΔA_{420} των δειγμάτων $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2$ max και $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se}$ max φαίνεται να είναι οι υψηλότερες σε σχέση με το δείγμα του Μάρτυρα αλλά και με τα υπόλοιπα δείγματα και για τις δυο θερμοκρασίες των πειραμάτων οξείδωσης. Επίσης οι τιμές των δειγμάτων αυτών διαφέρουν στατιστικά σημαντικά από τα υπόλοιπα δείγματα ως προς τις τιμές του % ΔA_{420} (Διαγράμματα 12 και 13). Επομένως τα δείγματα $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2$ max και $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se}$ max είναι αυτά όπου εμφάνισαν πρώτα τις καφέ αποχρώσεις οξείδωσης στο χρόνο (browning) σε σχέση με τα άλλα δείγματα, με αποτέλεσμα να χαρακτηρίζεται ως τα πιο ευοξειδωτά δείγματα.

Επιπλέον, από τα αποτελέσματα του συντελεστή k και της μεταβολής % ΔA_{420} διαπιστώνεται ότι η αύξηση της θερμοκρασίας στους 50 °C επιτάχυνε τις αντιδράσεις οξειδοαναγωγής στο πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 50 °C. Γι'αυτό και οι τιμές του συντελεστή k στο πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 50 °C παρουσιάζονται μεγαλύτερες σε όλα τα δείγματα, σε σχέση με τις τιμές του συντελεστή k στο πείραμα ταχείας οξείδωσης στη θερμοκρασία των 35°C. Επομένως η εμφάνιση του οξειδωτικού καφετιάσματος και οι μεταβολές του χρώματος έγιναν πολύ πιο σύντομα στα δείγματα που εφαρμόστηκε το τεστ της επιταχυνόμενης οξείδωσης στους 50 °C.

Ακόμη, με βάση τον Πίνακα 5 στο πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 35 °C, οι τιμές του συντελεστή k των δειγμάτων $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2$ min και $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se}$ min εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 διαφορές σε σχέση με την τιμή k στο δείγμα του Μάρτυρα (Διάγραμμα 10). Επίσης και στο πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 50 °C οι τιμές του συντελεστή k των δειγμάτων $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2$ min και $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se}$ min διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 σε σχέση με αυτές του Μάρτυρα (Διάγραμμα 11). Ακόμη τα αποτελέσματα των δειγμάτων $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2$ min και $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se}$ min στους Πίνακες 5 και 7 συμφωνούν με αυτά των Πινάκων 7 και 8. Ωστόσο οι τιμές της % ΔA_{420} των δειγμάτων $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2$ min και $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se}$ min στο πείραμα οξείδωσης στους 35 °C είναι < 70% (Πίνακας 7). Αντιθέτως, οι τιμές των ίδιων δειγμάτων στο πείραμα οξείδωσης στους 50 °C είναι > 70%, όπως και στα υπόλοιπα δείγματα (Πίνακας 8). Συνεπώς, οι καφέ αποχρώσεις οξείδωσης σε όλα τα δείγματα παρουσιάζονται νωρίτερα στο πείραμα επιταχυνόμενης οξείδωσης στους 50 °C από ότι σε αυτό των 35 °C.

Επιπλέον οι τιμές του συντελεστή k των δειγμάτων Se min και Se max στο πείραμα ταχείας οξείδωσης στη θερμοκρασία των 35 °C ισούνται με το μηδέν. Ωστόσο στο πείραμα οξείδωσης στους 50 °C τα δείγματα Se min και Se max δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με το δείγμα του Μάρτυρα (Διαγράμματα 10 και 11). Επομένως στα δείγματα αυτά, ακόμα και στην υψηλή θερμοκρασία των 50 °C, οι καφέ αποχρώσεις οξείδωσης εμφανίστηκαν πολύ πιο αργά χρονικά σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα. Επιπροσθέτως, οι τιμές της % ΔA_{420} των

δειγμάτων Se min και Se max στο πείραμα οξείδωσης των 35 °C σημειώθηκαν μηδενικές, ενώ σε αυτό των 50 °C δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 σε σχέση με τις τιμές % ΔA_{420} του Μάρτυρα (Διαγράμματα 12 και 13). Τα αποτελέσματα των τιμών της μεταβολής % ΔA_{420} των δειγμάτων αυτών στο πείραμα οξείδωσης στους 35 °C είναι < 70%, ενώ στο τεστ οξείδωσης των 50 °C οι τιμές τους είναι > 70% (Πίνακες 7 και 8).

Συμπερασματικά η εμφάνιση των καφέ αποχρώσεων και της οξειδωτικής αμαύρωσης στα δείγματα Se min και Se max παρουσιάζονται μόνο στο πείραμα επιταχυνόμενης οξείδωσης στη θερμοκρασία των 50 °C. Παράλληλα σημειώνεται ότι οι προσθήκες σεληνίου, ανεξαρτήτως συγκέντρωσης, στο πείραμα ταχείας οξείδωσης στη θερμοκρασία των 35 °C συντέλεσαν στη μείωση του ρυθμού αμαύρωσης του οίνου καθώς και στη μείωση εμφάνισης του οξειδωτικού καφετιάσματος.

2. Θειώδης ανυδρίτης

Μία από τις κυριότερες δράσεις του θειώδους ανυδρίτη είναι και η αντιοξειδωτική του δράση, καθώς μπορεί και οξειδώνεται ο ίδιος προφυλάσσοντας έτσι τα φαινολικά και άλλα ευοξειδωτα συστατικά του κρασιού. Επιπλέον συμμετέχει και στην δημιουργία ενώσεων με τα φαινολικά συστατικά. Επομένως η παρουσία του θειώδους ανυδρίτη στη οξείδωση των φαινολικών ενώσεων διαδραματίζει σημαντικό ρόλο (Bradshaw et al., 2004). Γενικότερα όμως η εμφάνιση του οξειδωτικού καφετιάσματος και οι αντιδράσεις που εμπλέκονται σε αυτό είναι πολύ πιο περίπλοκες (Danilewicz, 2003, Sioumis et al., 2005).

Ο ολικός θειώδης ανυδρίτης προκύπτει από το σύνολο του ελεύθερου και του δεσμευμένου. Στην αντιοξειδωτική του δραστηριότητα συμμετέχει μόνο ο ελεύθερος. Πιο συγκεκριμένα τα ιόντα HSO_3^- είναι πιο δραστικά και διαθέτουν μεγαλύτερη αναγωγική ικανότητα από τον μοριακό SO_2 . Στη συνέχεια παρουσιάζονται οι πίνακες με τα αποτελέσματα του ολικού και του ελεύθερου θειώδους ανυδρίτη στο πείραμα επιταχυνόμενης οξείδωσης στους 35 και στους 50 °C για τις ημέρες δειγματοληψίας 0, 1, 2, 4, 8 και 12.

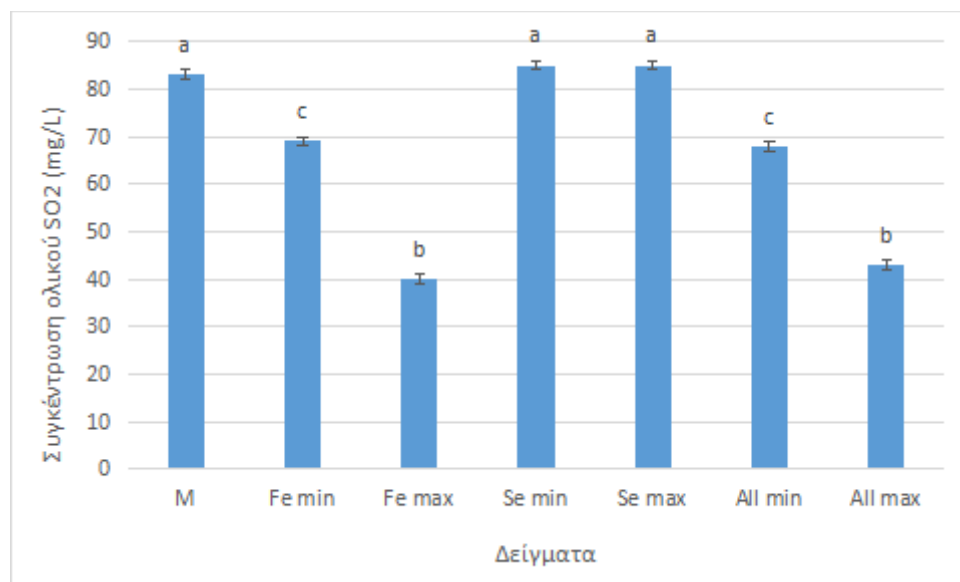
2.1 Ολικός θειώδης ανυδρίτης

Στους Πίνακες 9 και 10 απεικονίζονται τα αποτελέσματα του ολικού θειώδους ανυδρίτη για τα πειράματα οξείδωσης στους 35 και στους 50 °C για τις ημέρες δειγματοληψίας 0, 1, 2, 4, 8 και 12. Σημειώνεται ότι οι τιμές όπου εμφανίζουν διαφορετικό εκθέτη παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05. Όλες οι ποσότητες στους Πίνακες 7 και 8 είναι εκφρασμένες σε χιλιοστογραμμάρια SO_2 ανά λίτρο (mg/L).

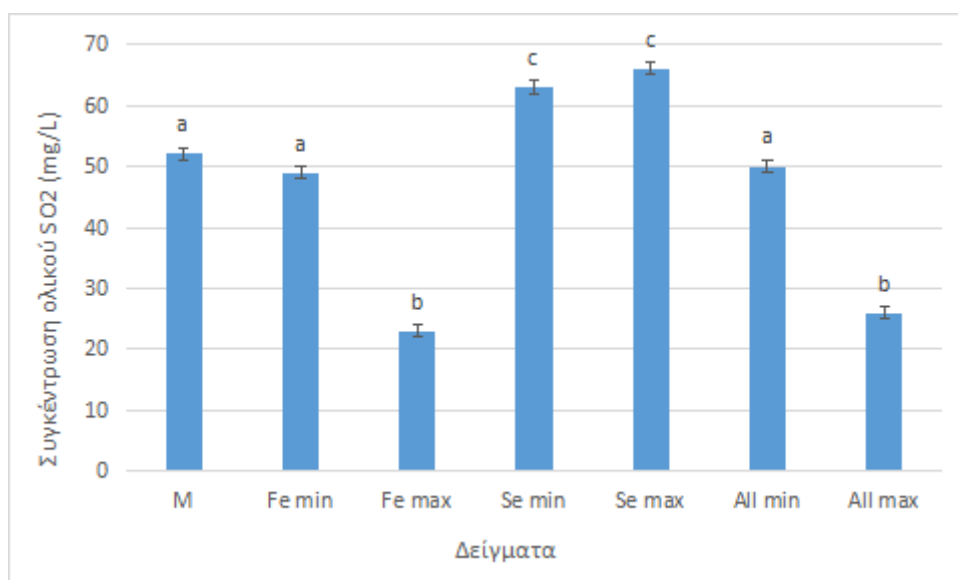
Πίνακας 9: Αποτελέσματα ολικού θειώδους ανυδρίτη για το πείραμα οξείδωσης στη θερμοκρασία των 35 °C.*

Δείγματα 35 °C	Ημέρα 0	Ημέρα 1	Ημέρα 2	Ημέρα 4	Ημέρα 8	Ημέρα 12
Μάρτυρας (Control)	72,0 ^a ± 1,0	83,0 ^a ± 1,0	64,0 ^a ± 1,0	69,0 ^b ± 1,0	59,5 ^a ± 1,0	52,0 ^a ± 1,0
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ min (Fe min)	72,0 ^a ± 1,0	69,0 ^c ± 1,0	69,0 ^a ± 1,0	52,0 ^a ± 1,0	39,0 ^c ± 1,0	49,0 ^a ± 1,0
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ max (Fe max)	72,0 ^a ± 1,0	40,0 ^b ± 1,0	29,0 ^b ± 1,0	32,0 ^d ± 1,0	20,0 ^b ± 1,0	23,0 ^b ± 1,0
Se min	72,0 ^a ± 1,0	85,0 ^a ± 1,0	65,0 ^a ± 1,0	75,0 ^c ± 1,0	64,5 ^a ± 1,0	63,0 ^c ± 1,0
Se max	72,0 ^a ± 1,0	85,0 ^a ± 1,0	64,5 ^a ± 1,0	65,0 ^b ± 1,0	60,5 ^a ± 1,0	66,0 ^c ± 1,0
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se min (All min)	72,0 ^a ± 1,0	68,0 ^c ± 1,0	51,0 ^c ± 1,0	56,0 ^a ± 1,0	50,0 ^d ± 1,0	50,0 ^a ± 1,0
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se max (All max)	72,0 ^a ± 1,0	43,0 ^b ± 1,0	36,0 ^b ± 1,0	24,0 ^c ± 1,0	24,0 ^b ± 1,0	26,0 ^b ± 1,0

*Οι τιμές με διαφορετικό εκθέτη παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 και η σύγκρισή τους πραγματοποιήθηκε ανά στήλη.



Διάγραμμα 14: Συγκέντρωση ολικού SO₂ στα δείγματα την 1^η ημέρα δειγματοληψίας για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 35 °C.

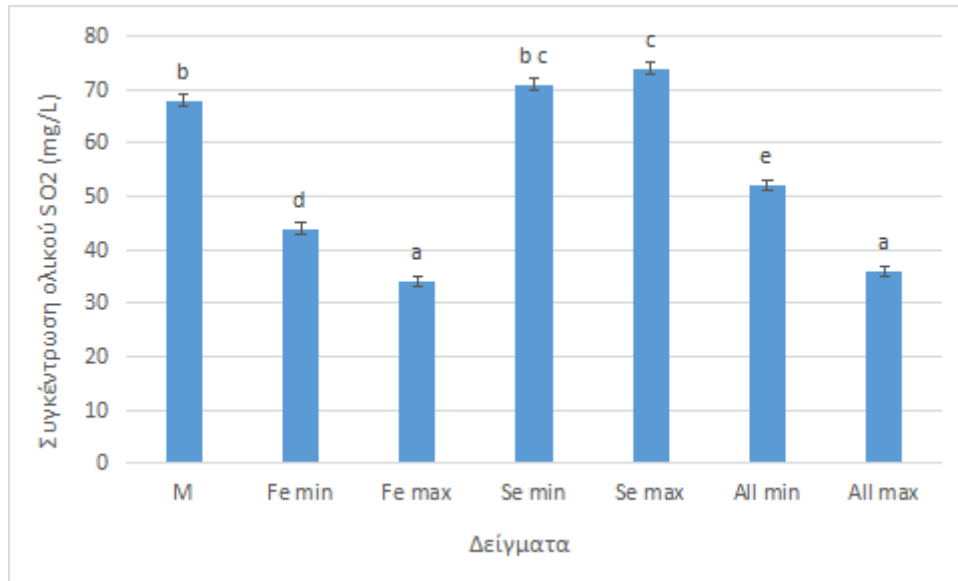


Διάγραμμα 15: Συγκέντρωση ολικού SO₂ στα δείγματα την 12^η ημέρα δειγματοληψίας για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 35 °C.

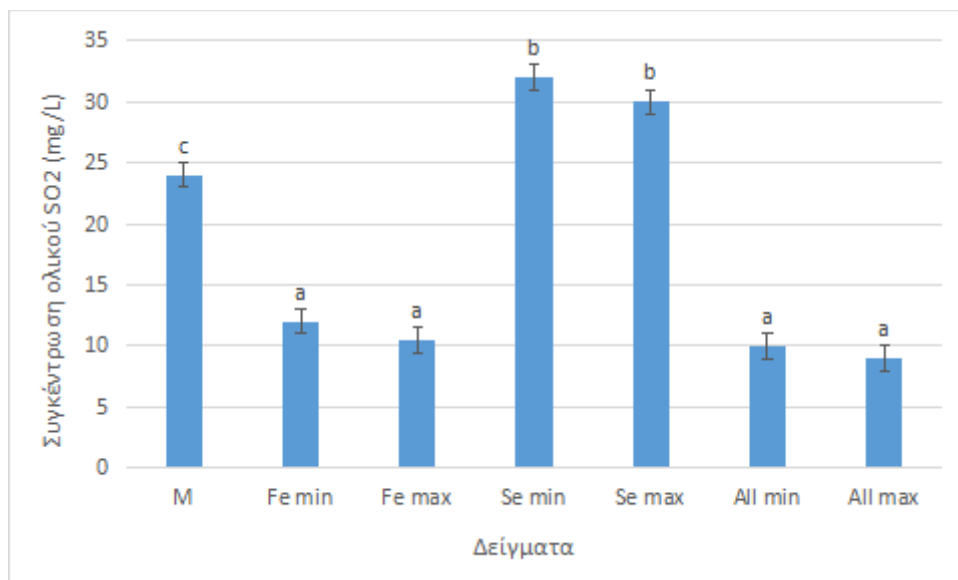
Πίνακας 10: Αποτελέσματα ολικού θειώδους ανυδρίτη για το πείραμα οξείδωσης στη θερμοκρασία των 50 °C.*

Δείγματα 50 °C	Ημέρα 0	Ημέρα 1	Ημέρα 2	Ημέρα 4	Ημέρα 8	Ημέρα 12
Μάρτυρας (Control)	69,0 ^a ± 1,0	68,0 ^b ± 1,0	68,0 ^{c,d} ± 1,0	54,0 ^a ± 1,0	43,0 ^a ± 1,0	24,0 ^c ± 1,0
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ min (Fe min)	69,0 ^a ± 1,0	44,0 ^d ± 1,0	52,0 ^b ± 1,0	40,0 ^c ± 1,0	22,0 ^c ± 1,0	12,0 ^a ± 1,0
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ max (Fe max)	69,0 ^a ± 1,0	34,0 ^a ± 1,0	31,0 ^a ± 1,0	20,5 ^b ± 1,0	11,0 ^b ± 1,0	10,5 ^a ± 1,0
Se min	69,0 ^a ± 1,0	71,0 ^{b,c} ± 1,0	66,0 ^c ± 1,0	57,0 ^a ± 1,0	42,0 ^a ± 1,0	32,0 ^b ± 1,0
Se max	69,0 ^a ± 1,0	74,0 ^c ± 1,0	72,0 ^d ± 1,0	55,0 ^a ± 1,0	39,0 ^a ± 1,0	30,0 ^b ± 1,0
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se min (All min)	69,0 ^a ± 1,0	52,0 ^c ± 1,0	51,0 ^b ± 1,0	39,0 ^c ± 1,0	22,5 ^c ± 1,0	10,0 ^a ± 1,0
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se max (All max)	69,0 ^a ± 1,0	36,0 ^a ± 1,0	27,0 ^a ± 1,0	18,0 ^b ± 1,0	11,0 ^b ± 1,0	9,0 ^a ± 1,0

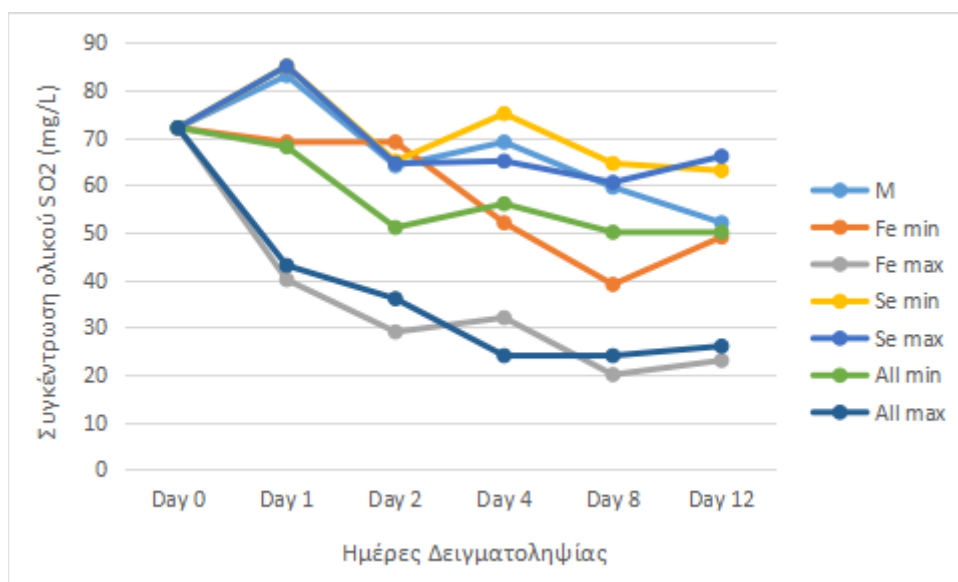
*Οι τιμές με διαφορετικό εκθέτη παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 και η σύγκρισή τους πραγματοποιήθηκε ανά στήλη.



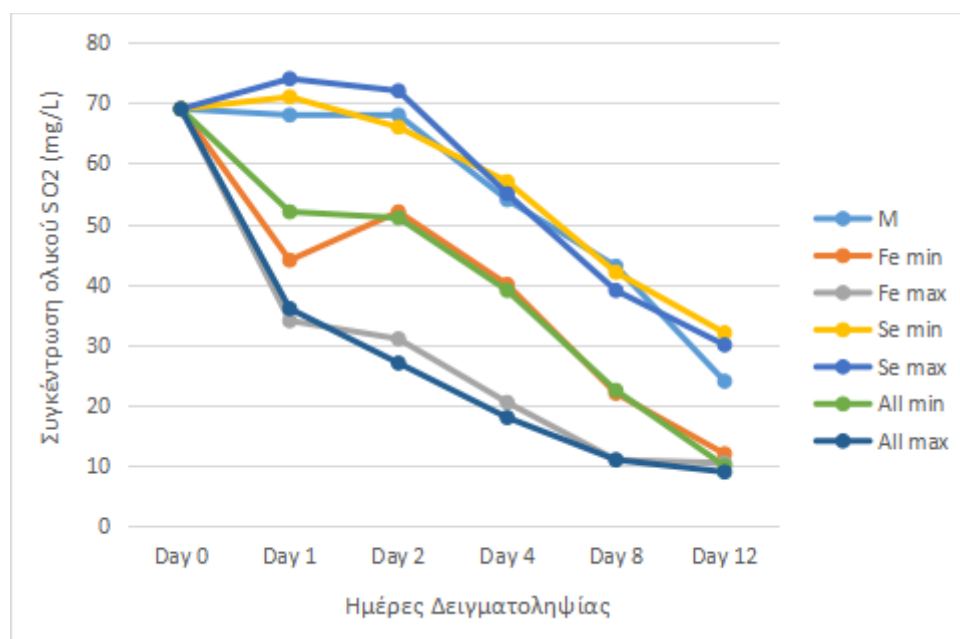
Διάγραμμα 16: Συγκέντρωση ολικού SO₂ στα δείγματα την 1^η ημέρα δειγματοληψίας για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 50 °C.



Διάγραμμα 17: Συγκέντρωση ολικού SO₂ στα δείγματα την 12^η ημέρα δειγματοληψίας για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 50 °C.



Διάγραμμα 18: Μεταβολή της συγκέντρωσης του ολικού SO₂ στα δείγματα της ημέρες δειγματοληψίας 0, 1, 2, 4, 8 και 12 για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 35 °C.



Διάγραμμα 19: Μεταβολή της συγκέντρωσης του ολικού SO₂ στα δείγματα της ημέρες δειγματοληψίας 0, 1, 2, 4, 8 και 12 για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 50 °C.

Ήδη από την 1^η ημέρα στο πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 35 °C, τα δείγματα άρχισαν να εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους (Πίνακας 9, Διάγραμμα 14). Πιο συγκεκριμένα από την 1^η έως και την 12^η ημέρα τα δείγματα FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se max και FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ max παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικά διαφορές με το δείγμα του Μάρτυρα, αλλά και με τα υπόλοιπα δείγματα. Το αποτέλεσμα αυτό σχετίζεται με τις υψηλές συγκεντρώσεις FeCl₂·4H₂O και H₂O₂ που έχουν προστεθεί στα δείγματα αυτά. Σε αυτό το συμπέρασμα κατέληξαν και οι Sioumis et al. (2005) στην μελέτη τους. Επιπροσθέτως στατιστικά σημαντικές διαφορές σε

σχέση με το Μάρτυρα παρουσίασε το δείγμα $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2$ min την 1^η, την 4^η και την 8^η ημέρα δειγματοληψίας, καθώς και το δείγμα $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se}$ min την 1^η, την 2^η, την 4^η και την 8^η ημέρα δειγματοληψίας (Πίνακας 9). Ωστόσο την 12^η ημέρα δειγματοληψίας τα δείγματα αυτά δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 σε σχέση με το Μάρτυρα στο πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 35 °C (Διάγραμμα 15). Επομένως η μείωση του ολικού θειώδους ανυδρίτη στα δείγματα με την μικρότερη συγκέντρωση $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ και H_2O_2 είναι ανάλογη της μείωσης του ολικού θειώδους στο δείγμα του Μάρτυρα λόγω οξείδωσής. Ακόμη όσον αφορά τα δείγματα Se min και Se max, στο πείραμα οξείδωσης στους 35 °C, από την 1^η έως και την 8^η ημέρα δειγματοληψίας αυτά δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με το δείγμα του Μάρτυρα. Αντιθέτως, την 12^η ημέρα δειγματοληψίας τα δείγματα με τις προσθήκες Se και στις δυο συγκεντρώσεις (Se min, Se max) παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές με το δείγμα του Μάρτυρα, όπως και με τα υπόλοιπα δείγματα (Διάγραμμα 15). Συνεπώς στα δείγματα με τις προσθήκες Se η μείωση του ολικού θειώδους ανυδρίτη λόγω οξείδωσης ήταν μικρότερη, σε σχέση με το δείγμα του Μάρτυρα αλλά και με τα υπόλοιπα δείγματα.

Όσον αφορά τα αποτελέσματα του ολικού SO_2 στο πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 50 °C, φαίνεται ότι τα δείγματα $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se max}$ και $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 \text{ max}$ εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με το Μάρτυρα, αλλά και με τα υπόλοιπα δείγματα, ήδη από την 1^η ημέρα δειγματοληψίας (Πίνακας 10, Διάγραμμα 16). Τα δείγματα αυτά συνέχισαν να παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με το Μάρτυρα από την 2^η έως και την 12^η ημέρα δειγματοληψίας (Διάγραμμα 17). Επιπλέον στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με το δείγμα του Μάρτυρα έχουν και τα δείγματα $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2$ min και $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se min}$ από την 1^η έως και την 12^η ημέρα ως προς την συγκέντρωση του ολικού SO_2 (Διάγραμμα 12). Τα δεδομένα αυτά δεν συμφωνούν με τα δεδομένα του πειράματος ταχείας οξείδωσης στους 35 °C (Πίνακας 9). Επομένως στο πείραμα οξείδωσης στους 50 °C οι προσθήκες του $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ και H_2O_2 συντέλεσαν στη μεγαλύτερη εξάντληση του ολικού SO_2 ανεξαρτήτως των συγκεντρώσεων (μέγιστης ή ελάχιστης) που προστέθηκαν την ημέρα 0 στο κρασί

Επιπλέον, τα δείγματα Se min και Se max εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 με το δείγμα του Μάρτυρα κυρίως την 12^η ημέρα δειγματοληψίας του τεστ επιταχυνόμενης οξείδωσης στους 50 °C (Διάγραμμα 17). Ωστόσο την 12^η και τελική ημέρα του πειράματος δεν παρουσιάστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων Se min και Se max. Τα δεδομένα αυτά συμφωνούν με τα δεδομένα του πειράματος ταχείας οξείδωσης στους 35 °C (Πίνακας 9). Συμπερασματικά οι προσθήκες σεληνίου, ανεξαρτήτως συγκέντρωσης (μέγιστης ή ελάχιστης), απέτρεψαν τη μείωση του ολικού θειώδους ανυδρίτη και στα δυο πειράματα ταχείας οξείδωσης των 35 και 50 °C.

Τέλος, με βάση τα αποτελέσματα των Πινάκων 9 και 10 παρατηρείται ότι οι ποσότητες του ολικού θειώδους ανυδρίτη των δειγμάτων μειώνονται με το χρόνο και στις δυο θερμοκρασίες των πειραμάτων οξείδωσης (Διαγράμματα 18 και 19). Με την αύξηση της θερμοκρασίας οι αντιδράσεις οξείδωσης φαίνεται να επιταχύνονται γι' αυτό και η μείωση των ποσοτήτων του ολικού θειώδους ανυδρίτη στο χρόνο εμφανίζεται μεγαλύτερη στο πείραμα ταχείας οξείδωσης των 50 °C .

2.2 Ελεύθερος θειώδης ανυδρίτης

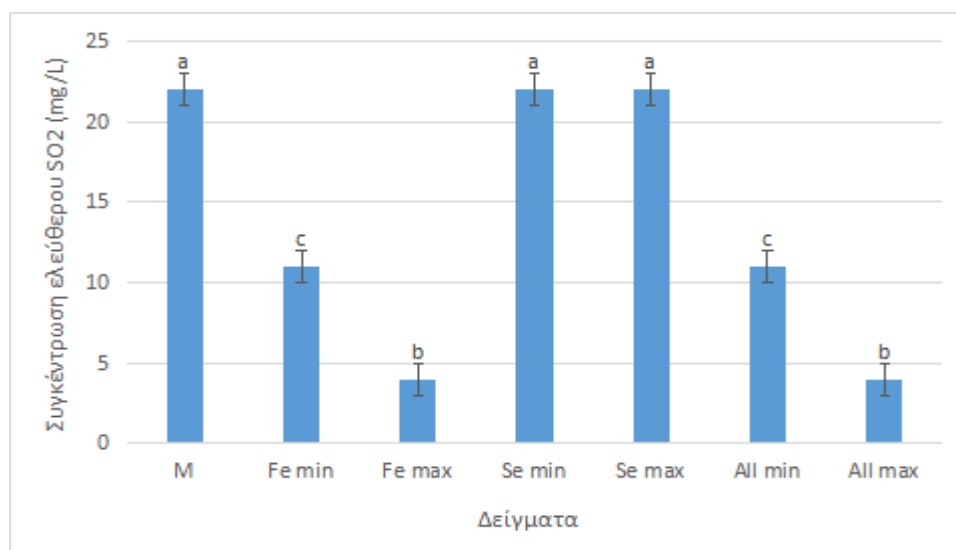
Στους Πίνακες 11 και 12 απεικονίζονται τα αποτελέσματα του ελεύθερου θειώδη ανυδρίτη για τα πειράματα οξείδωσης στους 35 και στους 50 °C για τις ημέρες δειγματοληψίας 0, 1, 2, 4, 8 και 12.

Σημειώνεται ότι οι τιμές όπου εμφανίζουν διαφορετικό εκθέτη παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05. Όλες οι ποσότητες του ελεύθερου θειώδη ανυδρίτη στους Πίνακες 10 και 11 είναι εκφρασμένες σε χιλιοστογραμμάρια SO₂ ανά λίτρο (mg/L).

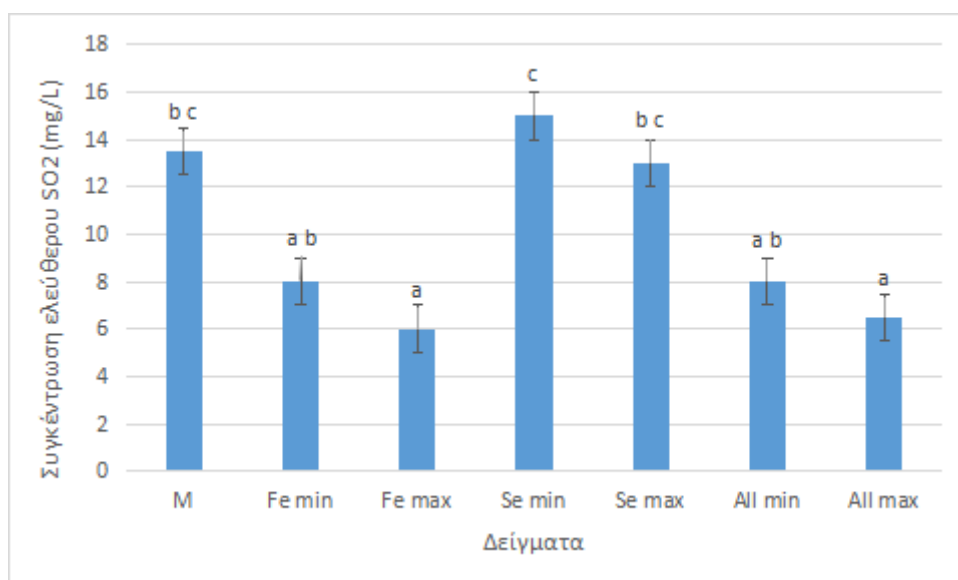
Πίνακας 10: Αποτελέσματα ελεύθερου θειώδους ανυδρίτη για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στη θερμοκρασία των 35 °C.*

Δείγματα 35 °C	Ημέρα 0	Ημέρα 1	Ημέρα 2	Ημέρα 4	Ημέρα 8	Ημέρα 12
Μάρτυρας (Control)	17,0 ^a ± 1,0	22,0 ^a ± 1,0	19,0 ^b ± 1,0	16,0 ^b ± 1,0	13,5 ^{bc} ± 1,0	13,5 ^{bc} ± 1,0
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ min (Fe min)	17,0 ^a ± 1,0	11,0 ^c ± 1,0	11,0 ^a ± 1,0	7,0 ^a ± 1,0	5,5 ^a ± 1,0	8,0 ^{ab} ± 1,0
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ max (Fe max)	17,0 ^a ± 1,0	4,0 ^b ± 1,0	6,0 ^{ac} ± 1,0	4,0 ^a ± 1,0	8,0 ^{ac} ± 1,0	6,0 ^a ± 1,0
Se min	17,0 ^a ± 1,0	22,0 ^a ± 1,0	18,0 ^b ± 1,0	16,0 ^b ± 1,0	15,0 ^b ± 1,0	15,0 ^c ± 1,0
Se max	17,0 ^a ± 1,0	22,0 ^a ± 1,0	18,0 ^b ± 1,0	16,5 ^b ± 1,0	18,0 ^b ± 1,0	13,0 ^{bc} ± 1,0
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se min (All min)	17,0 ^a ± 1,0	11,0 ^c ± 1,0	10,5 ^a ± 1,0	8,5 ^a ± 1,0	7,1 ^a ± 1,0	8,0 ^{ab} ± 1,0
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se max (All max)	17,0 ^a ± 1,0	4,0 ^b ± 1,0	3,0 ^c ± 1,0	5,0 ^a ± 1,0	4,0 ^a ± 1,0	6,5 ^a ± 1,0

*Οι τιμές με διαφορετικό εκθέτη παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 και η σύγκρισή τους πραγματοποιήθηκε ανά στήλη.



Διάγραμμα 20: Συγκέντρωση ελεύθερου SO₂ στα δείγματα την 1^η ημέρα δειγματοληψίας για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 35 °C.

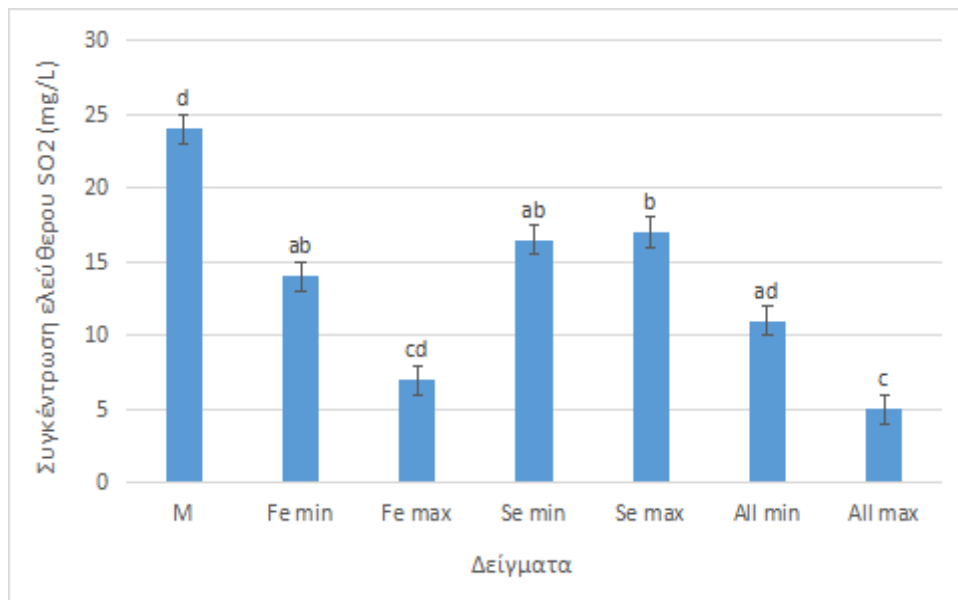


Διάγραμμα 21: Συγκέντρωση ελεύθερου SO₂ στα δείγματα την 12^η ημέρα δειγματοληψίας για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 35 °C.

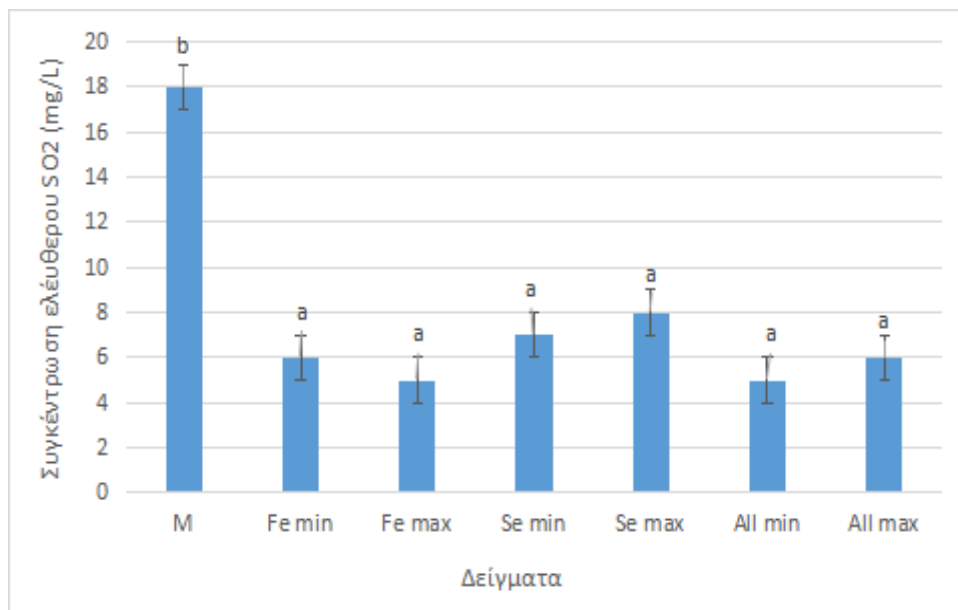
Πίνακας 12: Αποτελέσματα ελεύθερου θειώδους ανυδρίτη για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στη θερμοκρασία των 50 °C.*

Δείγματα 50 °C	Ημέρα 0	Ημέρα 1	Ημέρα 2	Ημέρα 4	Ημέρα 8	Ημέρα 12
Μάρτυρας (Control)	3,0 ^a ± 1,0	24,0 ^d ± 1,0	18,0 ^b ± 1,0	12,0 ^c ± 1,0	12,0 ^b ± 1,0	18,0 ^b ± 1,0
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ min (Fe min)	3,0 ^a ± 1,0	14,0 ^{ab} ± 1,0	9,0 ^a ± 1,0	7,0 ^{abc} ± 1,0	5,5 ^a ± 1,0	6,0 ^a ± 1,0
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ max (Fe max)	3,0 ^a ± 1,0	7,0 ^{cd} ± 1,0	5,0 ^a ± 1,0	6,0 ^{ab} ± 1,0	7,0 ^{ab} ± 1,0	5,0 ^a ± 1,0
Se min	3,0 ^a ± 1,0	16,5 ^{ab} ± 1,0	17,0 ^b ± 1,0	11,5 ^{bc} ± 1,0	9,0 ^{ab} ± 1,0	7,0 ^a ± 1,0
Se max	3,0 ^a ± 1,0	17,0 ^b ± 1,0	17,0 ^b ± 1,0	9,0 ^{abc} ± 1,0	6,5 ^{ab} ± 1,0	8,0 ^a ± 1,0
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se min (All min)	3,0 ^a ± 1,0	11,0 ^{ad} ± 1,0	8,0 ^a ± 1,0	8,0 ^{abc} ± 1,0	7,5 ^{ab} ± 1,0	5,0 ^a ± 1,0
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se max (All max)	3,0 ^a ± 1,0	5,0 ^c ± 1,0	5,0 ^a ± 1,0	5,0 ^a ± 1,0	6,0 ^a ± 1,0	6,0 ^a ± 1,0

*Οι τιμές με διαφορετικό εκθέτη παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 και η σύγκρισή τους πραγματοποιήθηκε ανά στήλη.



Διάγραμμα 22: Συγκέντρωση ελεύθερου SO₂ στα δείγματα την 1^η ημέρα δειγματοληψίας για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 50 °C.



Διάγραμμα 23: Συγκέντρωση ελεύθερου SO₂ στα δείγματα την 12^η ημέρα δειγματοληψίας για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 50 °C.

Όσον αφορά τα αποτελέσματα του πειράματος ταχείας οξειδωσης στους 35 °C παρατηρείται ότι οι τιμές του ελεύθερου θειώδους ανυδρίτη μειώθηκαν σε όλα τα δείγματα την 12^η ημέρα δειγματοληψίας σε σχέση με τη ημέρα 0. Από την 1^η ημέρα δειγματοληψίας τα δείγματα $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se max}$ και $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 \text{ max}$ εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές από το δείγμα του Μάρτυρα του πειράματος ταχείας οξειδωσης στη θερμοκρασία των 35 °C (Πίνακας 11 και Διάγραμμα 20). Την 12^η και τελευταία ημέρα δειγματοληψίας τα δείγματα αυτά συνέχισαν να παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 από το δείγμα του Μάρτυρα, αλλά και από τα υπόλοιπα δείγματα (Διάγραμμα 21). Επιπλέον τα δείγματα $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se max}$ και $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 \text{ max}$ ήταν αυτά που παρουσίασαν και την μικρότερη συγκέντρωση ελεύθερου θειώδους ανυδρίτη σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα. Συνεπώς στα δείγματα αυτά οξειδώθηκε μεγαλύτερη ποσότητα ελεύθερου θειώδους ανυδρίτη, αφήνοντας τα χωρίς προστασία από περαιτέρω οξειδώσεις. Αυτός είναι και ένας από τους λόγους όπου τα δείγματα με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις του μίγματος $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ και H_2O_2 , στο πείραμα οξειδωσης στους 35 °C, παρουσίασαν και τις υψηλότερες τιμές του συντελεστή k (ευοξειδωτά δείγματα) αλλά και τις μεγαλύτερες τιμές απορροφήσεων στα 420 nm οι οποίες σχετίζονται με τα αυξημένα ποσοστά καφετιάσματος.

Ακόμη τα δείγματα $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se min}$ και $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 \text{ min}$ εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές από την 1^η έως και την 12^η ημέρα δειγματοληψίας σε σχέση με το δείγμα του Μάρτυρα, αλλά και με τα δείγματα $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se max}$ και $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 \text{ max}$ (Διαγράμματα 20 και 21). Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς τις τιμές του ελεύθερου θειώδους ανυδρίτη μεταξύ των δειγμάτων $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se min}$, $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 \text{ min}$ και $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se max}$ $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 \text{ max}$ οφείλονται στις διαφορετικές συγκεντρώσεις του μίγματος $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ και H_2O_2 που τους προστέθηκε την ημέρα 0. Στα δείγματα με τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις του μίγματος αυτού παρατηρήθηκε λιγότερη μείωση της συγκέντρωσης του ελεύθερου θειώδους κατά το διάστημα των 12 ημερών.

Επίσης τα δείγματα με τις προσθήκες σεληνίου: Se min , Se max δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με το δείγμα του Μάρτυρα από την ημέρα 0 έως και την 12^η ημέρα δειγματοληψίας στο πείραμα οξειδωσης στους 35°C (Διάγραμμα 21). Επομένως η μείωση της συγκέντρωσης του ελεύθερου θειώδους ανυδρίτη στα δείγματα Se min και Se max από την 0 έως και την 12^η ημέρα είναι ανάλογη της μείωσης της συγκέντρωσης του ελεύθερου θειώδους ανυδρίτη του Μάρτυρα στο πείραμα των 35 °C.

Όσον αφορά το πείραμα ταχείας αμαύρωσης στους 50 °C τα δείγματα $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se max}$ και $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 \text{ max}$, με την υψηλότερη συγκέντρωση του μίγματος $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2$, δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους από την ημέρα 0 έως την 12^η και τελευταία ημέρα του πειράματος (Πίνακας 12). Ωστόσο τα δείγματα $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se max}$ και $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 \text{ max}$ παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με το Μάρτυρα, ως προς τη συγκέντρωση του ελεύθερου θειώδους από την 1^η έως και την 12^η ημέρα δειγματοληψίας (Διαγράμματα 22 και 23).

Επιπλέον τα δείγματα $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se min}$ και $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 \text{ min}$, με τη μικρότερη συγκέντρωση του μίγματος $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2$, παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς τη συγκέντρωση του ελεύθερου θειώδους με το δείγμα του Μάρτυρα οι οποίες είναι εμφανείς από την 1^η κιόλας ημέρα δειγματοληψίας του πειράματος επιταχυνόμενης οξειδωσης στους 50 °C (Διάγραμμα 22). Επομένως κατά την 12^η ημέρα τα δείγματα: $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 \text{ min}$, $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 \text{ max}$, $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se min}$ και $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se max}$ εμφάνισαν όλα

στατιστικά σημαντικές διαφορές με το δείγμα του Μάρτυρα ως προς την συγκέντρωση του ελεύθερου θειώδους (Πίνακας 12, Διάγραμμα 23). Το αποτέλεσμα αυτό δεν συμφωνεί με τα αντίστοιχα αποτελέσματα του ελεύθερου θειώδους ανυδρίτη στο πείραμα οξείδωσης στους 35 °C. Συμπερασματικά, η αύξηση της θερμοκρασίας στους 50 °C στο πείραμα ταχείας οξείδωσης επιτάχυνε την οξείδωση του ελεύθερου θειώδους ανυδρίτη σε όλα δείγματα όπου είχε προστεθεί ο δισθενής σίδηρος και το υπεροξείδιο του υδρογόνου είτε στην ελάχιστη, είτε στη μέγιστη τους συγκέντρωση.

Όσον αφορά τα δείγματα Se min και Se max κυρίως κατά την 12^η ημέρα δειγματοληψίας παρουσίασαν εμφανείς στατιστικά σημαντικές διαφορές με το δείγμα του Μάρτυρα, ως προς την συγκέντρωση του ελεύθερου θειώδους ανυδρίτη στο πείραμα οξείδωσης στην θερμοκρασία των 50 °C (Πίνακας 12, Διάγραμμα 23). Ωστόσο τα δείγματα Se min και Se max δεν έχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 με τα δείγματα στα οποία είχε προστεθεί ο δισθενής σίδηρος και το υπεροξείδιο του υδρογόνου, δηλαδή τα $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2$ min, $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2$ max, $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se min}$ και $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se max}$, για το πείραμα ταχείας αμαύρωσης στους 50 °C. Τα αποτελέσματα αυτά δεν συμφωνούν με τα αντίστοιχα αποτελέσματα του πειράματος οξείδωσης στους 35 °C ως προς την συγκέντρωση του ελεύθερου θειώδους.

Καταλήγοντας η αύξηση της θερμοκρασίας στους 50 °C μείωσε τις ποσότητες του ελεύθερου θειώδους ανυδρίτη, και κατά συνέπεια και την αναγωγική ικανότητα όλων δειγμάτων ανεξαρτήτως των προσθηκών και των συγκεντρώσεων σεληνίου, σιδήρου και υπεροξειδίου του υδρογόνου που υπέστησαν στην αρχή κάθε πειράματος ταχείας οξείδωσης, αφήνοντας έτσι το κρασί χωρίς προστασία από περαιτέρω οξειδώσεις.

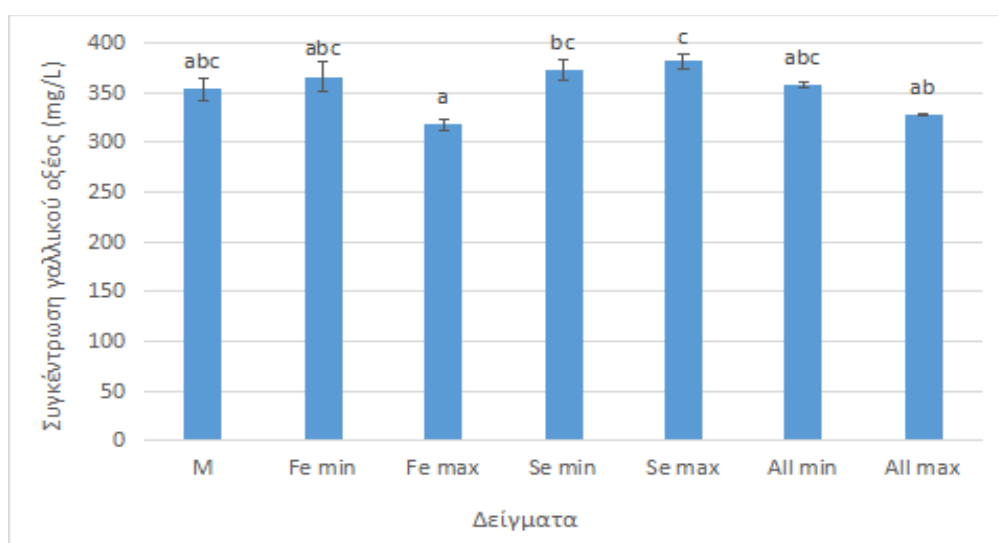
3. Ολικά φαινολικά συστατικά

Η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών συστατικών στη παρούσα μελέτη προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Follin – Ciocalteu με βάση το πρωτόκολλο του OIV (OIV-MA-AS2-10). Ακολουθούν οι Πίνακες 13 και 14 με τα αποτελέσματα των ολικών φαινολικών ενώσεων για τα πειράματα ταχείας οξείδωσης στους 35 °C και στους 50 °C και τις ημέρες δειγματοληψίας 0, 1, 2, 4, 8 και 12. Οι συγκεντρώσεις των ολικών φαινολών είναι εκφρασμένες σε χιλιοστογραμμάρια ισοδύναμων γαλλικού οξέος στο λίτρο (mg/L). Σημειώνεται ότι οι τιμές όπου εμφανίζουν διαφορετικό εκθέτη παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 ($p < 0,05$).

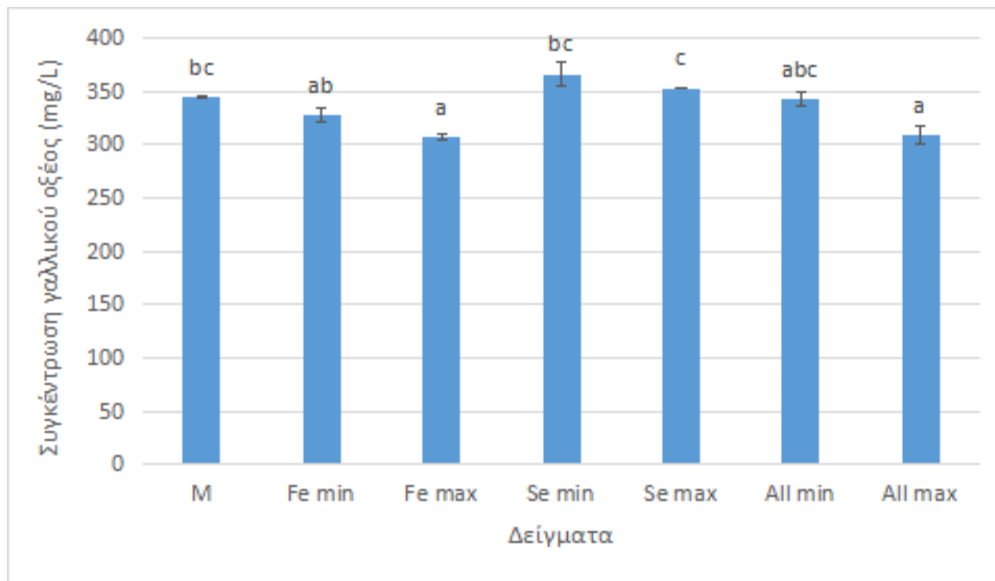
Πίνακας 13 : Αποτελέσματα ολικών φαινολικών συστατικών για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στη θερμοκρασία των 35 °C.*

Δείγματα 35 °C	Ημέρα 0	Ημέρα 1	Ημέρα 2	Ημέρα 4	Ημέρα 8	Ημέρα 12
Μάρτυρας (Control)	337,617 ^a ± 21,602	353,818 ^{a,b,c} ± 10,801	355,618 ^{a,b} ± 7,201	324,566 ^a ± 7,651	345,267 ^{b,c} ± 1,350	356,518 ^a ± 14,401
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ min (Fe min)	332,666 ^a ± 2,250	366,419 ^{a,b,c} ± 15,301	343,917 ^{a,b} ± 3,600	364,619 ^a ± 55,804	328,166 ^{a,b} ± 5,850	349,318 ^a ± 1,800
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ max (Fe max)	314,665 ^a ± 14,851	318,265 ^a ± 5,850	320,515 ^a ± 9,901	341,667 ^a ± 0,450	307,014 ^a ± 2,700	306,564 ^a ± 7,651
Se min	352,918 ^a ± 7,201	372,720 ^{b,c} ± 9,901	373,170 ^b ± 7,651	368,219 ^a ± 9,001	366,419 ^c ± 11,701	335,817 ^a ± 0
Se max	349,318 ^a ± 3,600	382,170 ^c ± 7,651	356,518 ^{a,b} ± 0,900	343,017 ^a ± 7,201	353,368 ^{b,c} ± 0,450	340,317 ^a ± 5,400
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se min (All min)	329,516 ^a ± 0,900	357,868 ^{a,b,c} ± 3,150	343,017 ^{a,b} ± 1,800	327,716 ^a ± 16,201	342,567 ^{a,b,c} ± 6,751	354,268 ^a ± 20,252
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se max (All max)	333,566 ^a ± 4,050	327,716 ^{a,b} ± 0,900	331,316 ^a ± 10,801	258,410 ^a ± 9,901	309,264 ^a ± 7,651	338,067 ^a ± 13,951

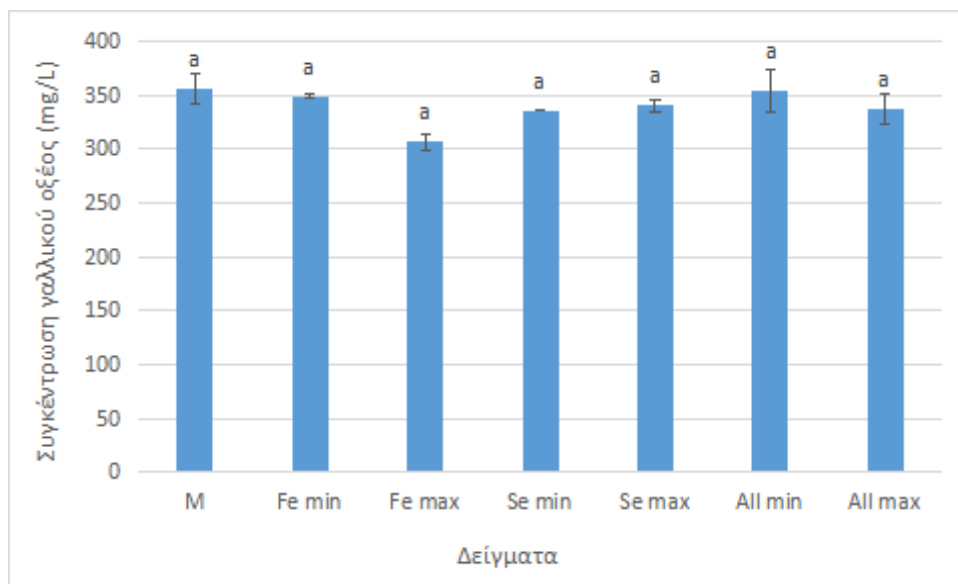
*Οι τιμές με διαφορετικό εκθέτη παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 και η σύγκρισή τους πραγματοποιήθηκε ανά στήλη.



Διάγραμμα 24: Συγκέντρωση ολικών φαινολικών συστατικών στα δείγματα την 1^η ημέρα δειγματοληψίας για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 35 °C.



Διάγραμμα 25: Συγκέντρωση ολικών φαινολικών συστατικών στα δείγματα την 8^η ημέρα δειγματοληψίας για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 35 °C.

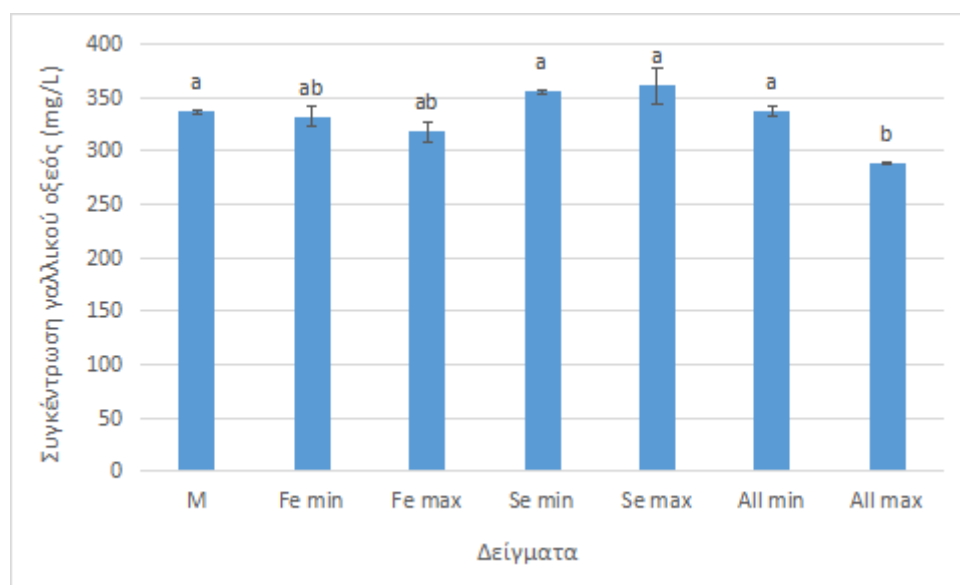


Διάγραμμα 26: Συγκέντρωση ολικών φαινολικών συστατικών στα δείγματα την 12^η ημέρα δειγματοληψίας για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 35 °C.

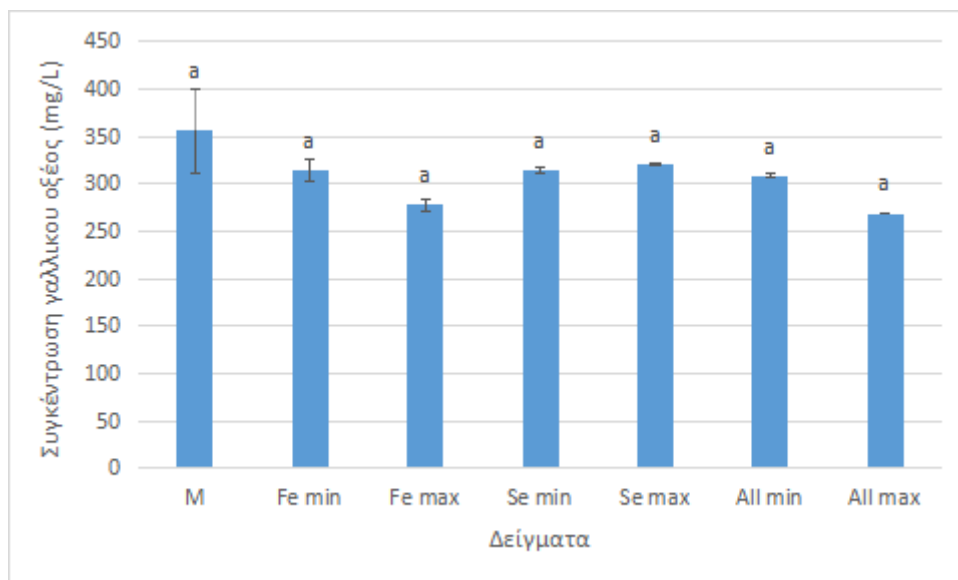
Πίνακας 14 : Αποτελέσματα ολικών φαινολικών συστατικών για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στη θερμοκρασία των 50 °C.*

Δείγματα 50 °C	Ημέρα 0	Ημέρα 1	Ημέρα 2	Ημέρα 4	Ημέρα 8	Ημέρα 12
Μάρτυρας (Control)	373,170 ^{ab} ± 6,751	352,918 ^a ± 20,702	336,717 ^a ± 1,800	376,770 ^a ± 22,952	344,367 ^a ± 25,652	355,618 ^a ± 45,004
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ min	355,618 ^{ab} ± 14,401	333,116 ^a ± 4,500	332,216 ^{ab} ± 9,001	353,818 ^a ± 20,702	298,914 ^a ± 4,500	313,765 ^a ± 11,251
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ max	337,617 ^{ab} ± 18,902	318,715 ^a ± 8,101	317,815 ^{ab} ± 9,901	355,618 ^a ± 20,702	292,613 ^a ± 15,301	277,762 ^a ± 5,850
Se min	388,021 ^a ± 0,900	335,817 ^a ± 0,900	355,618 ^a ± 1,800	374,070 ^a ± 6,751	332,216 ^a ± 3,600	314,215 ^a ± 3,600
Se max	392,971 ^a ± 18,451	316,015 ^a ± 8,101	361,019 ^a ± 16,201	374,520 ^a ± 6,301	314,215 ^a ± 17,101	320,965 ^a ± 0,450
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se min	383,520 ^{ab} ± 2,700	309,264 ^a ± 4,950	336,717 ^a ± 4,500	362,819 ^a ± 5,400	321,415 ^a ± 11,701	308,364 ^a ± 2,250
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se max	320,065 ^b ± 0,450	317,365 ^a ± 8,551	288,563 ^b ± 0,450	350,668 ^a ± 3,150	298,014 ^a ± 5,400	268,761 ^a ± 0,450

*Οι τιμές με διαφορετικό εκθέτη παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 και η σύγκρισή τους πραγματοποιήθηκε ανά στήλη.



Διάγραμμα 27: Συγκέντρωση ολικών φαινολικών συστατικών στα δείγματα την 2^η ημέρα δειγματοληψίας για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 50 °C.



Διάγραμμα 28: Συγκέντρωση ολικών φαινολικών συστατικών στα δείγματα την 12^η ημέρα δειγματοληψίας για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 50 °C.

Οι φαινολικές ουσίες του κρασιού μπορούν να λειτουργήσουν με δύο διαφορετικούς τρόπους, εφόσον είναι σε θέση να δράσουν και ως δότες υδρογόνου (H^+) αλλά και ως αναγωγικά μέσα (αντιοξειδωτικά) (Sioumis et al., 2005). Ως αναγωγικά σώματα οι φαινολικές ενώσεις λειτουργούν ως δότες ηλεκτρονίων και οξειδώνονται οι ίδιες, έναντι άλλων συστατικών του κρασιού. Ωστόσο οι πολυφαινόλες μπορούν να δράσουν και ως παράγοντες οξείδωσης με το να προσλάβουν ηλεκτρόνια και να αναχθούν. Και στις δύο περιπτώσεις οι συγκεντρώσεις τους θα έπρεπε να μειώνονται, με τη συμμετοχή τους στις αντιδράσεις οξειδοαναγωγής.

Στο πείραμα ταχείας οξείδωσης στη θερμοκρασία των 35 °C δε σημειώθηκε μείωση της συγκέντρωσης των ολικών φαινολών με το χρόνο (Πίνακας 13). Συνεπώς η συμμετοχή τους στις αντιδράσεις οξειδοαναγωγής, ακόμα και στα δείγματα όπου είχε προστεθεί το μίγμα: $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ και H_2O_2 , δεν φάνηκε να επηρεάζει την ολική συγκέντρωση των πολυφαινολών στο πείραμα αυτό. Παρ' όλα αυτά κατά την 8^η ημέρα δειγματοληψίας τα δείγματα με τις προσθήκες του μίγματος σιδήρου και υπεροξειδίου του υδρογόνου στις μέγιστες αλλά και στις ελάχιστες συγκεντρώσεις τους, εμφάνισαν μείωση στη συγκέντρωση των ολικών φαινολικών ουσιών σε αντίθεση με τις προηγούμενες ημέρες δειγματοληψίας.

Πιο συγκεκριμένα, τα δείγματα με την προθήκη του μίγματος $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ και H_2O_2 στη μέγιστη συγκέντρωση, $FeCl_2 \cdot 4H_2O + H_2O_2 + Se \text{ max}$ και $FeCl_2 \cdot 4H_2O + H_2O_2 \text{ max}$, δεν σημείωσαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 με το δείγμα του Μάρτυρα ως προς τη συγκέντρωση των ολικών φαινολών, την ημέρα 0, την 1^η, την 2^η ακόμα και την 12^η που είναι και η τελευταία ημέρα δειγματοληψίας στο τεστ οξείδωσης των 35 °C (Πίνακας 13, Διαγράμματα 24 και 26). Το αποτέλεσμα αυτό δε συνάδει τόσο με τον υψηλό συντελεστή του ρυθμού μεταβολής του χρώματος k , όσο και με τον αυξημένο δείκτη καστανότητας στα δείγματα αυτά στη θερμοκρασία των 35 °C (Πίνακες 3 και 5). Ωστόσο μόνο κατά την 8^η ημέρα δειγματοληψίας τα δείγματα $FeCl_2 \cdot 4H_2O + H_2O_2 + Se \text{ max}$ και $FeCl_2 \cdot 4H_2O + H_2O_2 \text{ max}$ εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με το Μάρτυρα ως προς την συγκέντρωση των ολικών φαινολικών ουσιών στο πείραμα ταχείας αμαύρωσης στους 35 °C (Διάγραμμα 25).

Επίσης στατιστικά σημαντικές διαφορές μόνο κατά την 8^η ημέρα δειγματοληψίας παρουσίασαν και τα δείγματα $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se min}$ και $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 \text{ min}$, σε σχέση με το Μάρτυρα ως προς την συγκέντρωση των ολικών φαινολικών ουσιών του πειράματος οξείδωσης στη θερμοκρασία των 35 °C (Διάγραμμα 25). Ωστόσο οι τιμές των συγκεντρώσεων τους την ημέρα αυτή είναι πιο κοντινές στις τιμές του Μάρτυρα, σε σχέση με τα αποτελέσματα των δειγμάτων: $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se max}$ και $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 \text{ max}$ (Πίνακας 13). Επομένως κατά την 8^η ημέρα του πειράματος οξείδωσης στους 35 °C, οι μέγιστες συγκεντρώσεις του μίγματος $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ και H_2O_2 πιθανόν να επηρέασαν την συγκέντρωση των ολικών φαινολικών συστατικών του κρασιού.

Επίσης, το δείγμα με τη μικρότερη συγκέντρωση σεληνίου: Se min σημείωσε στατιστικά σημαντικές διαφορές με το Μάρτυρα κατά την 8^η ημέρα του πειράματος οξείδωσης στη θερμοκρασία των 35 °C ($p < 0,05$) (Διάγραμμα 25). Αντιθέτως το δείγμα με την προσθήκη μέγιστης συγκέντρωσης σεληνίου: Se max εμφάνισε στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς τη συγκέντρωση των φαινολικών ουσιών με το Μάρτυρα μόνο κατά την 1^η ημέρα του πειράματος (Διάγραμμα 24), ενώ τις υπόλοιπες ημέρες δειγματοληψιών δεν προέκυψαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους.

Αντιθέτως στο πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 50 °C, τα δείγματα με τις προσθήκες σεληνίου Se min και Se max δεν εμφάνισαν σε καμία ημέρα στατιστικά σημαντικές διαφορές με το δείγμα του Μάρτυρα, ως προς τη συγκέντρωση των φαινολικών ουσιών (Πίνακας 14).

Επίσης στο πείραμα ταχείας οξείδωσης στη θερμοκρασία των 50 °C σημειώθηκε μείωση στη συγκέντρωση των ολικών φαινολικών ουσιών με το χρόνο σε όλα τα δείγματα (Πίνακας 14). Μεγαλύτερη μείωση της συγκέντρωσης εμφάνισαν τα δείγματα με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις του μίγματος $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ και H_2O_2 , δηλαδή τα δείγματα $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se max}$ και $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 \text{ max}$, ενώ η μικρότερη πτώση σημειώθηκε στα δείγματα με τη μικρότερη συγκέντρωση $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ και H_2O_2 : $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se min}$ και $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 \text{ min}$, σε σχέση με το Μάρτυρα. Ωστόσο η μικρότερη μείωση στη συγκέντρωση των πολυφαινολών σε σχέση με το δείγμα του Μάρτυρα και στην θερμοκρασία αποθήκευσης των 50 °C, παρατηρείται στα δείγματα με τις προσθήκες σεληνίου: Se min και Se max (Πίνακας 14). Ωστόσο διαπιστώνεται ότι η αυξημένη συγκέντρωση σεληνίου στο δείγμα Se max δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντικές διαφορές σε καμία ημέρα του πειράματος οξείδωσης στους 50 °C σε σχέση με το δείγμα Se min , με τη μικρότερη συγκέντρωση σεληνίου. Συνεπώς η προσθήκη σεληνίου είτε στη μέγιστη, είτε στην ελάχιστη συγκέντρωση δεν φάνηκε να επηρέασε την συγκέντρωση των ολικών φαινολικών ουσιών στο πείραμα ταχείας αμύρωσης στη θερμοκρασία των 50 °C.

Ακόμα τα δείγματα: $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se max}$, $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 \text{ max}$ και $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 \text{ min}$ παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 με το δείγμα του Μάρτυρα, μόνο κατά την 2^η ημέρα δειγματοληψίας του πειράματος οξείδωσης στους 50 °C (Διάγραμμα 27). Ενώ το δείγμα $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se min}$ δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές από το δείγμα του Μάρτυρα, ως προς τη συγκέντρωση των ολικών φαινολών, σε καμία ημέρα του πειράματος οξείδωσης στους 50 °C (Διάγραμμα 28).

Συμπερασματικά η προσθήκη σεληνίου στα δείγματα $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se max}$ και $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se min}$ δεν φάνηκε να επηρέασε την ολική συγκέντρωση των φαινολικών ουσιών στο πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 50 °C. Αντιθέτως η αύξηση της θερμοκρασίας και η καταλυτική δράση του μετάλλου σιδήρου φαίνεται να επηρέασε την συγκέντρωση των πολυφαινολών λόγω της επιτάχυνσης των αντιδράσεων οξείδωσης. Όσο μεγαλύτερη ήταν η συγκέντρωση του μίγματος

FeCl₂·4H₂O και H₂O₂ που είχε προστεθεί στα δείγματα, τόσο μεγαλύτερη ήταν και η πτώση της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών συστατικών στο πείραμα ταχείας οξείδωσης στη θερμοκρασία των 50°C.

Εν κατακλείδι, τα αποτελέσματα των συγκεντρώσεων των ολικών φαινολικών ουσιών δεν εμφάνισαν μεγάλη συσχέτιση τόσο με τα αποτελέσματα του συντελεστή μεταβολής του χρώματος k (Πίνακες 5 και 6) όσο και με το δείκτη καστανώσης κάθε δείγματος αντίστοιχα (Πίνακες 3 και 4) και κυρίως στο πείραμα ταχείας οξείδωσης στη θερμοκρασία των 35 °C. Το συμπέρασμα αυτό, ως προς την συγκέντρωση των ολικών φαινολικών ουσιών, έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των Fernandez-Zurbano et al. (1995) και των Sioumis et al. (2005), αλλά σε αντίθεση με άλλα (Simpson, 1982). Το φαινόμενο αυτό μπορεί να εξηγηθεί τόσο από τον πολυλειτουργικό χαρακτήρα των φαινολικών ουσιών στον οίνο, όσο και από το γεγονός ότι δεν είναι όλες οι πολυφαινόλες το ίδιο σημαντικές καθώς δεν παράγουν όλες προϊόντα οξείδωσης με την ίδια ικανότητα εμφάνισης του οξειδωτικού καφετιάσματος στο κρασί (Rossi & Singleton, 1966; Sioumis et al., 2005). Για παράδειγμα, ερευνητές έδειξαν ότι τα προϊόντα οξείδωσης του κλάσματος της κατεχίνης είναι από τα πιο σημαντικά και σε μεγάλο βαθμό υπεύθυνα για την αμαύρωση των λευκών οίνων (Rossi & Singleton, 1966). Με βάση όλων των παραπάνω σημειώνεται ότι τόσο η αύξηση της θερμοκρασίας 50 °C, όσο και η προσθήκη του μίγματος FeCl₂·4H₂O και H₂O₂ στις μέγιστες συγκεντρώσεις συντέλεσαν στη μείωση της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών ουσιών στα δείγματα.

4. Φλαβανόλες

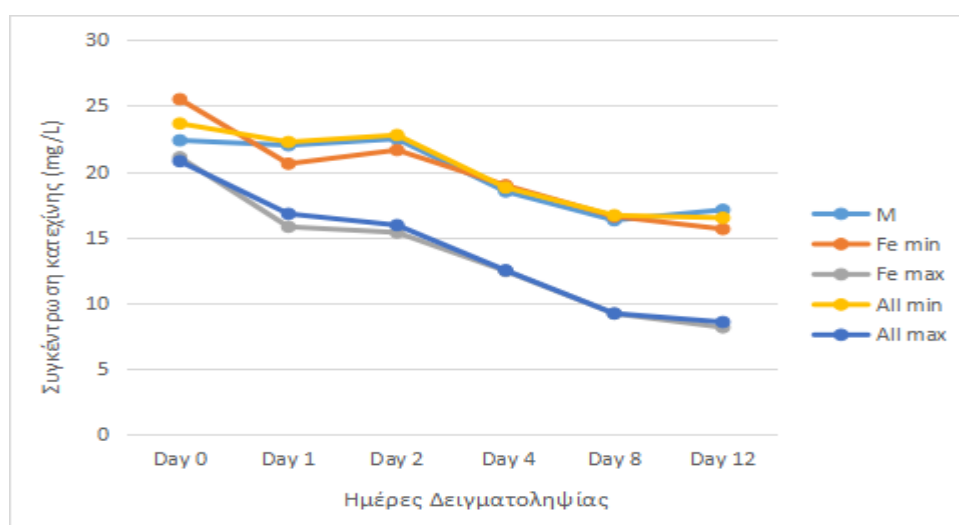
Οι φλαβανόλες είναι ένα από τα κύρια φαινολικά συστατικά σε ποσότητα τόσο στο γλεύκος όσο και στο λευκό κρασί και ξεχωρίζουν για την ενεργή συμμετοχή τους στις αντιδράσεις οξειδοαναγωγής και κατά συνέπεια στο καφέτιασμα (browning) των λευκών οίνων. Από την οξείδωση της (+)-κατεχίνης και της (-)-επικατεχίνης παράγονται ορθο-κινόνες οι οποίες πολυμερίζονται και σχηματίζουν ενώσεις καφέ χρώματος οι οποίες θεωρούνται πιθανή αιτία της αμαύρωσης των λευκών οίνων (Guyot et al., 1996; Bors et al., 2000; Sioumis et al., 2006). Επίσης έχει αποδειχθεί ότι κυρίως η κατεχίνη συσχετίζεται με τον συντελεστή του ρυθμού μεταβολής του χρώματος k, λόγω της υψηλής αντιοξειδωτικής της ικανότητάς (Sioumis et al., 2006). Αυτό φέρει ως αποτέλεσμα μεγαλύτερη οξείδωση της κατεχίνης και συνεπώς την αύξηση του οξειδωτικού καφετιάσματος.

Παρακάτω απεικονίζονται οι Πίνακες 15 και 16 με τα αποτελέσματα των ολικών φλαβανολών για τα πειράματα οξείδωσης στους 35 και στους 50 °C για τις ημέρες δειγματοληψίας 0, 1, 2, 4, 8 και 12. Οι συγκεντρώσεις των ολικών φλαβανολών των δειγμάτων που απεικονίζονται στους ακόλουθους πίνακες και διαγράμματα είναι εκφρασμένες σε χιλιοστογραμμάρια ισοδύναμων κατεχίνης ανά λίτρο (mg/L). Σημειώνεται ότι οι τιμές όπου εμφανίζουν διαφορετικό εκθέτη παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05.

Πίνακας 15: Αποτελέσματα ολικών φλαβονολών για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στη θερμοκρασία των 35 °C.*

Δείγματα 35 °C	Ημέρα 0	Ημέρα 1	Ημέρα 2	Ημέρα 4	Ημέρα 8	Ημέρα 12
Μάρτυρας (Control)	22,364 ^{ab} ± 0,069	21,989 ^a ± 1,250	22,475 ^a ± 0,653	18,477 ^a ± 0,125	16,297 ^a ± 1,250	17,088 ^a ± 0,319
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ min (Fe min)	25,488 ^b ± 0,916	20,587 ^{ab} ± 0,708	21,628 ^a ± 0,666	18,949 ^a ± 0,347	16,588 ^a ± 0,542	15,630 ^b ± 0,500
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ max (Fe max)	21,073 ^{ab} ± 1,027	15,797 ^b ± 0,833	15,366 ^b ± 0,403	12,437 ^b ± 0,583	9,202 ^b ± 0,208	8,160 ^c ± 0
Se min	25,002 ^{ab} ± 0,625	21,823 ^a ± 0,583	21,656 ^a ± 0	20,295 ^a ± 0,528	17,213 ^a ± 0,028	16,977 ^a ± 0,125
Se max	24,378 ^{ab} ± 1,083	21,698 ^a ± 1,430	22,906 ^a ± 0,194	18,685 ^a ± 1,277	16,921 ^a ± 0,347	16,352 ^{ab} ± 0,028
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se min (All min)	23,642 ^{ab} ± 0,875	22,239 ^a ± 0,916	22,767 ^a ± 0,028	18,782 ^a ± 0,430	16,672 ^a ± 0,236	16,477 ^{ab} ± 0,014
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se max (All max)	20,781 ^a ± 0,819	16,783 ^{ab} ± 0,819	15,922 ^b ± 0,208	12,492 ^b ± 0,389	9,215 ^b ± 0,278	8,563 ^c ± 0,042

*Οι τιμές με διαφορετικό εκθέτη παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 και η σύγκρισή τους πραγματοποιήθηκε ανά στήλη.

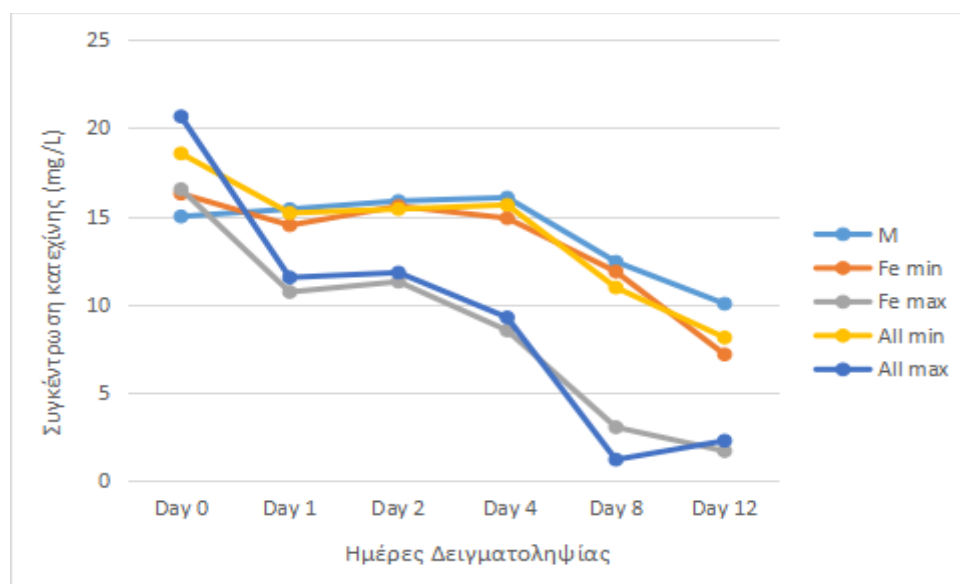


Διάγραμμα 29: Μεταβολή της συγκέντρωσης των φλαβονολών, εκφρασμένη ως κατεχίνη σε mg/L, τις ημέρες δειγματοληψίας 0, 1^η, 2^η, 4^η, 8^η και 12^η στο πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 35 °C.

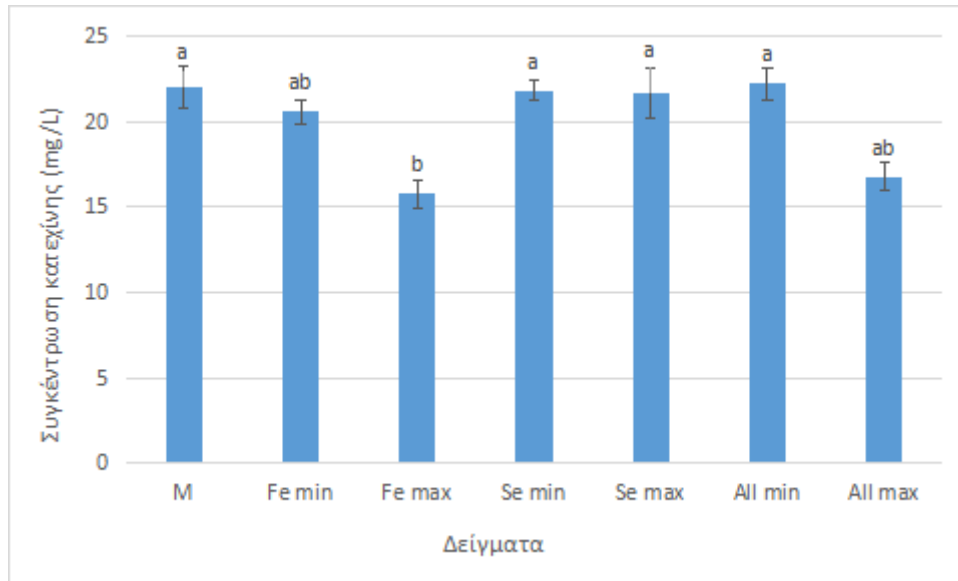
Πίνακας 16: Αποτελέσματα ολικών φλαβονολών για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στη θερμοκρασία των 50 °C.*

Δείγματα 50 °C	Ημέρα 0	Ημέρα 1	Ημέρα 2	Ημέρα 4	Ημέρα 8	Ημέρα 12
Μάρτυρας (Control)	14,991 ^a ± 0,444	15,408 ^a ± 0,056	15,866 ^{ab} ± 0,181	16,061 ^a ± 0,014	12,42 ^{ab} ± 0,181	10,048 ^{ad} ± 0,778
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ min (Fe min)	16,283 ^{ab} ± 0,181	14,492 ^a ± 0,083	15,575 ^a ± 0,167	14,894 ^d ± 0,069	11,867 ^{ab} ± 0,764	7,174 ^c ± 0,292
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ max (Fe max)	16,533 ^{abc} ± 0,569	10,715 ^b ± 0,417	11,298 ^c ± 0,278	8,535 ^b ± 0,042	3,051 ^d ± 0,028	1,704 ^b ± 0,153
Se min	17,324 ^{bc} ± 0,389	15,505 ^a ± 0,430	16,866 ^b ± 0,097	15,908 ^a ± 0,194	12,159 ^{ab} ± 0,056	11,590 ^a ± 0,264
Se max	15,158 ^a ± 0,139	15,533 ^a ± 0,486	16,394 ^{ab} ± 0,042	16,199 ^a ± 0,042	13,048 ^b ± 0,056	11,409 ^a ± 0,305
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se min (All min)	18,560 ^c ± 0,458	15,186 ^a ± 0,222	15,408 ^a ± 0,361	15,644 ^a ± 0,208	10,965 ^a ± 0,083	8,132 ^{cd} ± 0,222
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se max (All max)	20,656 ^d ± 0,083	11,534 ^b ± 0,042	11,812 ^c ± 0,097	9,271 ^c ± 0,028	1,218 ^c ± 0,167	2,287 ^b ± 0,347

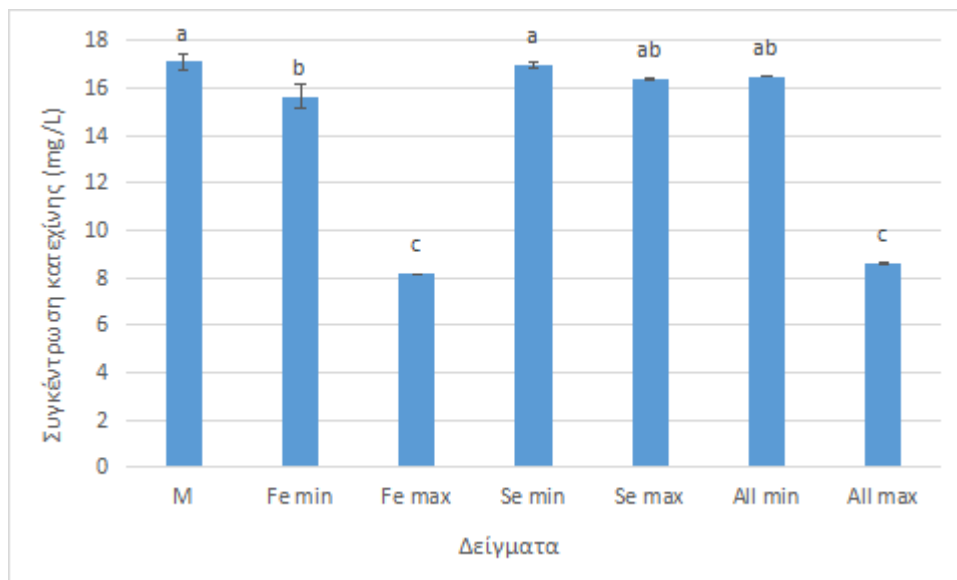
*Οι τιμές με διαφορετικό εκθέτη παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 και η σύγκρισή τους πραγματοποιήθηκε ανά στήλη.



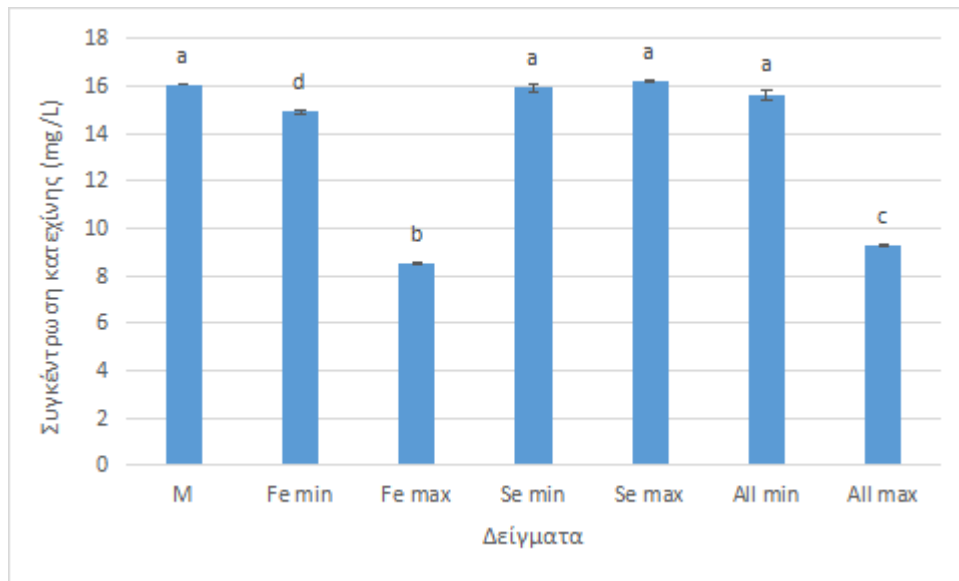
Διάγραμμα 30: Μεταβολή της συγκέντρωσης των φλαβονολών τις ημέρες δειγματοληψίας 0, 1^η, 2^η, 4^η, 8^η και 12^η στο πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 50 °C.



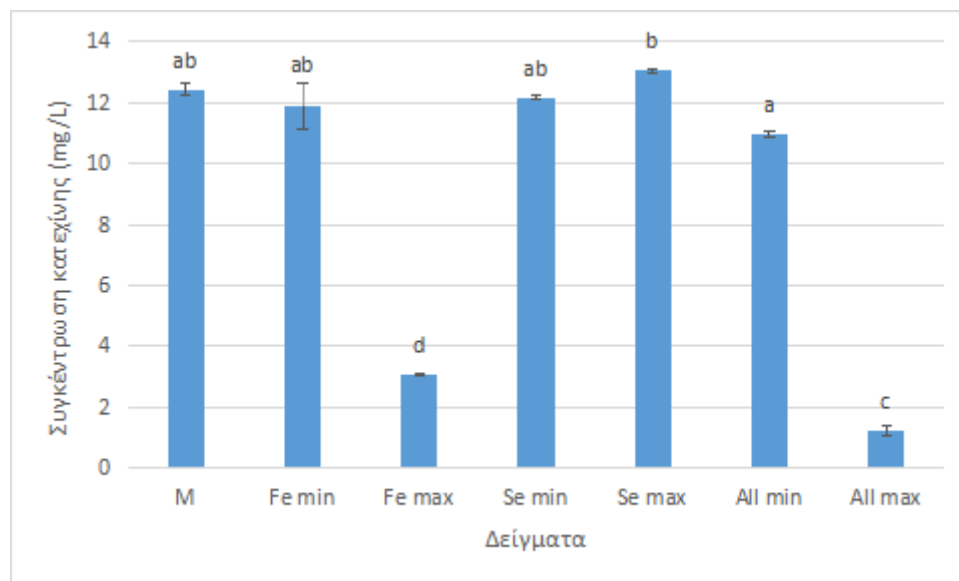
Διάγραμμα 31: Συγκέντρωση φλαβονολών στα δείγματα την 1^η ημέρα δειγματοληψίας για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 35 °C.



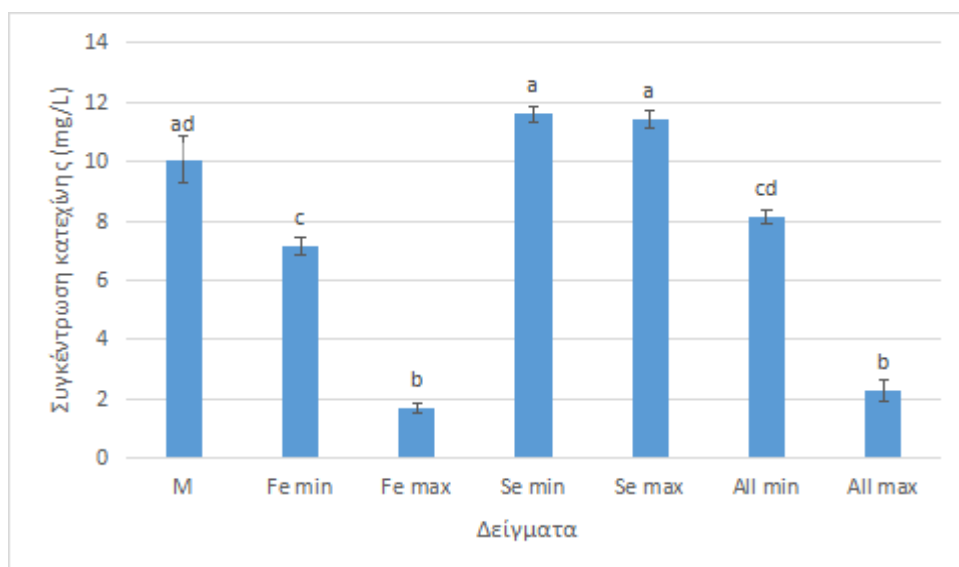
Διάγραμμα 32: Συγκέντρωση φλαβονολών στα δείγματα την 12^η ημέρα δειγματοληψίας για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 35 °C.



Διάγραμμα 33: Συγκέντρωση φλαβονολών στα δείγματα την 4^η ημέρα δειγματοληψίας για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 50 °C.



Διάγραμμα 34: Συγκέντρωση φλαβονολών στα δείγματα την 8^η ημέρα δειγματοληψίας για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 50 °C.



Διάγραμμα 35: Συγκέντρωση φλαβονολών στα δείγματα την 12^η ημέρα δειγματοληψίας για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 50 °C.

Αρχικά με βάση τους Πίνακες 15 και 16 διαπιστώνεται ότι σε όλα τα δείγματα υπάρχει μείωση στη συγκέντρωση των ολικών φλαβονολών από την 0 έως την 12^η ημέρα δειγματοληψίας τόσο στο πείραμα οξείδωσης στους 35 °C όσο και σε αυτό στους 50 °C (Διαγράμματα 29 και 30). Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε συμφωνία με την μελέτη στην οποία οι επιστήμονες διαπίστωσαν μείωση των ολικών φλαβονολών σε λευκούς οίνους που είχαν αποθηκευτεί στη θερμοκρασία των 18 °C για 12 μήνες (Kallithraka et al., 2009). Παρομοίως μείωση στη συγκέντρωση της κατεχίνης σε λευκό οίνο κατά την αποθήκευσή του σε θερμοκρασία 15 - 20 °C για 12 μήνες παρατήρησαν και οι Recamales et al. στο πείραμα τους (2006).

Στο πείραμα οξείδωσης στους 35 °C, την μεγαλύτερη πτώση στη συγκέντρωση των ολικών φλαβονολών με το χρόνο παρουσιάζουν τα δείγματα με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις του μίγματος $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ και H_2O_2 , δηλαδή τα δείγματα: $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se max}$ και $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 \text{ max}$ (Διάγραμμα 29). Τα δείγματα αυτά δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους, ως προς την συγκέντρωση των ολικών φλαβονολών, μέχρι και την 12^η που ήταν και η τελευταία ημέρα δειγματοληψίας (Πίνακας 15). Ωστόσο παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές με το δείγμα του Μάρτυρα, αλλά και με τα υπόλοιπα δείγματα, από την 1^η έως και την 12^η ημέρα στο τεστ ταχείας αμαύρωσης στους 35 °C (Διαγράμματα 31 και 32). Επίσης η προσθήκη σεληνίου στο δείγμα $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se max}$ δεν έδειξε να επηρεάζει τη συγκέντρωση των φλαβονολών, εφόσον οι τιμές στα δείγματα $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se max}$ και $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 \text{ max}$ δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 μεταξύ τους σε καμία ημέρα του πειράματος οξείδωσης στη θερμοκρασία των 35 °C.

Επιπλέον το δείγμα $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 \text{ min}$, με την προσθήκη $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ και H_2O_2 στη μικρότερη συγκέντρωση, από την 1^η έως την 8^η ημέρα δειγματοληψίας δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές με το δείγμα του Μάρτυρα. Ωστόσο, λόγω της οξείδωσης των φλαβονολών, κατά την 12^η ημέρα διαπιστώθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές του δείγματος $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 \text{ min}$ με το δείγμα του Μάρτυρα (Διάγραμμα 32). Ακόμη, το δείγμα $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se min}$ δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά με το δείγμα του Μάρτυρα ως προς τη συγκέντρωση των ολικών φλαβονολών, από την ημέρα 0 έως και την 8^η. Με βάση όλων των παραπάνω

συμπεραίνεται ότι στα δείγματα με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ και H_2O_2 , η οξείδωση και η πτώση της συγκέντρωσης των φλαβονολών ήταν μεγαλύτερη σε σύγκριση με αυτής του Μάρτυρα αλλά και των υπολοίπων δειγμάτων.

Επιπλέον τα δείγματα Se min και Se max δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 σε σχέση με το Μάρτυρα ως προς την συγκέντρωση των φλαβονολών σε καμία ημέρα του τεστ επιταχυνόμενης οξείδωσης στους 35 °C (Πίνακας 15). Συνεπώς η συγκέντρωση σεληνίου είτε μέγιστη (Se max), είτε ελάχιστη (Se min) δεν επηρέασε την οξείδωση των φλαβονολών στον οίνο για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στη θερμοκρασία των 35 °C.

Όσον αφορά το πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 50 °C, το δείγμα $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2$ max παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς την συγκέντρωση των φλαβονολών με το δείγμα $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se max}$ κατά την 4^η και την 8^η ημέρα δειγματοληψίας (Διαγράμματα 33 και 34). Ωστόσο κατά την 12^η ημέρα τα δείγματα αυτά δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 μεταξύ τους (Διάγραμμα 35). Επίσης στον Πίνακα 16 παρατηρείται ότι τα δείγματα $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2$ max και $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se max}$ κατά την 12^η ημέρα σημείωσαν στατιστικά σημαντικές διαφορές με το δείγμα του Μάρτυρα, αλλά και τα υπόλοιπα δείγματα, ως προς την συγκέντρωση των ολικών φλαβονολών. Συγκεκριμένα στα δείγματα στα οποία είχε προστεθεί ο $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ και το H_2O_2 στη μέγιστη συγκέντρωση σημειώνεται μεγαλύτερη πτώση της συγκέντρωσης των φλαβονολών μέσω των αντιδράσεων οξείδωσης, γι' αυτό και την 12^η ημέρα δειγματοληψίας τα δείγματα $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2$ max και $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se max}$ παρουσίασαν τις χαμηλότερες τιμές σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα του πειράματος στη θερμοκρασία των 50 °C.

Επιπλέον στο ίδιο πείραμα καταγράφηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 μεταξύ του δείγματος $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2$ min και του δείγματος του Μάρτυρα ως προς την συγκέντρωση των φλαβονολών κατά την 4^η και 12^η ημέρα (Διαγράμματα 33 και 35). Επίσης το δείγμα $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se min}$ σημείωσε στατιστικά σημαντική διαφορά με το δείγμα του Μάρτυρα μόνο την 8^η και κυρίως την 12^η και τελευταία ημέρα δειγματοληψίας, όπου η συγκέντρωση των φλαβονολών παρουσίασε ξεκάθαρη πτώση μέσω της οξείδωσης στο πείραμα ταχείας αμαύρωσης των 50 °C (Διαγράμματα 34 και 35).

Όσον αφορά τα δείγματα με τις προσθήκες σεληνίου: Se min και Se max δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 με το δείγμα του Μάρτυρα ως προς την συγκέντρωση των φλαβονολών τις ημέρες 1, 2, 4 και 8 (Πίνακας 16). Αντιθέτως, στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα δείγματα αυτά και στον Μάρτυρα σημειώθηκαν κατά την 12^η ημέρα δειγματοληψίας (Διάγραμμα 35). Παρ' όλα αυτά η συγκέντρωση σεληνίου είτε μέγιστη, είτε ελάχιστη δεν φάνηκε να επηρεάζει την οξείδωση των φλαβονολών στο πείραμα οξείδωσης στη θερμοκρασία των 50 °C.

5. Υδροξυκινναμωμικά οξέα

Τα υδροξυκινναμωμικά οξέα, όπως και οι φλαβανόλες, επίσης διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην οξείδωση των οίνων, λόγω της ικανότητάς τους να συμμετέχουν στις αντιδράσεις οξειδοαναγωγής κυρίως στα λευκά γλεύκη και οίνους (Guyot et al., 1996, Sioumis et al., 2005). Επιπλέον, σύμφωνα με τους Guyot et al. (1996) οι ενώσεις με το χαρακτήρα ορθο-

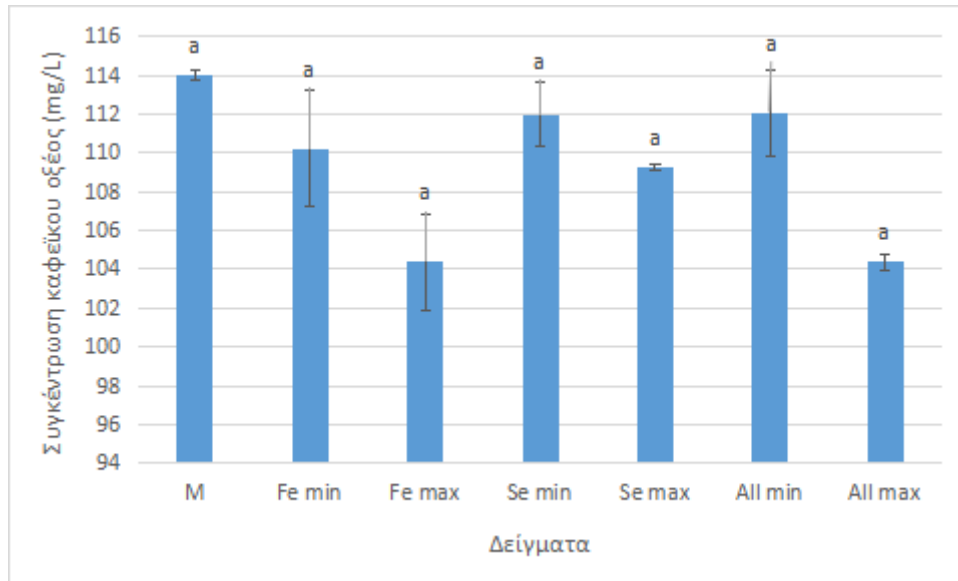
διυδροξυφαινόλης, όπως είναι το καφεϊκό οξύ, αφού οξειδωθούν σχηματίζουν κίτρινα-καφέ προϊόντα μέσω του πολυμερισμού των ορθο-κινονών. Ωστόσο ευρήματα υποστηρίζουν ότι η ανάπτυξη της αμαύρωσης του λευκού κρασιού δεν παρουσιάζει σημαντική συσχέτιση με την οξείδωση των υδροξυκινναμωμικών οξέων, αλλά σχετίζεται κυρίως με αυτή της κατεχίνης και της επικατεχίνης (Fernandez-Zurbano et al., 1998, Sioumis et al., 2006). Επίσης και σε επόμενη μελέτη αποδείχθηκε ότι υπάρχει υψηλότερη συσχέτιση μεταξύ της επικατεχίνης στη μείωση της οξειδωτικής ισχύος σε λευκούς οίνους, σε σύγκριση με τα υδροξυκινναμωμικά οξέα (Makris et al., 2003, Sioumis et al., 2006). Καθώς γι' αυτά διαπιστώθηκε ότι δεν είναι αποτελεσματικά στην ελάττωση της καταλυτικής δράσης του μετάλλου σιδήρου (Fe^{2+}).

Στη συνέχεια ακολουθούν οι Πίνακες 17 και 18 με τα αποτελέσματα των υδροξυκινναμωμικών οξέως για τα πειράματα οξείδωσης στους 35 °C και στους 50 °C για τις ημέρες δειγματοληψίας 0, 1, 2, 4, 8 και 12. Οι συγκεντρώσεις των υδροξυκινναμωμικών οξέων είναι εκφρασμένες σε χιλιοστογραμμάρια καφεϊκού οξέος ανά λίτρο (mg/L). Σημειώνεται ότι οι τιμές όπου εμφανίζουν διαφορετικό εκθέτη παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 ($p < 0,05$).

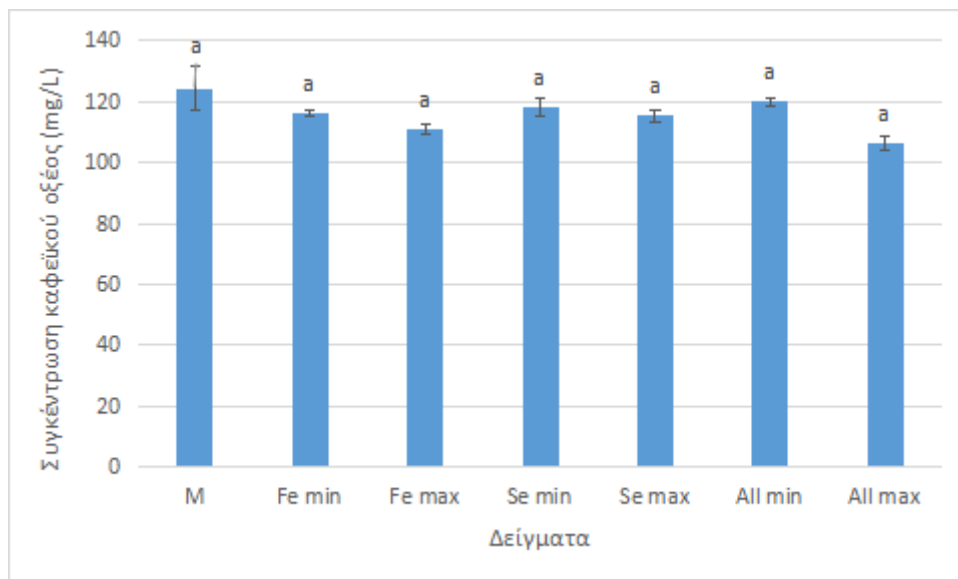
Πίνακας 17: Αποτελέσματα υδροξυκινναμωμικών οξέων για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στη θερμοκρασία των 35 °C.*

Δείγματα 35 °C	Ημέρα 0	Ημέρα 1	Ημέρα 2	Ημέρα 4	Ημέρα 8	Ημέρα 12
Μάρτυρας (Control)	114,025 ^a ± 0,228	105,277 ^a ± 0,761	107,407 ^a ± 0,761	107,103 ^a ± 1,826	108,929 ^a ± 1,673	124,218 ^a ± 7,074
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ min (Fe min)	110,222 ^a ± 2,967	109,993 ^a ± 3,195	108,092 ^a ± 2,662	120,339 ^a ± 13,692	106,342 ^a ± 0,609	116,307 ^a ± 0,989
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ max (Fe max)	104,364 ^a ± 2,434	100,485 ^a ± 0,076	103,680 ^a ± 0,989	103,147 ^a ± 4,412	104,212 ^a ± 1,826	110,830 ^a ± 1,750
Se min	111,971 ^a ± 1,673	109,689 ^a ± 2,586	110,222 ^a ± 1,750	108,548 ^a ± 2,814	106,951 ^a ± 1,978	118,057 ^a ± 3,195
Se max	109,233 ^a ± 0,152	109,309 ^a ± 0,271	105,734 ^a ± 0,913	104,212 ^a ± 0,152	109,157 ^a ± 1,902	115,166 ^a ± 1,826
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se min (All min)	112,047 ^a ± 2,206	111,591 ^a ± 0,837	104,441 ^a ± 2,510	105,201 ^a ± 0,380	107,635 ^a ± 2,967	119,882 ^a ± 1,217
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se max (All max)	104,364 ^a ± 0,456	109,157 ^a ± 6,618	103,832 ^a ± 1,750	97,747 ^a ± 0,380	103,300 ^a ± 3,803	106,418 ^a ± 2,358

*Οι τιμές με διαφορετικό εκθέτη παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 και η σύγκρισή τους πραγματοποιήθηκε ανά στήλη.



Διάγραμμα 36: Συγκέντρωση υδροξυκινναμικών οξέων στα δείγματα την 0^η ημέρα δειγματοληψίας για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 35 °C.

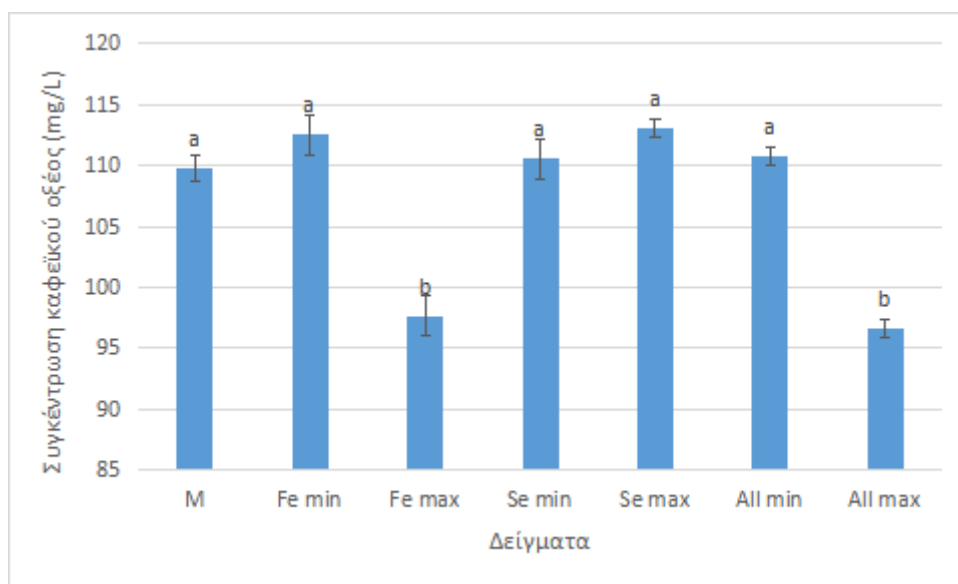


Διάγραμμα 37: Συγκέντρωση υδροξυκινναμικών οξέων στα δείγματα την 12^η ημέρα δειγματοληψίας για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 35 °C.

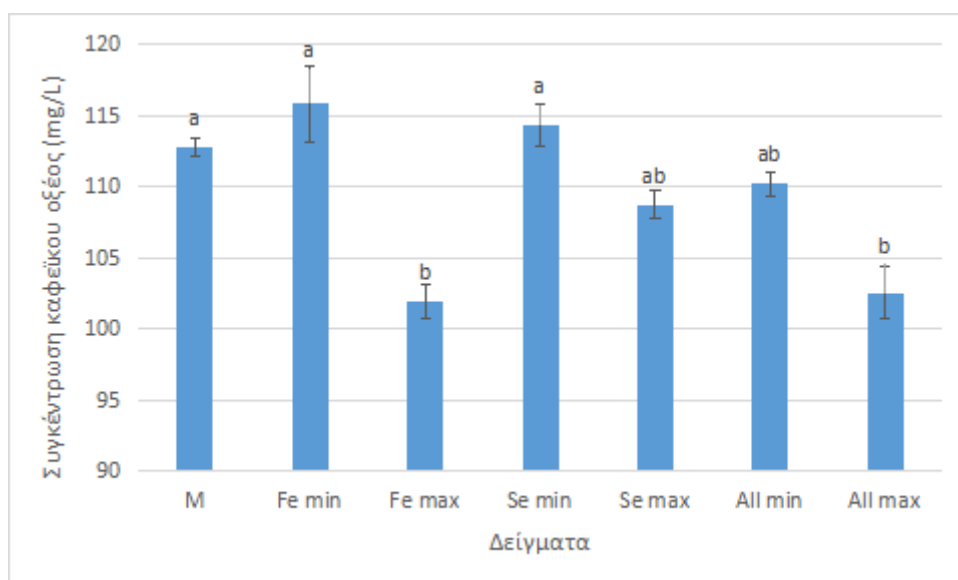
Πίνακας 18: Αποτελέσματα υδροξυκινναμικών οξέων για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στην θερμοκρασία των 50 °C.*

Δείγματα 50 °C	Ημέρα 0	Ημέρα 1	Ημέρα 2	Ημέρα 4	Ημέρα 8	Ημέρα 12
Μάρτυρας (Control)	113,949 ^a ± 0,609	109,689 ^a ± 1,065	109,917 ^a ± 0,228	114,634 ^a ± 1,141	112,732 ^a ± 0,609	118,665 ^a ± 0,304
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ min (Fe min)	112,580 ^a ± 0,152	112,504 ^a ± 1,597	107,940 ^a ± 0,076	116,687 ^a ± 0,609	115,851 ^a ± 2,662	114,862 ^{ab} ± 0,609
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ max (Fe max)	107,787 ^a ± 1,597	97,671 ^b ± 1,673	98,431 ^b ± 0,304	100,789 ^b ± 2,054	101,930 ^b ± 1,217	111,895 ^{ab} ± 0,685
Se min	112,960 ^a ± 0,076	110,526 ^a ± 1,597	113,721 ^a ± 2,358	109,537 ^a ± 1,978	114,329 ^a ± 1,445	115,622 ^{ab} ± 0,761
Se max	108,776 ^a ± 0,761	113,036 ^a ± 0,761	114,481 ^a ± 0,076	111,743 ^a ± 0,532	108,700 ^{ab} ± 0,989	118,969 ^a ± 3,195
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se min (All min)	109,157 ^a ± 1,902	110,754 ^a ± 0,761	111,667 ^a ± 2,282	111,515 ^a ± 1,217	110,222 ^{ab} ± 0,837	118,057 ^{ab} ± 1,673
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se max (All max)	109,005 ^a ± 2,358	96,606 ^b ± 0,761	97,214 ^b ± 1,217	98,051 ^b ± 1,597	102,539 ^b ± 1,826	110,146 ^b ± 0,761

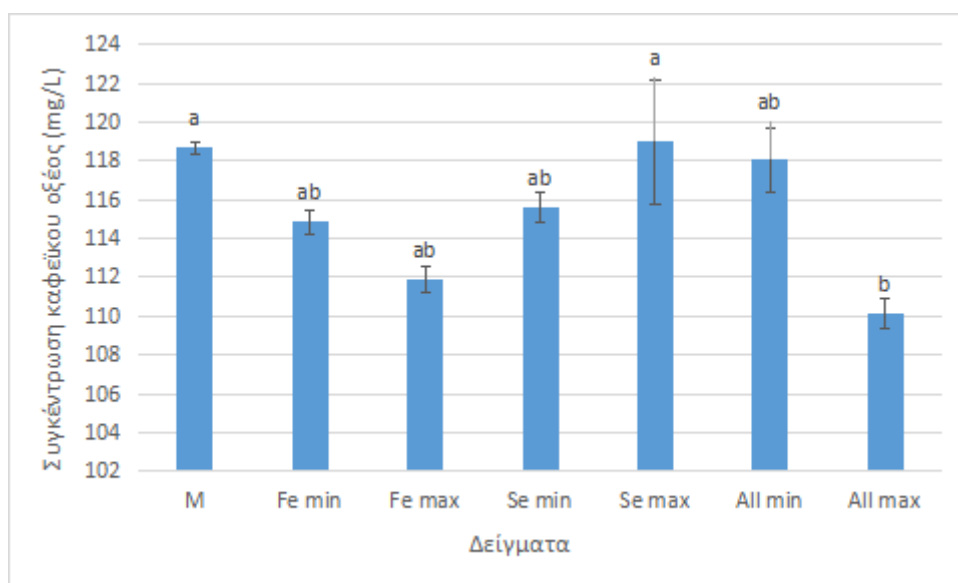
*Οι τιμές με διαφορετικό εκθέτη παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 και η σύγκρισή τους πραγματοποιήθηκε ανά στήλη.



Διάγραμμα 38: Συγκέντρωση υδροξυκινναμικών οξέων στα δείγματα την 1^η ημέρα δειγματοληψίας για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 50 °C.



Διάγραμμα 39: Συγκέντρωση υδροξυκινναμωμικών οξέων στα δείγματα την 8^η ημέρα δειγματοληψίας για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 50 °C.



Διάγραμμα 40: Συγκέντρωση υδροξυκινναμωμικών οξέων στα δείγματα την 12^η ημέρα δειγματοληψίας για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 50 °C.

Στο πείραμα επιταχυνόμενης οξείδωσης στους 35 °C οι συγκεντρώσεις των υδροξυκινναμωμικών οξέων φάνηκαν αρχικά να μειώνονται στο χρόνο, συγκεκριμένα τις ημέρες δειγματοληψίας 1^η, 2^η, 4^η και 8^η (Πίνακας 17). Ωστόσο κατά την 12^η και τελευταία ημέρα δειγματοληψίας η συγκέντρωσή τους παρουσίασε αύξηση σε σχέση με τις τιμές των προηγούμενων ημερών. Αυτό ίσως οφείλεται στην οξείδωση του καφαρικού οξέος και στον σχηματισμό των ο-κινονών, όπως αναφέρουν και στην μελέτη τους οι Sioumis et al. (2005). Επίσης από την 0^η έως και την 12^η ημέρα

δειγματοληψίας κανένα δείγμα δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντικές διαφορές ούτε με το δείγμα του Μάρτυρα, αλλά ούτε και με τα υπόλοιπα ως προς τη συγκέντρωση των υδροξυκιναμωμικών οξέων στο πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 35 °C (Διαγράμματα 36 και 37). Τα αποτελέσματα αυτά δεν συμφωνούν με τα αποτελέσματα του Πίνακα 5 και με τις τιμές του συντελεστή μεταβολής του χρώματος k , αλλά ούτε και με την αύξηση του δείκτη καστανότητας ($A_{420\text{ nm}}$) στο χρόνο (Πίνακας 3) που σημειώθηκε κατά το διάστημα των 12 ημερών του πειράματος αυτού. Συνεπώς η μεταβολή της συγκέντρωσης των υδροξυκιναμωμικών οξέων δεν σχετίζεται με την εμφάνιση του οξειδωτικού καφετιάσματος στον οίνο για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στη θερμοκρασία των 35°C. Σε ανάλογο συμπέρασμα κατέληξαν και οι Fernandez-Zurbano et al. (1998) στην μελέτη τους πάνω σε 8 λευκά κρασιά, καθώς επίσης και οι Sioumis et al. (2005) στη δική τους έρευνα.

Ακόμη, με βάση τις τιμές των δειγμάτων του πειράματος ταχείας οξείδωσης στους 50 °C, παρατηρείται επίσης μείωση στη συγκέντρωση των υδροξυκιναμωμικών οξέων τις ημέρες δειγματοληψίας 1, 2, 4 και 8, ενώ την 12^η ημέρα οι συγκεντρώσεις τους σημειώνουν αύξηση σε όλα τα δείγματα (Πίνακας 18). Επιπλέον τα δείγματα $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se max}$ και $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 \text{ max}$, με τις μέγιστες συγκεντρώσεις του μετάλλου σιδήρου και του υπεροξειδίου του υδρογόνου, εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 με το δείγμα του Μάρτυρα, από την 1^η έως και την 12^η ημέρα δειγματοληψίας, ως προς την συγκέντρωση των υδροξυκιναμωμικών οξέων στο πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 50 °C (Διαγράμματα 38, 39 και 40). Επιπροσθέτως τα δείγματα με τις ελάχιστες προσθήκες των συγκεντρώσεων σιδήρου και υπεροξειδίου του υδρογόνου: $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se min}$ και $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 \text{ min}$, δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές με το δείγμα του Μάρτυρα από την 1^η έως την 8^η ημέρα, ενώ την 12^η ημέρα παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές αλλά οι τιμές τους ήταν παραπλήσιες με τη τιμή του Μάρτυρα (Διαγράμματα 38, 39 και 40). Συνεπώς, τόσο η αύξηση της θερμοκρασίας στους 50 °C, όσο και οι προσθήκες του δισθενούς σιδήρου και του υπεροξειδίου του υδρογόνου στις μέγιστες συγκεντρώσεις συντέλεσαν στην μείωση της συγκέντρωσης των υδροξυκιναμωμικών οξέων στο πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 50 °C. Το αποτέλεσμα αυτό δεν συμφωνεί με το αντίστοιχο αποτέλεσμα για το πείραμα οξείδωσης στους 35 °C.

Επίσης τα δείγματα με τις προσθήκες σεληνίου: Se min και Se max κατά κύριο λόγο δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές με το δείγμα του Μάρτυρα, ως προς την συγκέντρωση των υδροξυκιναμωμικών οξέων, από την 0^η έως και την 12^η ημέρα του πειράματος οξείδωσης στους 50 °C. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με αποτελέσματα των δειγμάτων με τις προσθήκες σεληνίου του πειράματος ταχείας αμαύρωσης στη θερμοκρασία των 35 °C.

Συνεπώς η προσθήκη σεληνίου δε φάνηκε να επηρεάζει τη συγκέντρωση των υδροξυκιναμωμικών οξέων σε κανένα από τα δυο πειράματα οξείδωσης στους 35 και 50 °C. Το ίδιο ισχύει και για τα δείγματα $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se min}$ και $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se max}$, εφόσον το σεληνίο ούτε σε αυτές τις περιπτώσεις δε φάνηκε να επηρεάζει την οξείδωση των υδροξυκιναμωμικών οξέων. Ωστόσο στα δείγματα που ο $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ και το H_2O_2 έχουν προστεθεί στις μέγιστες συγκεντρώσεις: $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se max}$ και $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 \text{ max}$, φάνηκε να υπερισχύει η καταλυτική δράση του σιδήρου καθώς και η δράση του υπεροξειδίου του υδρογόνου στις αντιδράσεις οξείδωσης των υδροξυκιναμωμικών οξέων, όμως μόνο για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 50 °C.

Στο πείραμα οξείδωσης στους 35 °C οι συγκεντρώσεις των υδροξυκιναμωμικών οξέων δεν φάνηκε να επηρεάστηκαν από τις προσθήκες του μίγματος $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ και H_2O_2 ούτε στη μέγιστη, αλλά ούτε και στην ελάχιστη συγκέντρωση.

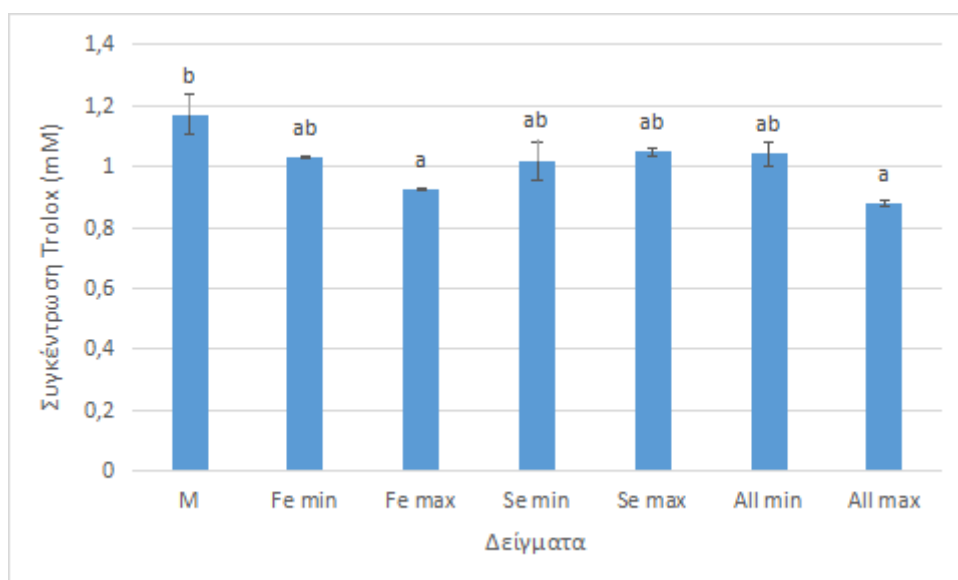
6. Αντιοξειδωτική Ικανότητα

Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος DPPH, η οποία πραγματοποιήθηκε με βάση το πρωτόκολλο χημικών αναλύσεων που περιγράφεται στη μελέτη των Arnous et al. (2001). Στη συνέχεια ακολουθούν οι Πίνακες 19 και 20 με τα αποτελέσματα της μεθόδου για κάθε μια προσθήκη που πραγματοποιήθηκε αρχικά στον οίνο κάθε πειράματος οξείδωσης. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν mM Trolox. Οι τιμές με διαφορετικό εκθέτη παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 ($p < 0,05$).

Πίνακας 19: Αποτελέσματα αντιοξειδωτικής ικανότητας για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στη θερμοκρασία των 35 °C.*

Δείγματα 35 °C	Ημέρα 0	Ημέρα 1	Ημέρα 2	Ημέρα 4	Ημέρα 8	Ημέρα 12
Μάρτυρας (Control)	0,845 ^a ± 0,001	1,091 ^{ab} ± 0,024	1,122 ^a ± 0,071	1,007 ^a ± 0,055	1,112 ^a ± 0,016	1,169 ^b ± 0,065
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ min (Fe min)	1,036 ^a ± 0,013	1,155 ^a ± 0,051	1,075 ^a ± 0,014	1,066 ^a ± 0,062	0,995 ^a ± 0,062	1,032 ^{ab} ± 0,004
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ max (Fe max)	0,826 ^a ± 0,032	0,713 ^b ± 0,168	0,752 ^b ± 0,084	1,036 ^a ± 0,004	0,915 ^a ± 0,043	0,924 ^a ± 0,004
Se min	0,957 ^a ± 0,045	1,299 ^a ± 0,005	1,131 ^a ± 0,004	0,996 ^a ± 0,030	1,126 ^a ± 0,071	1,014 ^{ab} ± 0,062
Se max	0,944 ^a ± 0,015	1,147 ^a ± 0,050	1,010 ^{ab} ± 0,065	1,098 ^a ± 0,115	1,113 ^a ± 0,054	1,047 ^{ab} ± 0,014
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se min (All min)	1,028 ^a ± 0,016	1,219 ^a ± 0,031	1,116 ^a ± 0,052	1,044 ^a ± 0,031	1,108 ^a ± 0,004	1,040 ^{ab} ± 0,040
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se max (All max)	0,918 ^a ± 0,128	0,901 ^{ab} ± 0,054	0,894 ^{ab} ± 0,020	0,815 ^a ± 0,007	0,996 ^a ± 0,152	0,877 ^a ± 0,010

*Οι τιμές με διαφορετικό εκθέτη παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 και η σύγκρισή τους πραγματοποιήθηκε ανά στήλη.

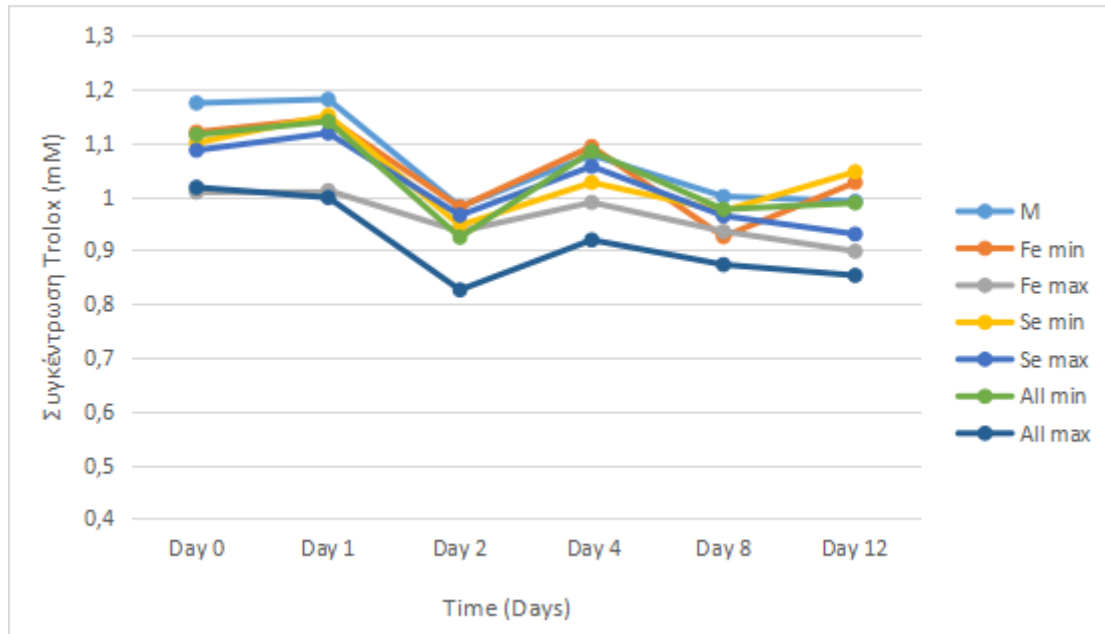


Διάγραμμα 41: Αντιοξειδωτική ικανότητα στα δείγματα την 12^η ημέρα δειγματοληψίας για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 35 °C.

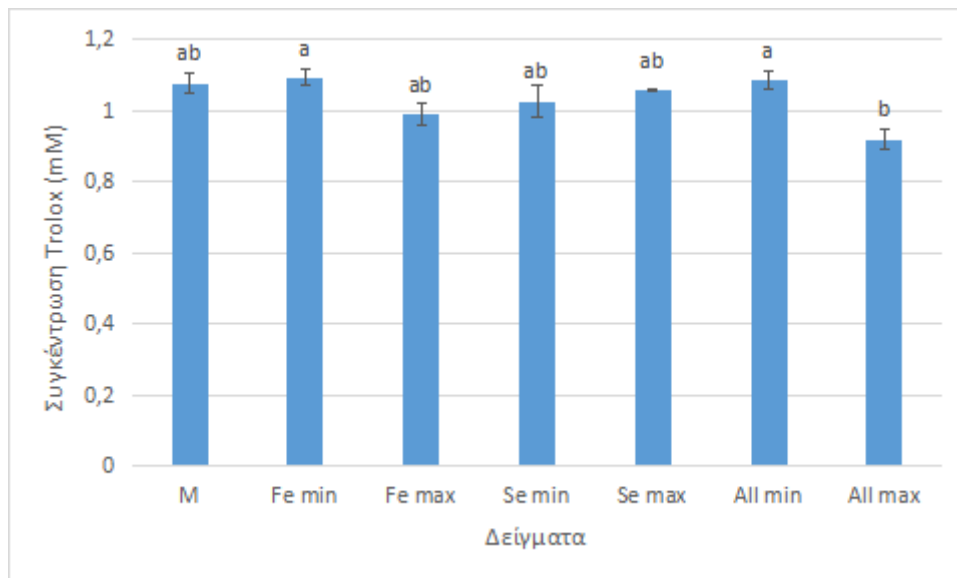
Πίνακας 20 : Αποτελέσματα αντιοξειδωτικής ικανότητας για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στη θερμοκρασία των 50 °C.*

Δείγματα 50 °C	Ημέρα 0	Ημέρα 1	Ημέρα 2	Ημέρα 4	Ημέρα 8	Ημέρα 12
Μάρτυρας (Control)	1,174 ^a ± 0,022	1,181 ^a ± 0,015	0,981 ^a ± 0,002	1,077 ^{ab} ± 0,028	1,000 ^a ± 0,046	0,991 ^a ± 0,011
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ min (Fe min)	1,120 ^a ± 0,085	1,146 ^a ± 0,046	0,980 ^a ± 0,005	1,093 ^a ± 0,021	0,925 ^a ± 0,052	1,026 ^a ± 0,067
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ max (Fe max)	1,008 ^a ± 0,040	1,011 ^a ± 0,049	0,935 ^a ± 0,016	0,989 ^{ab} ± 0,030	0,935 ^a ± 0,025	0,898 ^a ± 0,019
Se min	1,100 ^a ± 0,007	1,151 ^a ± 0,016	0,946 ^a ± 0,044	1,026 ^{ab} ± 0,047	0,973 ^a ± 0,009	1,046 ^a ± 0,032
Se max	1,086 ^a ± 0,011	1,118 ^a ± 0,051	0,965 ^a ± 0,017	1,056 ^{ab} ± 0,002	0,964 ^a ± 0,007	0,930 ^a ± 0,081
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se min (All min)	1,115 ^a ± 0,084	1,140 ^a ± 0,034	0,924 ^a ± 0,035	1,084 ^a ± 0,025	0,976 ^a ± 0,085	0,988 ^a ± 0,014
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se max (All max)	1,017 ^a ± 0,037	0,998 ^a ± 0,029	0,826 ^a ± 0,821	0,919 ^b ± 0,028	0,873 ^a ± 0,009	0,853 ^a ± 0,050

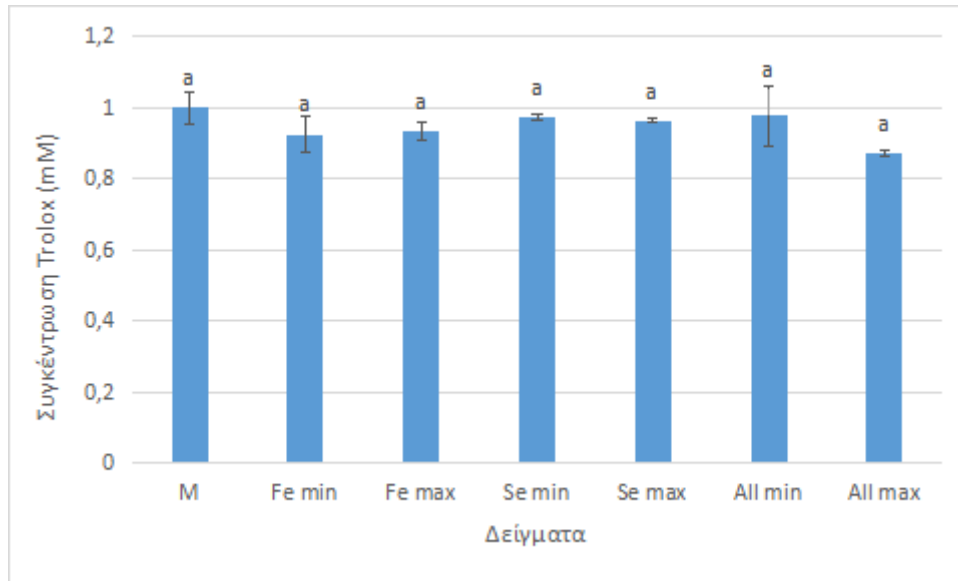
*Οι τιμές με διαφορετικό εκθέτη παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 και η σύγκρισή τους πραγματοποιήθηκε ανά στήλη.



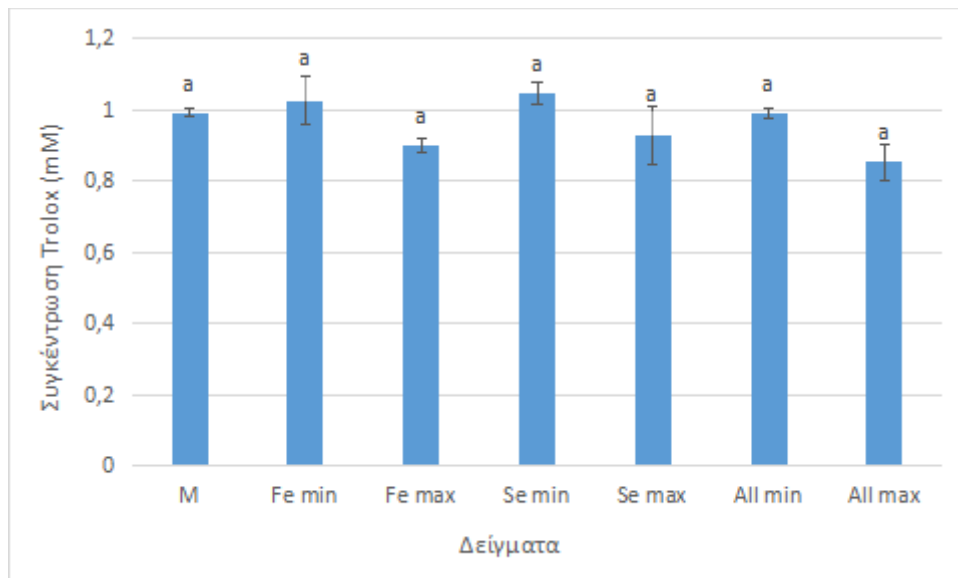
Διάγραμμα 42: Μεταβολή της αντιοξειδωτικής ικανότητας στα δείγματα με το χρόνο για τις ημέρες δειγματοληψίας 0, 1, 2, 4, 8 και 12 για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 50 °C.



Διάγραμμα 43: Αντιοξειδωτική ικανότητα στα δείγματα την 4^η ημέρα δειγματοληψίας για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 50 °C.



Διάγραμμα 44: Αντιοξειδωτική ικανότητα στα δείγματα την 8^η ημέρα δειγματοληψίας για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 50 °C.



Διάγραμμα 45: Αντιοξειδωτική ικανότητα στα δείγματα την 12^η ημέρα δειγματοληψίας για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 50 °C.

Όσον αφορά το πείραμα ταχείας οξειδωσης στους 35 °C δεν παρατηρήθηκε μεγάλη μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας στο χρόνο (Πίνακας 19). Αντιθέτως, μεγαλύτερη πτώση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων με το χρόνο σημειώνεται στο πείραμα ταχείας οξειδωσης στη θερμοκρασία των 50 °C (Πίνακας 20).

Η αύξηση του καφέ χρώματος (A_{420}) στους οίνους συνεπάγεται με οξείδωση των πολυφαινολών και συνεπώς μείωση έως και απώλεια της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας (Sioumis et al., 2005). Στη παρούσα μελέτη, μεγαλύτερη μείωση της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας παρουσίασαν τα δείγματα με την προσθήκη του μίγματος $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ και H_2O_2 στην υψηλότερη συγκέντρωση: $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se max}$ και $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 \text{ max}$ και στα δυο πειράματα οξείδωσης στις θερμοκρασίες 35 και 50 °C. Στη συνέχεια ακολούθησαν οι τιμές με τις προσθήκες του μίγματος $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ και H_2O_2 στη μικρότερη συγκέντρωση, δηλαδή τα δείγματα $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se min}$ και $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 \text{ min}$.

Αναλυτικότερα, στο πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 35 °C το δείγμα $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se max}$ σημείωσε στατιστικά σημαντική διαφορά με το δείγμα του Μάρτυρα, ως προς την αντιοξειδωτική ικανότητα κυρίως κατά την 12^η ημέρα δειγματοληψίας (Διάγραμμα 41). Επίσης στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με το δείγμα του Μάρτυρα, εμφάνισε και το δείγμα $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 \text{ max}$ τις ημέρες δειγματοληψίας 1, 2 και 12. Συγκεκριμένα, τα δείγματα με την προσθήκη του μίγματος $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ και H_2O_2 στη μέγιστη συγκέντρωση, δηλαδή τα $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se max}$ και $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 \text{ max}$, την 12^η και τελευταία ημέρα του πειράματος στην θερμοκρασία των 35°C σημείωσαν τις πιο ξεκάθαρες στατιστικά σημαντικές διαφορές με το δείγμα του Μάρτυρα, σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα (Διάγραμμα 41). Πιο αναλυτικά τόσο τα δείγματα με τις προσθήκες σεληνίου: Se min και Se max , όσο και τα δείγματα με την προσθήκη του $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ και του H_2O_2 στην μικρότερη συγκέντρωση: $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se min}$ και $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 \text{ min}$ οι στατιστικά σημαντικές διαφορές που εμφάνισαν σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 ως προς την αντιοξειδωτική ικανότητα ήταν κάπου ανάμεσα στις τιμές του Μάρτυρα και αυτής των δειγμάτων $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se max}$ και $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 \text{ max}$ κατά την 12^η ημέρα του πειράματος στους 35 °C (Διάγραμμα 41).

Όσον αφορά το πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 50 °C όλα τα δείγματα εμφάνισαν πτώση της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας με το χρόνο (Πίνακας 20). Η πτώση αυτή διαχωρίστηκε σε δυο φάσεις, καθώς η πρώτη φάση μείωσης της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε όλα τα δείγματα σημειώθηκε από την ημέρα 0 έως την 2^η ημέρα, στη συνέχεια παρουσιάστηκε μια μικρή αύξηση της συγκέντρωσης μέχρι την 4^η ημέρα και τέλος ακολούθησε η δεύτερη φάση που η αντιοξειδωτική ικανότητα μειώθηκε κατακόρυφα σε όλα τα δείγματα έως την 12^η ημέρα (Διάγραμμα 42).

Επιπλέον την 12^η και τελευταία μέρα του πειράματος στους 50 °C δε σημειώθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων (Διάγραμμα 45), ενώ σε όλα τα δείγματα οι τιμές αντιοξειδωτικής ικανότητας ήταν πιο χαμηλές σε σύγκριση με αυτές της 12^{ης} ημέρας του πειράματος οξείδωσης στους 35 °C. Ήδη από την 1^η ημέρα του πειράματος στη θερμοκρασία των 50 °C, η τιμή της αντιοξειδωτικής ικανότητας του δείγματος $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se max}$ σημείωσε τη μεγαλύτερη πτώση σε σχέση με τα άλλα δείγματα, ενώ από την 4^η ημέρα εμφάνισε στατιστικά σημαντικές διαφορές με το δείγμα του Μάρτυρα (Διάγραμμα 43). Αντίστοιχα την 4^η ημέρα του πειράματος στους 50 °C τα δείγματα $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se min}$ παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές με το Μάρτυρα, ενώ κατά την 8^η και 12^η ημέρα δειγματοληψίας οι συγκεντρώσεις TEAC όλων των δειγμάτων μειώθηκαν και δεν παρουσιάστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους σε επίπεδο 0,05 (Διαγράμματα 44 και 45).

Συμπερασματικά στο πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 35 °C τη μεγαλύτερη μείωση της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας, σε σχέση με τον Μάρτυρα και με τα υπόλοιπα δείγματα, παρουσίασαν τα δείγματα με τις προσθήκες του μίγματος σιδήρου και υπεροξειδίου του υδρογόνου στη μέγιστη συγκέντρωση. Επίσης τα δείγματα με την ελάχιστη συγκέντρωση σιδήρου και υπεροξειδίου του υδρογόνου δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές κατά την 12^η ημέρα δειγματοληψίας με τα δείγματα τα οποία εμπεριείχαν το σελήνιο στην ελάχιστη και στη μέγιστη του συγκέντρωση (Se min, Se max).

Επιπλέον στο πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 50 °C, τη ταχύτερη πτώση της αντιοξειδωτικής ικανότητας από την 1^η έως και την 4^η ημέρα δειγματοληψίας, σημείωσαν τα δείγματα με τις προσθήκες του μίγματος $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ και H_2O_2 στη μέγιστη συγκέντρωση. Ενώ τις τελευταίες ημέρες δειγματοληψίας του πειράματος στους 50 °C, δηλαδή την 8^η και την 12^η, οι τιμές της αντιοξειδωτικής ικανότητας όλων των δειγμάτων παρουσίασαν την ίδια κατακόρυφη πτώση. Τέλος η αύξηση της θερμοκρασίας στους 50 °C επιτάχυνε τις αντιδράσεις οξειδοαναγωγής, έχοντας ως αποτέλεσμα τη μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε όλα τα δείγματα κυρίως από την 4^η μέρα και μετά, η οποία ήταν και μεγαλύτερη από την μείωση των τιμών που σημειώθηκε στο πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 35 °C με βάση τις τιμές των Πινάκων 19 και 20.

Όλα τα προαναφερόμενα συμπεράσματα που αφορούν τη μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων φαίνεται να συμφωνούν με τις αυξήσεις του δείκτη καστανότητας (A_{420}) και του συντελεστή μεταβολής του χρώματος k σε κάθε ένα δείγμα και σε κάθε ένα πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 35 και 50 °C αντίστοιχα. Σε ανάλογο αποτέλεσμα κατέληξαν και οι Sioumis et al. (2005) στη μελέτη τους όπου απέδειξαν ότι η αμαύρωση των οίνων έχει ως αποτέλεσμα την ανάλογη επιδείνωση της αντιοξειδωτικής του ικανότητας.

7. Ολικές ελεύθερες σουλφρυδυλομάδες (SH)

Οι υψηλές συγκεντρώσεις των ολικών ελεύθερων σουλφρυδυλομάδων στους λευκούς οίνους έχουν συνδεθεί με την αντιοξειδωτική τους ικανότητα (Kontogeorgos & Roussis, 2014). Στους Πίνακες 21 και 22 απεικονίζονται τα αποτελέσματα των ολικών ελεύθερων σουλφρυδυλομάδων των πειραμάτων ταχείας οξείδωσης στους 35 °C και στους 50 °C για τις ημέρες δειγματοληψίας 0, 1, 2, 4, 8 και 12. Οι συγκεντρώσεις των ομάδων SH είναι εκφρασμένες σε χλιοστογραμμάρια γλουταθειόνης (GSH) στο λίτρο (mg/L). Οι τιμές με διαφορετικό εκθέτη παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 ($p < 0,05$).

Πίνακας 21: Αποτελέσματα ολικών ελεύθερων σουλφρυδυλομάδων για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στη θερμοκρασία των 35 °C.*

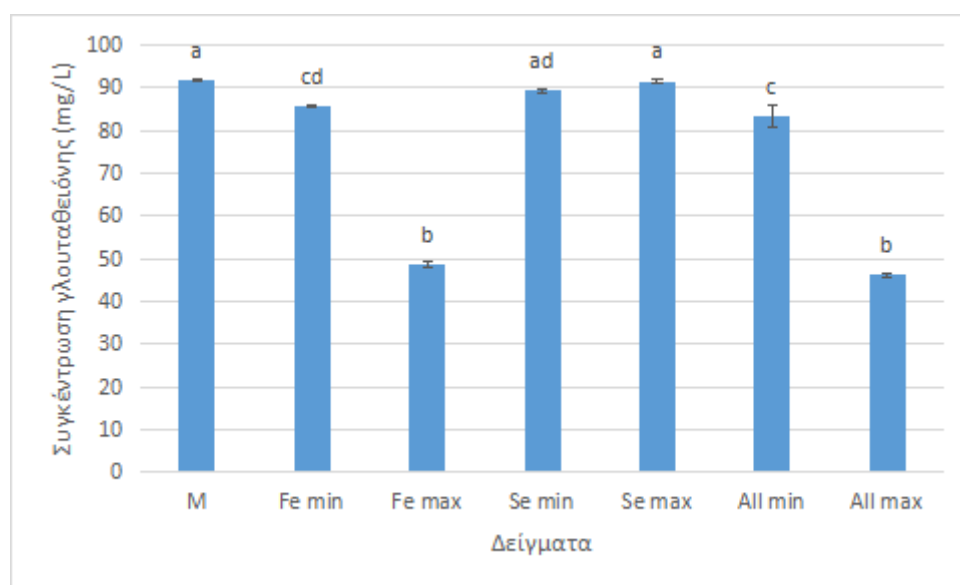
Δείγματα 35 °C	Ημέρα 0	Ημέρα 1	Ημέρα 2	Ημέρα 4	Ημέρα 8	Ημέρα 12
Μάρτυρας (Control)	103,435 ^a ± 1,315	95,092 ^a ± 6,282	86,888 ^{ab} ± 1,547	109,719 ^{ab} ± 8,345	101,655 ^a ± 1,031	91,810 ^a ± 0,094
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ min (Fe min)	100,624 ^a ± 1,875	103,202 ^a ± 3,047	82,059 ^a ± 0,281	106,672 ^{ab} ± 6,610	94,154 ^a ± 0,656	85,716 ^{cd} ± 0,281
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ max (Fe max)	58,524 ^b ± 8,157	68,041 ^b ± 3,985	52,149 ^c ± 1,781	66,447 ^a ± 0,141	62,603 ^b ± 0,047	48,679 ^b ± 0,563
Se min	103,202 ^a ± 0,328	102,827 ^a ± 2,485	84,825 ^{ab} ± 0,141	108,219 ^{ab} ± 9,564	102,218 ^a ± 4,126	89,372 ^{ad} ± 0,375
Se max	103,484 ^a ± 3,516	101,937 ^a ± 3,469	90,873 ^b ± 2,719	105,312 ^{ab} ± 9,845	92,842 ^a ± 1,406	91,623 ^a ± 0,656
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se min (All min)	99,358 ^a ± 1,453	97,999 ^a ± 4,219	81,918 ^a ± 0,516	153,600 ^b ± 24,472	97,155 ^a ± 3,000	83,372 ^c ± 2,438
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se max (All max)	60,822 ^b ± 3,516	63,728 ^b ± 4,923	59,415 ^c ± 0,516	63,072 ^a ± 0,422	65,650 ^b ± 0,188	46,335 ^b ± 0,469

*Οι τιμές με διαφορετικό εκθέτη παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 και η σύγκρισή τους πραγματοποιήθηκε ανά στήλη.

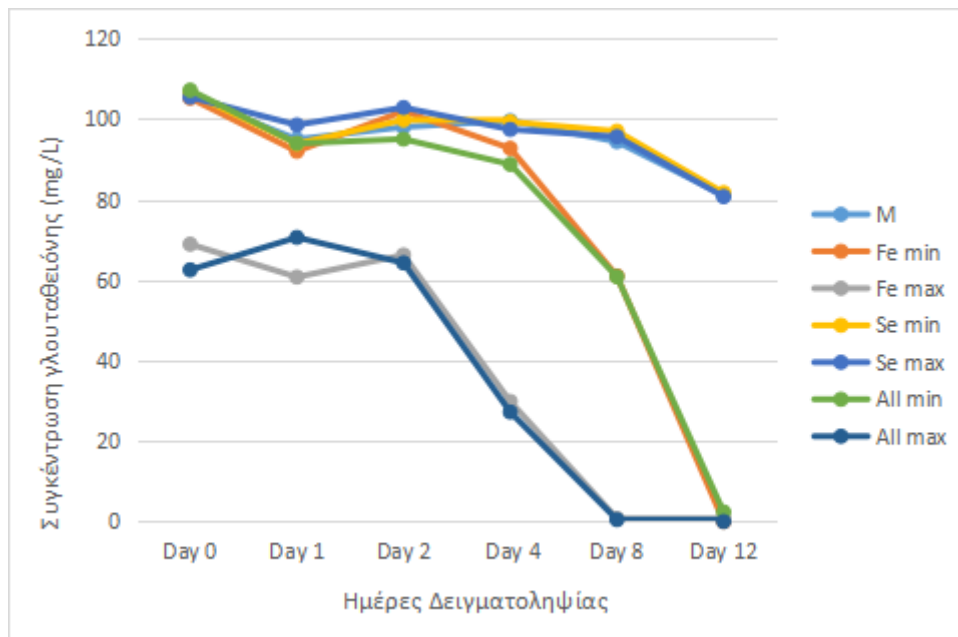
Πίνακας 22: Αποτελέσματα ολικών ελεύθερων σουλφρυδυλομάδων για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στη θερμοκρασία των 50 °C.*

Δείγματα 50 °C	Ημέρα 0	Ημέρα 1	Ημέρα 2	Ημέρα 4	Ημέρα 8	Ημέρα 12
Μάρτυρας (Control)	105,500 ^a ± 0,281	94,951 ^a ± 0,422	97,999 ^a ± 2,063	99,546 ^a ± 0,047	94,342 ^a ± 3,000	81,074 ^b ± 0,703
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ min (Fe min)	105,171 ^a ± 0,891	91,951 ^a ± 0,422	101,937 ^a ± 4,782	92,701 ^c ± 0,609	61,009 ^c ± 1,828	0 ^a ± 0
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ max (Fe max)	68,885 ^b ± 1,547	60,728 ^b ± 2,954	66,213 ^b ± 0,094	29,833 ^c ± 0,563	0,767 ^b ± 0,094	0,805 ^a ± 0,805
Se min	106,390 ^a ± 2,110	93,873 ^a ± 0,844	99,733 ^a ± 1,360	99,264 ^a ± 0,422	96,967 ^a ± 1,406	81,684 ^b ± 1,781
Se max	105,406 ^a ± 2,907	98,514 ^a ± 0,234	102,827 ^a ± 0,516	97,389 ^a ± 0,141	95,608 ^a ± 0,703	80,699 ^b ± 4,266
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se min (All min)	107,140 ^a ± 1,453	93,920 ^a ± 0,797	94,998 ^a ± 0,281	88,716 ^d ± 0,563	60,822 ^c ± 0,797	2,399 ^a ± 2,399
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se max (All min)	62,509 ^b ± 2,110	70,573 ^c ± 0,234	64,244 ^b ± 1,125	27,208 ^b ± 0,563	0,477 ^b ± 0,477	0,008 ^a ± 0,008

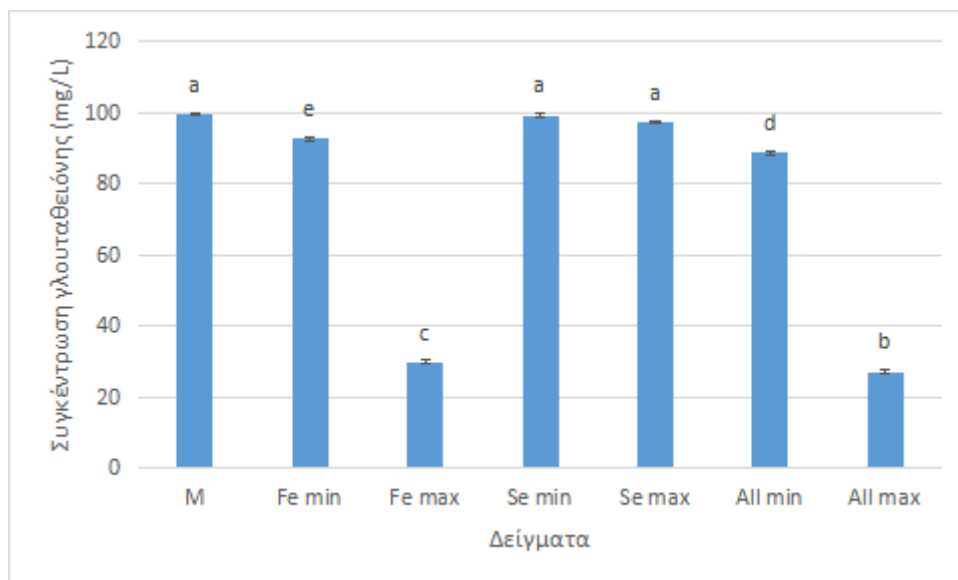
*Οι τιμές με διαφορετικό εκθέτη παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 και η σύγκρισή τους πραγματοποιήθηκε ανά στήλη.



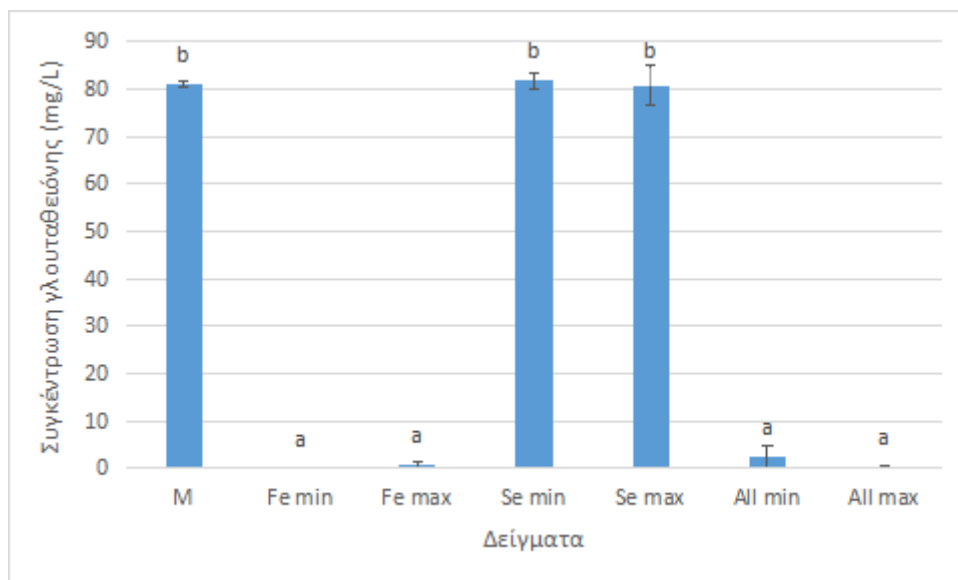
Διάγραμμα 46: Ολικές ελεύθερες σουλφρυδυλομάδες (SH) στα δείγματα την 12^η ημέρα δειγματοληψίας για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 35 °C.



Διάγραμμα 47: Μεταβολές των συγκεντρώσεων των ολικών ελεύθερων σουλφρυδυλομάδων (SH) με το χρόνο τις ημέρες δειγματοληψίας 0, 1, 2, 4, 8 και 12 για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 50 °C.



Διάγραμμα 48: Ολικές ελεύθερες σουλφρυδυλομάδες (SH) στα δείγματα την 4^η ημέρα δειγματοληψίας για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 50 °C.



Διάγραμμα 49: Ολικές ελεύθερες σουλφρυδολομάδες (SH) στα δείγματα την 12^η ημέρα δειγματοληψίας για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 50 °C.

Τόσο στο πείραμα ταχείας οξείδωσης στη θερμοκρασία των 35 °C, όσο και σε αυτό των 50 °C παρατηρείται μείωση στις συγκεντρώσεις των ολικών ελεύθερων σουλφρυδολομάδων με το χρόνο, κατά το διάστημα των 12 ημερών (Πίνακες 21 και 22). Τη μεγαλύτερη μείωση της συγκέντρωσης των ομάδων SH στο χρόνο σημείωσαν τα δείγματα με τις υψηλές συγκεντρώσεις του μίγματος $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ και H_2O_2 , δηλαδή το $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se max}$ και το $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 \text{ min}$. Ακολούθησαν με μικρότερη μείωση της συγκέντρωσης των ομάδων SH στο χρόνο τα δείγματα $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se min}$ και $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 \text{ min}$, ενώ οι συγκεντρώσεις των ολικών ομάδων SH στα δείγματα με τις προσθήκες σεληνίου: Se min και Se max φανέρωσαν αντίστοιχη πτώση με αυτή του δείγματος του Μάρτυρα από την ημέρα 0 έως την 12^η.

Στο πείραμα οξείδωσης στους 35 °C, ήδη από την ημέρα 0 έως και την 12^η και τελευταία ημέρα της δειγματοληψίας τα δείγματα $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se max}$ και $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 \text{ max}$ εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές με το δείγμα του Μάρτυρα ως προς τη συγκέντρωση των ομάδων SH (Διάγραμμα 46). Επιπλέον τα δείγματα $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se min}$ και $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 \text{ min}$ παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 με το Μάρτυρα κυρίως κατά την 12^η ημέρα δειγματοληψίας (Διάγραμμα 46).

Ακόμη το δείγμα με την μέγιστη συγκέντρωση σεληνίου Se max σημείωσε στατιστικά σημαντική διαφορά με το δείγμα του Μάρτυρα κατά την 2^η ημέρα, ως προς τη συγκέντρωση των ολικών ελεύθερων ομάδων SH, ενώ μέχρι και την 12^η ημέρα τα δείγματα δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 (Διάγραμμα 46). Τέλος, το δείγμα με τη μικρότερη συγκέντρωση σεληνίου Se min δε παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές με το δείγμα του Μάρτυρα ως προς την συγκέντρωση των ομάδων SH στο πείραμα ταχείας οξείδωσης των 35 °C.

Επιπροσθέτως στο πείραμα ταχείας οξείδωσης στη θερμοκρασία των 50 °C όλα τα δείγματα με τις προσθήκες του μετάλλου σιδήρου και του υπεροξειδίου του υδρογόνου τόσο στη μέγιστη, όσο και στην ελάχιστη τους συγκέντρωση, παρουσίασαν κατακόρυφη πτώση των συγκεντρώσεων των ολικών ελεύθερων σουλφρυδολομάδων με τιμές που φτάνουν έως και την μηδενική κατά την 12^η

ημέρα (Πίνακας 22 και Διάγραμμα 47). Σημειώνεται ότι ταχύτερη πτώση των συγκεντρώσεων των ομάδων SH ήδη από την ημέρα 0 της δειγματοληψίας, εμφάνισαν τα δείγματα με τις μέγιστες συγκεντρώσεις του μίγματος $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ και H_2O_2 : $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se max}$, $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 \text{ max}$. Αναλυτικότερα τα δείγματα αυτά φανέρωσαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 με το δείγμα του Μάρτυρα, από την ημέρα 0 έως και την 12^η που ήταν και η τελευταία ημέρα της δειγματοληψίας.

Όσον αφορά τα δείγματα με την προσθήκη του $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ και του H_2O_2 στη μικρότερη συγκέντρωση: $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se min}$ και $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 \text{ min}$, εκείνα δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές με το δείγμα του Μάρτυρα από την ημέρα 0 έως και την 2^η ως προς την συγκέντρωση των ομάδων -SH στο πείραμα οξειδωσίας στους 50 °C. Ωστόσο από την 4^η ημέρα δειγματοληψίας και μετά, τα δείγματα αυτά άρχισαν να εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές με το δείγμα του Μάρτυρα (Διάγραμμα 48). Συνεπώς η μεγαλύτερη πτώση της συγκέντρωσης των ολικών ελεύθερων σουλφρυδυλομάδων στα δείγματα $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se min}$ και $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 \text{ min}$, σημειώθηκε από την 4^η και συνεχίστηκε έως και την 12^η ημέρα του πειράματος οξειδωσίας στη θερμοκρασία των 50 °C.

Ακόμη τα δείγματα με τις προσθήκες σεληνίου Se min και Se max από την ημέρα 0 έως και την 12^η δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 σε σχέση με τον Μάρτυρα ως προς την συγκέντρωσή των ολικών ελεύθερων ομάδων SH, στο πείραμα οξειδωσίας στους 50 °C (Διάγραμμα 49).

Συνεπώς οι προσθήκες σεληνίου τόσο στην μέγιστη, όσο και στην ελάχιστη τους συγκέντρωση, στα δείγματα Se max , $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se max}$ και Se min , $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se min}$ αντίστοιχα, δεν φάνηκε να επηρεάζει τις συγκεντρώσεις των ολικών ελεύθερων σουλφρυδυλομάδων στα πειράματα οξειδωσίας των 35 και 50 °C.

Επίσης οι προσθήκες του μίγματος $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ και H_2O_2 , ιδιαίτερος στα δείγματα όπου είχε προστεθεί στη μέγιστη συγκέντρωση, συντέλεσαν στην ταχύτερη και μεγαλύτερη πτώση της συγκέντρωσης των ομάδων SH στο πείραμα ταχείας οξειδωσίας στους 35 °C. Ωστόσο στο πείραμα ταχείας οξειδωσίας στους 50°C τόσο στα δείγματα με τις υψηλές συγκεντρώσεις, όσο και σε αυτά με τις ελάχιστες συγκεντρώσεις του $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ και του H_2O_2 σημειώθηκε μείωση της συγκέντρωσης των ομάδων SH. Η μόνη διαφορά στο πείραμα των 50 °C ήταν ότι στα δείγματα με την μέγιστη συγκέντρωση του μετάλλου σιδήρου και του υπεροξειδίου του υδρογόνου η πτώση της συγκέντρωσης των ομάδων SH ξεκίνησε ήδη από την ημέρα 0, ενώ σε αυτά με την μικρότερη συγκέντρωση του καταλύτη η μείωση των ολικών ελεύθερων σουλφρυδυλομάδων σημειώθηκε πιο αργά στο χρόνο, κυρίως από την 4^η ημέρα και μετά (Πίνακας 22, Διάγραμμα 48).

Συμπερασματικά και με βάση όλων των παραπάνω τόσο η αύξηση της θερμοκρασίας στους 50 °C, όσο και η προσθήκη $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ και H_2O_2 ιδίως στη μέγιστη τους συγκέντρωση, συντελούν στη μείωση της συγκέντρωσης των ομάδων SH. Το συμπέρασμα αυτό συμφωνεί με τα αποτελέσματα του συντελεστή μεταβολής του χρώματος k λόγω οξειδωσίας αλλά και με την αύξηση του δείκτη καστανότητας (A_{420}) στα δείγματα $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se max}$ και $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 \text{ max}$. Επομένως η προσθήκη $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ και H_2O_2 έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της συγκέντρωσης των ολικών ελεύθερων σουλφρυδυλομάδων που συνεπάγεται με μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας στους οίνους. Ενώ η αύξηση της θερμοκρασίας στους 50 °C επιτάχυνε την μείωση της, λόγω επιτάχυνσης των αντιδράσεων οξειδοαναγωγής στον οίνο.

8. Αποτελέσματα επιπέδων φαινολικών ενώσεων με τη χρήση HPLC

Οι συγκεντρώσεις μεμονωμένων φαινολικών ενώσεων προσδιορίστηκαν με τη χρήση της HPLC. Στους Πίνακες 23 έως 26 απεικονίζονται τα αποτελέσματα των μη φλαβονοειδών φαινολικών συστατικών που ταυτοποιήθηκαν, ενώ στους Πίνακες 27 και 28 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των φλαβαν-3-ολών (φλαβονοειδή φαινολικά συστατικά) που ανιχνεύθηκαν σε κάθε δείγμα. Η ανάλυση με HPLC εφαρμόστηκε σε όλα τα δείγματα την 12^η και τελευταία ημέρα δειγματοληψίας κάθε πειράματος ταχείας οξείδωσης τους 35 και 50 °C αντίστοιχα. Στο σύνολο τους οι φαινολικές ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν την 12^η ημέρα των δυο πειραμάτων οξείδωσης ήταν: α) από τις φλαβανόλες η κατεχίνη, η επικατεχίνη και ο γαλλικός εστέρας της επιγαλλοκατεχίνης, β) από τα υδροξυκινναμωμικά οξέα κυρίως το καφταρικό οξύ, το φερταρικό, κουταρικό, καφεϊκό, φερουλικό και π-κουμαρικό οξύ ενώ γ) από τα βενζοϊκά οξέα το γαλλικό οξύ. Οι συγκεντρώσεις όλων των φαινολικών συστατικών που ποσοτικοποιήθηκαν είναι εκφρασμένες σε mg/L. Σημειώνεται ότι στους πίνακες οι τιμές με διαφορετικό εκθέτη παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 ($p < 0,05$).

Πίνακας 23: Αναλυτικά αποτελέσματα υδροξυκινναμωμικών στα δείγματα για την 12^η ημέρα δειγματοληψίας στο πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 35 °C.*

Δείγματα 35 °C	caftaric acid	coutaric acid	fertaric acid	caffeic acid	ferulic acid	p- coumaric acid	Σύνολο
Μάρτυρας (Control)	59,266 ^a ± 0,0	6,691 ^a ± 0,0	7,864 ^b ± 0,0	2,623 ^a ± 0,0	0,420 ^a ± 0,0	0,341 ^a ± 0,0	77,205
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ min (Fe min)	62,343 ^a ± 1,439	7,074 ^a ± 0,521	7,688 ^b ± 0,287	3,048 ^a ± 0,132	0,357 ^a ± 0,093	0,321 ^a ± 0,010	80,831
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ max (Fe max)	51,778 ^a ± 0,968	6,527 ^a ± 0,430	6,846 ^{ab} ± 0,263	2,643 ^a ± 0,061	0,300 ^a ± 0,009	0,325 ^a ± 0,021	68,420
Se min	63,181 ^a ± 2,673	7,171 ^a ± 0,485	7,770 ^b ± 0,158	2,828 ^a ± 0,009	0,330 ^a ± 0,003	0,324 ^a ± 0,013	81,603
Se max	66,173 ^a ± 4,513	7,602 ^a ± 0,014	7,828 ^b ± 0,233	2,957 ^a ± 0,028	0,344 ^a ± 0,037	0,360 ^a ± 0,008	85,263
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se min (All min)	64,919 ^a ± 4,082	7,676 ^a ± 0,128	7,254 ^b ± 0,257	3,193 ^a ± 0,264	0,366 ^a ± 0,032	0,348 ^a ± 0,042	83,757
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se max (All max)	52,032 ^a ± 1,522	6,435 ^a ± 0,011	6,023 ^a ± 0,114	2,900 ^a ± 0,161	0,264 ^a ± 0,003	0,275 ^a ± 0,007	67,929

*Οι τιμές με διαφορετικό εκθέτη παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 και η σύγκρισή τους πραγματοποιήθηκε ανά στήλη.

Πίνακας 24: Αναλυτικά αποτελέσματα υδροξυκινναμικών στα δείγματα για την 12^η ημέρα δειγματοληψίας στο πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 50 °C.

Δείγματα 50 °C	caftaric acid	coutaric acid	fertaric acid	caffeic acid	ferulic acid	p- coumaric acid	Σύνολο
Μάρτυρας (Control)	60,485 ^a ± 1,239	8,611 ^a ± 0,018	7,588 ^{ab} ± 0,021	2,573 ^{ab} ± 0,017	0,425 ^c ± 0,004	0,502 ^a ± 0,017	80,184
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ min (Fe min)	63,974 ^a ± 1,427	8,274 ^a ± 0,009	7,325 ^a ± 0,021	2,582 ^{ab} ± 0,020	0,390 ^{bc} ± 0,014	0,471 ^{ab} ± 0,036	83,015
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ max (Fe max)	46,466 ^b ± 0,313	6,891 ^b ± 0,068	5,734 ^c ± 0,023	2,376 ^{bc} ± 0,086	0,263 ^a ± 0,029	0,444 ^{ab} ± 0,005	62,174
Se min	64,738 ^a ± 1,590	8,598 ^a ± 0,044	7,462 ^{ab} ± 0,085	2,509 ^{abc} ± 0,031	0,448 ^c ± 0,010	0,523 ^a ± 0,016	84,278
Se max	64,165 ^a ± 1,443	8,423 ^a ± 0,062	7,400 ^{ab} ± 0,095	2,633 ^a ± 0,044	0,365 ^{abc} ± 0,002	0,508 ^a ± 0,001	83,493
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se min (All min)	44,956 ^b ± 0,158	6,669 ^b ± 0,106	5,541 ^c ± 0,033	2,283 ^c ± 0,035	0,278 ^{ab} ± 0,003	0,427 ^{ab} ± 0,014	60,154
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se max (All max)	37,855 ^b ± 0,287	7,447 ^c ± 0,147	7,691 ^b ± 0,025	2,714 ^a ± 0,029	0,298 ^{ab} ± 0,043	0,350 ^b ± 0,036	56,355

*Οι τιμές με διαφορετικό εκθέτη παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 και η σύγκρισή τους πραγματοποιήθηκε ανά στήλη.

Πίνακας 25: Αναλυτικά αποτελέσματα βενζοϊκών οξέων στα δείγματα για την 12^η ημέρα δειγματοληψίας στο πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 35 °C.*

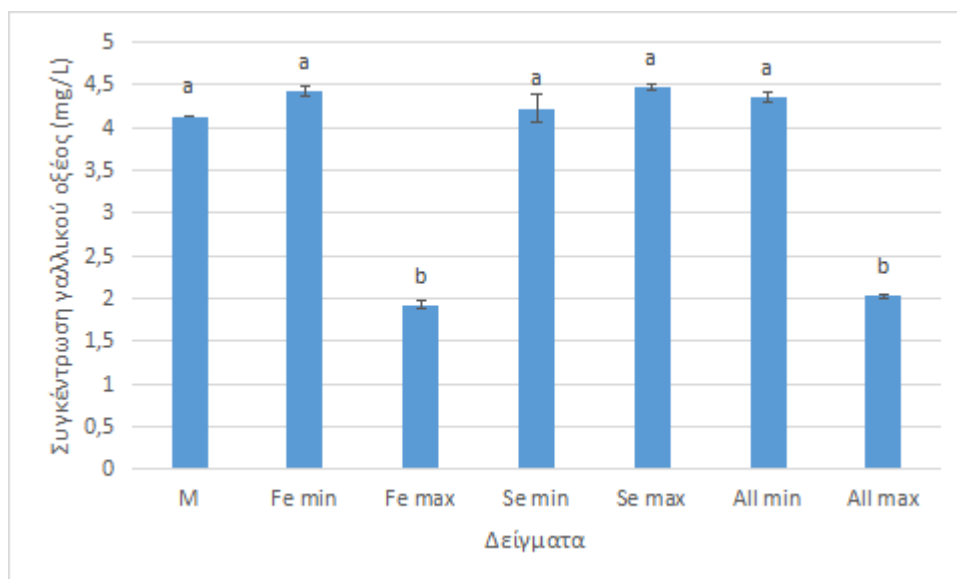
Δείγματα 35°C	gallic acid
Μάρτυρας (Control)	4,134 ^a ± 0,0
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ min (Fe min)	4,431 ^a ± 0,053
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ max (Fe max)	1,928 ^b ± 0,042
Se min	4,229 ^a ± 0,158
Se max	4,473 ^a ± 0,029
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se min (All min)	4,358 ^a ± 0,062
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se max (All max)	2,034 ^b ± 0,022

*Οι τιμές με διαφορετικό εκθέτη παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 και η σύγκρισή τους πραγματοποιήθηκε ανά στήλη.

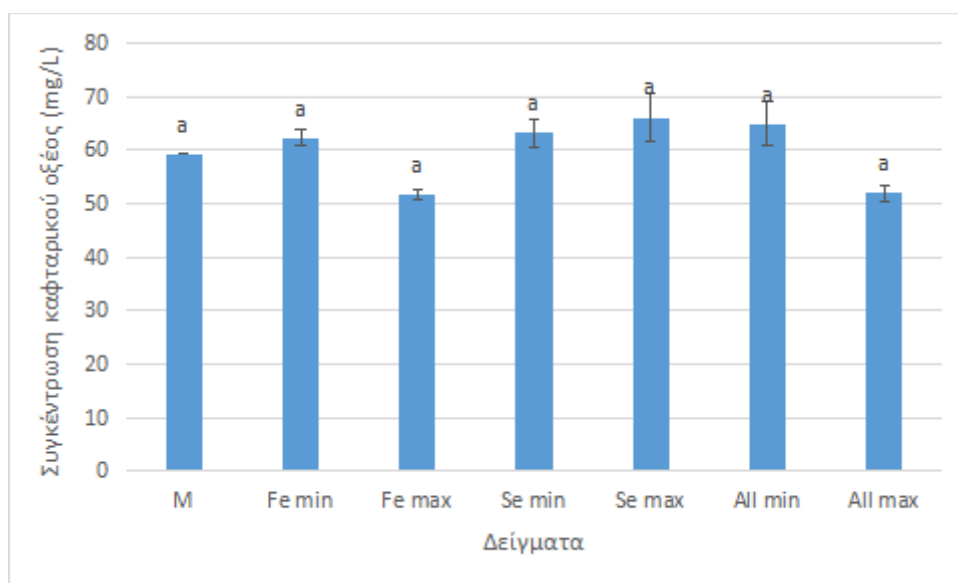
Πίνακας 26: Αναλυτικά αποτελέσματα βενζοϊκών οξέων στα δείγματα για την 12^η ημέρα δειγματοληψίας στο πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 50 °C.*

Δείγματα 50°C	gallic acid
Μάρτυρας (Control)	4,451 ^a ± 0,098
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ min (Fe min)	4,150 ^a ± 0,150
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ max (Fe max)	2,231 ^b ± 0,058
Se min	4,075 ^a ± 0,010
Se max	4,145 ^a ± 0,161
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se min (All min)	2,211 ^b ± 0,012
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se max (All max)	3,973 ^a ± 0,114

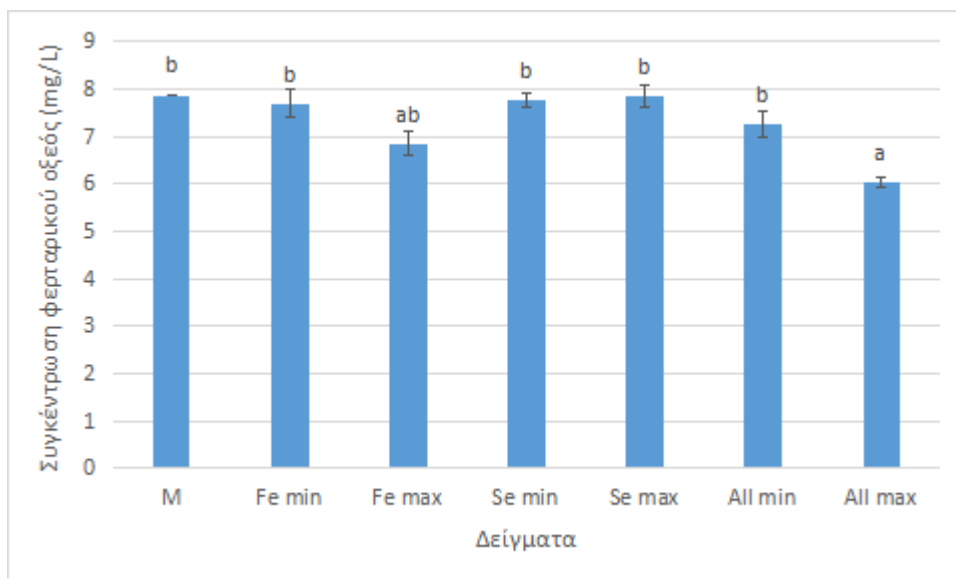
*Οι τιμές με διαφορετικό εκθέτη παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 και η σύγκρισή τους πραγματοποιήθηκε ανά στήλη.



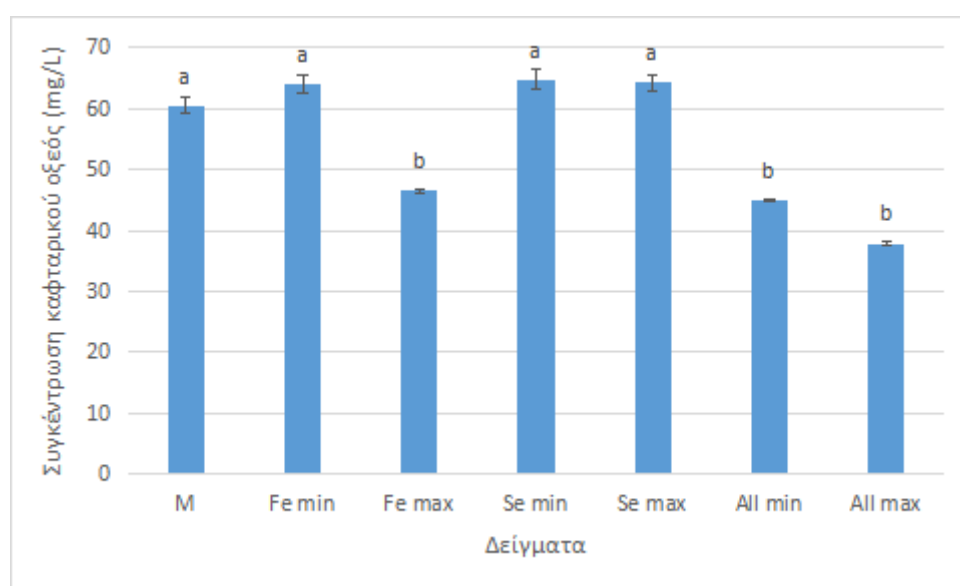
Διάγραμμα 50: Συγκέντρωση γαλλικού οξέος στα δείγματα την 12^η ημέρα δειγματοληψίας για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 35 °C.



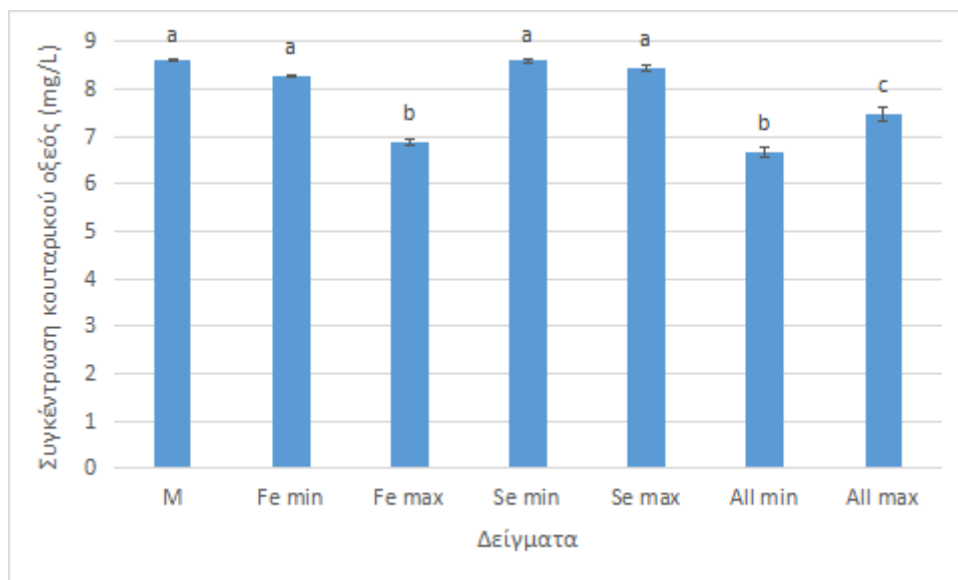
Διάγραμμα 51: Συγκέντρωση καφταρικού οξέος στα δείγματα την 12^η ημέρα δειγματοληψίας για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 35 °C.



Διάγραμμα 52: Συγκέντρωση φερταρικού οξέος στα δείγματα την 12^η ημέρα δειγματοληψίας για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 35 °C.



Διάγραμμα 53: Συγκέντρωση καφταρικού οξέος στα δείγματα την 12^η ημέρα δειγματοληψίας για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 50 °C.



Διάγραμμα 54: Συγκέντρωση κουταρικού οξέος στα δείγματα την 12^η ημέρα δειγματοληψίας για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 50 °C.

Στο πείραμα επιταχυνόμενης οξείδωσης στους 35 °C τη μεγαλύτερη συγκέντρωση στο σύνολο των υδροξυκιναμωμικών καθώς και των βενζοϊκών οξέων παρουσίασε το δείγμα με τη μέγιστη συγκέντρωση σεληνίου Se max. Ακολουθούν τα δείγματα με τις αμέσως μικρότερες τιμές συγκεντρώσεων ως προς το σύνολο των μη φλαβονοειδών φαινολικών συστατικών: Se min, FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ min και FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se min. Ωστόσο τα δείγματα με τις προσθήκες του μετάλλου σιδήρου και του υπεροξειδίου του υδρογόνου στις μέγιστες συγκεντρώσεις, δηλαδή τα FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se max και FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ max, εμφάνισαν τις μικρότερες τιμές ως προς το σύνολο των υδροξυκιναμωμικών και βενζοϊκών οξέων στο πείραμα επιταχυνόμενης οξείδωσης στους 35 °C (Πίνακες 23 και 25).

Στο πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 50 °C, την υψηλότερη συγκέντρωση ως προς το σύνολο των υδροξυκιναμωμικών οξέων σημείωσαν τα δείγματα με τις προσθήκες σεληνίου Se min και Se max (Πίνακας 24). Ενώ τα δείγματα FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ max και FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se max σημείωσαν τις μικρότερες συγκεντρώσεις ως προς το σύνολο των υδροξυκιναμωμικών οξέων (Πίνακας 24). Συνεπώς, τόσο η αύξηση της θερμοκρασίας στους 50°C, όσο και οι προσθήκες του μετάλλου σιδήρου και του υπεροξειδίου του υδρογόνου στις μέγιστες συγκεντρώσεις τους, μείωσαν περισσότερο την συγκέντρωση των υδροξυκιναμωμικών οξέων στο πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 50 °C, σε σχέση με αυτό των 35 °C.

Ακόμη, όσον αφορά τα βενζοϊκά οξέα του τεστ ταχείας οξείδωσης στους 35 °C, σε αυτό ταυτοποιήθηκε μόνο το γαλλικό οξύ. Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 25, μόνο τα δείγματα με τις μέγιστες συγκεντρώσεις FeCl₂·4H₂O και H₂O₂ παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 με το δείγμα του Μάρτυρα, αλλά και με τα υπόλοιπα δείγματα στο τεστ οξείδωσης στους 35 °C (Διάγραμμα 50).

Ωστόσο στο πείραμα ταχείας οξείδωσης στη θερμοκρασία των 50 °C, τα δείγματα FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ max και FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se min παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές με το δείγμα του Μάρτυρα, ως προς την συγκέντρωση του γαλλικού οξέος. Επίσης κοντινές τιμές με τα δείγματα αυτά παρουσίασε και το δείγμα FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se max (Πίνακας 26).

Συμπερασματικά η προσθήκη του μίγματος $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ και H_2O_2 , ιδιαίτερος στη μέγιστη του συγκέντρωση, μείωσε μέσω του φαινομένου της οξειδωσης την ποσότητα του γαλλικού οξέος στον οίνο και στα δυο πειράματα οξειδωσης.

Όσον αφορά τα υδροξυκινναμωμικά οξέα του οίνου, αυτό που βρέθηκε να υπάρχει σε μεγαλύτερες ποσότητες ήταν το καφταρικό οξύ (caftaric acid) και στα δύο πειράματα οξειδωσης στους 35 και 50 °C (Πίνακες 23 και 24). Στο σημείο αυτό σημειώνεται ότι δεν παρουσιάστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων ως προς τις συγκεντρώσεις του καφταρικού, κουταρικού, καφεϊκού, φερουλικού και π-κουμαρικού οξέος (p-coumaric acid) στο πείραμα ταχείας οξειδωσης στους 35 °C (Πίνακας 23, Διάγραμμα 51). Αντιθέτως, στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 παρουσίασαν τα δείγματα: $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2$ max και $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se}$ max σε σχέση με τον Μάρτυρα, αλλά και με τα υπόλοιπα δείγματα, ως προς την συγκέντρωση του φερταρικού οξέως (fertaric acid) στο πείραμα οξειδωσης των 35 °C (Διάγραμμα 52). Συνεπώς οι προσθήκες του μίγματος $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ και H_2O_2 , στην μέγιστή του συγκέντρωση, επηρέασαν κυρίως τη συγκέντρωση του φερταρικού οξέος. Ενώ τα υπόλοιπα υδροξυκινναμωμικά οξέα που ταυτοποιήθηκαν δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων, ως προς τις συγκεντρώσεις τους, στο πείραμα ταχείας οξειδωσης στους 35 °C.

Ωστόσο, στο πείραμα επιταχυνόμενης οξειδωσης στους 50 °C, τα δείγματα $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se}$ max και $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2$ max σημείωσαν στατιστικά σημαντικές διαφορές με το δείγμα του Μάρτυρα ως προς την συγκέντρωση του καφταρικού οξέος ενώ είναι και αυτά που εμφανίζουν τις μικρότερες τιμές συγκεντρώσεων σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα (Διάγραμμα 53). Παράλληλα, οι υψηλές συγκεντρώσεις καφταρικού οξέος παρατηρήθηκαν στα δείγματα Se min και Se max. Συνεπώς η προσθήκη του μίγματος $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ και H_2O_2 τόσο στη μέγιστη, όσο και στην ελάχιστη συγκέντρωση φαίνεται πως επηρέασε την πτώση της συγκέντρωσης του καφταρικού οξέος στο τέστ ταχείας οξειδωσης στη θερμοκρασία των 50 °C.

Επίσης τα ίδια συμπεράσματα με αυτά του καφταρικού οξέος φαίνεται να ισχύουν και για το κουταρικό και φερταρικό οξύ (Διάγραμμα 54). Ακόμη οι προσθήκες του μετάλλου σιδήρου και του υπεροξειδίου του υδρογόνου στις μέγιστες συγκεντρώσεις τους φαίνεται πως επηρέασαν τις συγκεντρώσεις του καφεϊκού, φερουλικού και π-κουμαρικού οξέος μέσω της συμμετοχής τους στις αντιδράσεις οξειδοαναγωγής, στο πείραμα επιταχυνόμενης οξειδωσης στους 50 °C.

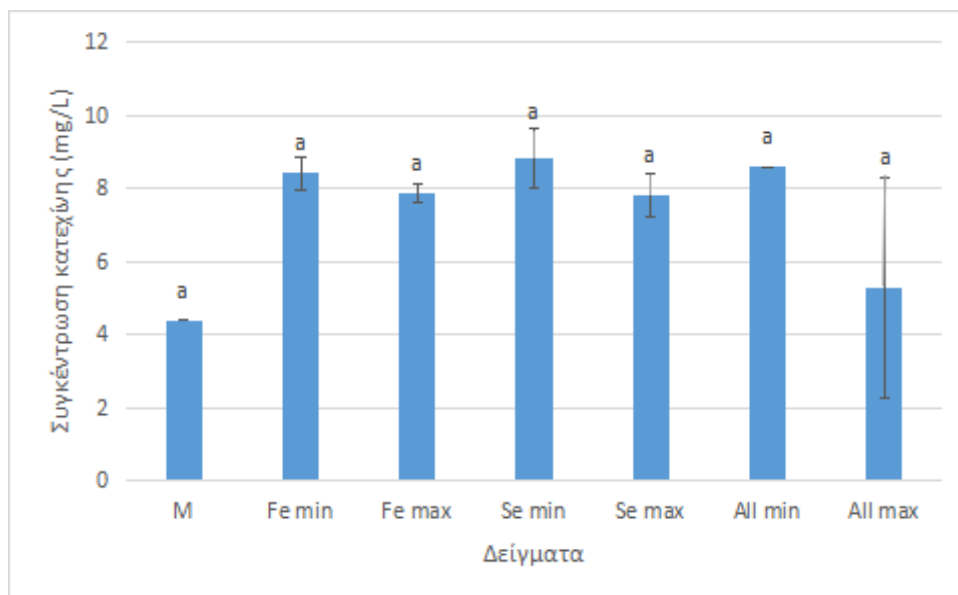
Συμπερασματικά τόσο η αύξηση της θερμοκρασίας στους 50 °C, όσο και οι προσθήκες του σιδήρου και του υπεροξειδίου του υδρογόνου στις μέγιστες συγκεντρώσεις φαίνεται πως επηρέασαν τις συγκεντρώσεις των μη φλαβονοειδών φαινολικών συστατικών που προαναφέρθηκαν. Έτσι εξηγείται και η πτώση της συγκέντρωσης τους στο πείραμα οξειδωσης των 50 °C, ιδιαίτερος στα δείγματα όπου είχε προστεθεί ο Fe(II) και το H_2O_2 στις μέγιστες συγκεντρώσεις, εκτός από το φερταρικό και το γαλλικό οξύ που η μείωση των συγκεντρώσεων τους παρουσιάστηκε και στο πείραμα οξειδωσης των 35 °C.

Επίση τα αποτελέσματα των υδροξυκινναμωμικών οξέων με τη χρήση της μεθόδου HPLC συμφωνούν με τα αποτελέσματα του συντελεστή μεταβολής του χρώματος k και του δείκτη κασάνωσης στα δείγματα με τις διάφορες προσθήκες, ιδιαίτερος για το πείραμα ταχείας αμαύρωσης στη θερμοκρασία των 50 °C.

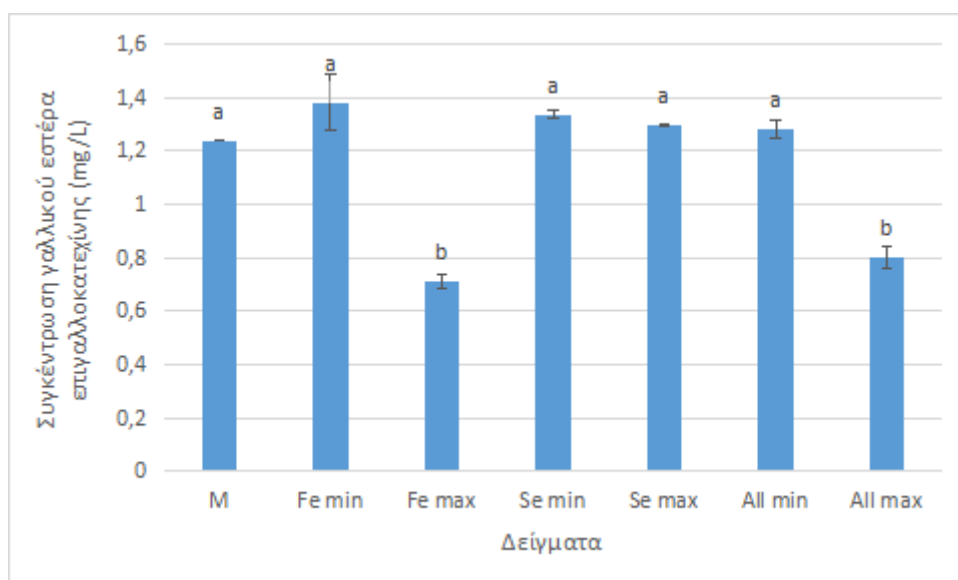
Πίνακας 27: Αναλυτικά αποτελέσματα φλαβονολών στα δείγματα για την 12^η ημέρα δειγματοληψίας στο πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 35 °C.*

Δείγματα 35 °C	catechin	epicatechin	epigallocatechin- 3 - 0- gallate	Σύνολο
Μάρτυρας (Control)	4,398 ^a ± 0,0	2,259 ^a ± 0,0	1,240 ^a ± 0,0	7,897
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ min (Fe min)	8,422 ^a ± 0,453	2,558 ^a ± 0,662	1,382 ^a ± 0,107	12,361
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ max (Fe max)	7,867 ^a ± 0,274	2,074 ^a ± 0,568	0,712 ^b ± 0,025	10,653
Se min	8,838 ^a ± 0,821	1,823 ^a ± 0,274	1,337 ^a ± 0,014	11,997
Se max	7,802 ^a ± 0,585	1,769 ^a ± 0,108	1,296 ^a ± 0,005	10,868
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se min (All min)	8,580 ^a ± 0,006	1,809 ^a ± 0,020	1,285 ^a ± 0,034	11,675
FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se max (All max)	5,294 ^a ± 3,019	1,697 ^a ± 0,086	0,804 ^b ± 0,042	7,794

*Οι τιμές με διαφορετικό εκθέτη παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 και η σύγκρισή τους πραγματοποιήθηκε ανά στήλη.



Διάγραμμα 55: Συγκέντρωση κατεχίνης στα δείγματα την 12^η ημέρα δειγματοληψίας για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 35 °C.

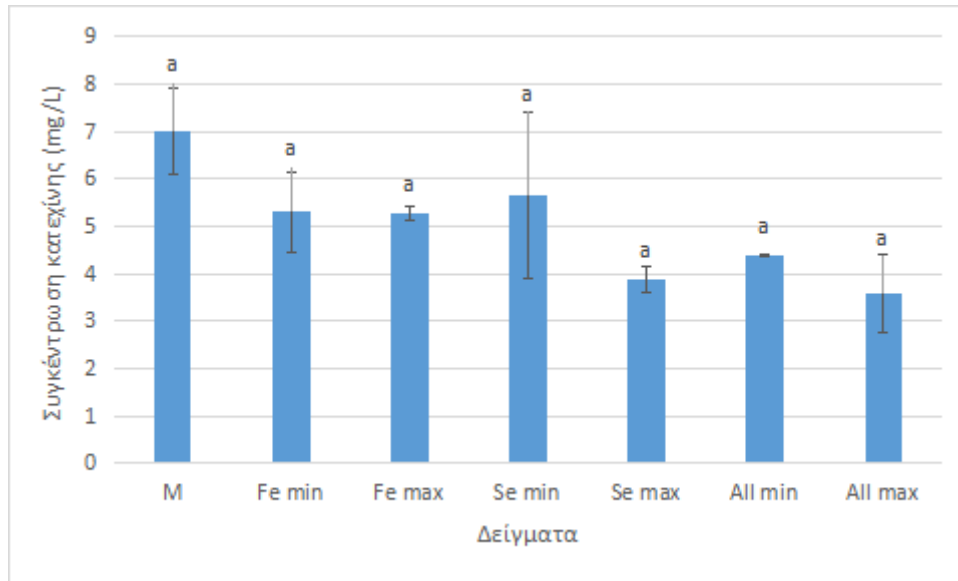


Διάγραμμα 56: Συγκέντρωση γαλλικού εστέρα της επιγαλλοκατεχίνης στα δείγματα την 12^η ημέρα δειγματοληψίας για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 35 °C.

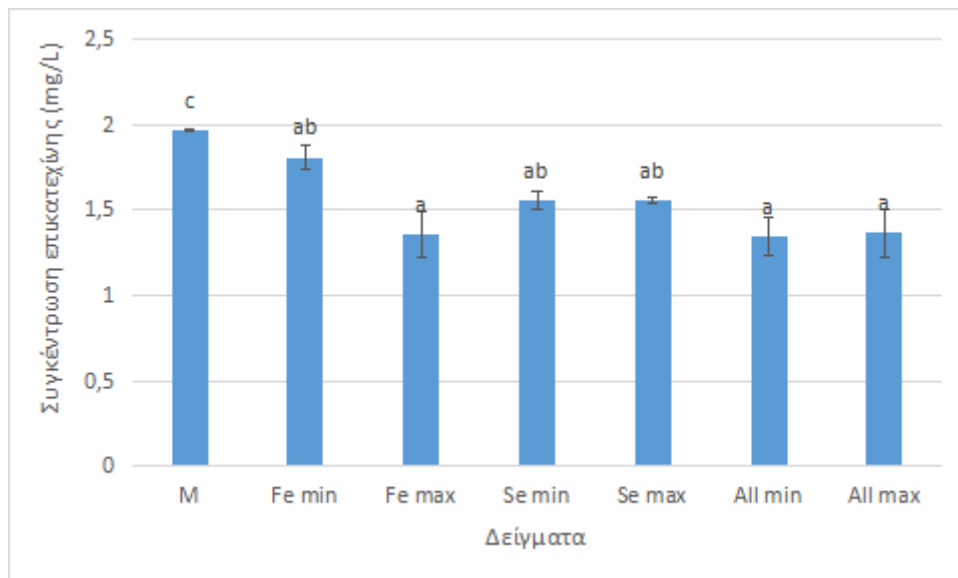
Πίνακας 28: Αναλυτικά αποτελέσματα φλαβονολών στα δείγματα για την 12^η ημέρα δειγματοληψίας στο πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 50 °C.*

Δείγματα 50 °C	catechin	epicatechin	epigallocatechin – 3 - 0 gallate	Σύνολο
Μάρτυρας (Control)	7,004 ^a ± 0,916	1,967 ^c ± 0,008	1,343 ^{ab} ± 0,083	10,313
FeCl ₂ ·4H ₂ O + H ₂ O ₂ min (Fe min)	5,305 ^a ± 0,837	1,810 ^{ab} ± 0,076	1,259 ^{ab} ± 0,042	8,374
FeCl ₂ ·4H ₂ O + H ₂ O ₂ max (Fe max)	5,273 ^a ± 0,166	1,361 ^a ± 0,137	0,916 ^{ab} ± 0,015	7,551
Se min	5,663 ^a ± 1,758	1,558 ^{ab} ± 0,055	1,410 ^a ± 0,001	8,632
Se max	3,885 ^a ± 0,287	1,558 ^{ab} ± 0,018	1,392 ^a ± 0,138	6,835
FeCl ₂ ·4H ₂ O + H ₂ O ₂ + Se min (All min)	4,392 ^a ± 0,034	1,344 ^a ± 0,111	0,885 ^b ± 0,169	6,621
FeCl ₂ ·4H ₂ O + H ₂ O ₂ + Se max (All max)	3,592 ^a ± 0,818	1,367 ^a ± 0,140	1,305 ^{ab} ± 0,006	6,265

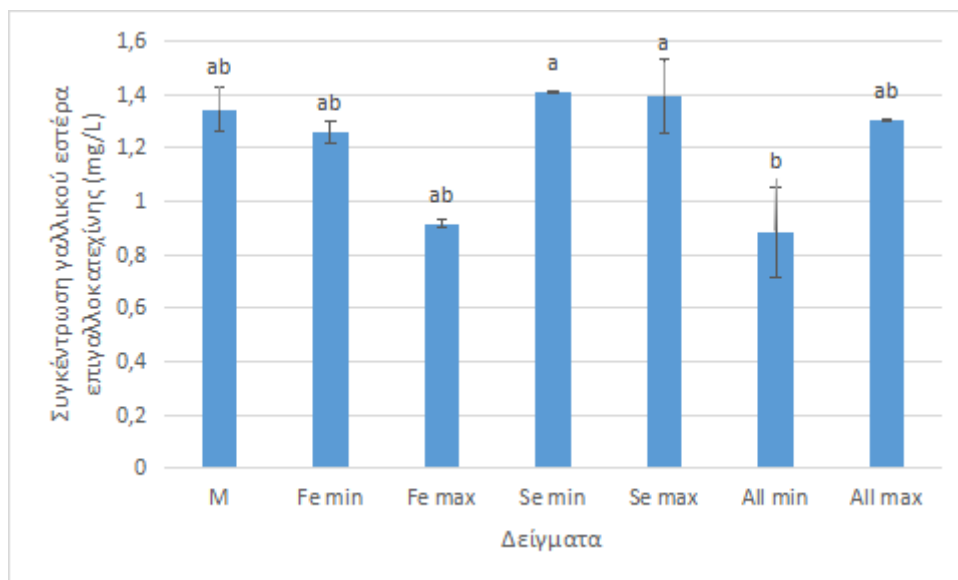
*Οι τιμές με διαφορετικό εκθέτη παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 και η σύγκρισή τους πραγματοποιήθηκε ανά στήλη.



Διάγραμμα 57: Συγκέντρωση κατεχίνης στα δείγματα την 12^η ημέρα δειγματοληψίας για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 50 °C.



Διάγραμμα 58: Συγκέντρωση επικατεχίνης στα δείγματα την 12^η ημέρα δειγματοληψίας για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 50 °C.



Διάγραμμα 59: Συγκέντρωση γαλλικού εστέρα της επιγαλλοκατεχίνης στα δείγματα την 12^η ημέρα δειγματοληψίας για το πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 50 °C.

Από τις τιμές των αναλυτικών αποτελεσμάτων στους Πίνακες 27 και 28 παρατηρείται ότι η κατεχίνη είναι η ένωση που βρέθηκε στις μεγαλύτερες ποσότητες, σε σχέση με τα υπόλοιπα φλαβονοειδή φαινολικά συστατικά που ταυτοποιήθηκαν και στα δυο πειράματα οξείδωσης.

Στο πείραμα οξείδωσης των 35 °C τις υψηλότερες τιμές της συγκέντρωσης των ολικών φλαβονολών που ταυτοποιήθηκαν με την χρήση της HPLC παρουσίασαν τα δείγματα: α) με τις προσθήκες σεληνίου Se min και Se max και β) τα δείγματα με τις προσθήκες του FeCl₂·4H₂O και του H₂O₂ στην μικρή τους συγκέντρωση, δηλαδή τα FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ min και FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se min. Ωστόσο τις μικρότερες συγκεντρώσεις ως προς το σύνολο των φλαβαν-3-ολών σημείωσαν τα δείγματα με τις μέγιστες ποσότητες FeCl₂·4H₂O και H₂O₂, δηλαδή τα FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ max και FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se max καθώς και ο Μάρτυρας (Πίνακας 27).

Πιο αναλυτικά τόσο στη συγκέντρωση της κατεχίνης, όσο και στην επικατεχίνη τα δείγματα δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 μεταξύ τους στο πείραμα ταχείας οξείδωσης στη θερμοκρασία των 35 °C (Διάγραμμα 55). Βέβαια τα δείγματα με την μέγιστη συγκέντρωση του μετάλλου σιδήρου και του H₂O₂: FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ max και FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se max παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς τη συγκέντρωση του γαλλικού εστέρα της επιγαλλοκατεχίνης στο ίδιο πείραμα οξείδωσης (Διάγραμμα 56).

Αντίστοιχα στο πείραμα ταχείας οξείδωσης στη θερμοκρασία των 50 °C σημειώθηκε μείωση των τιμών των συγκεντρώσεων όλων των φλαβονολών που ταυτοποιήθηκαν με τη μέθοδο HPLC, σε σχέση με τις τιμές του πειράματος στη θερμοκρασία των 35 °C. Επίσης τα δείγματα δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 ως προς την συγκέντρωση της κατεχίνης, ενώ ως προς την συγκέντρωση της επικατεχίνης όλα τα δείγματα με την προσθήκη του FeCl₂·4H₂O και του H₂O₂, δηλαδή τα FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ min, FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ max και FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se min, FeCl₂·4H₂O + H₂O₂ + Se max παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με το δείγμα του Μάρτυρα στο πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 50 °C (Διαγράμματα 57 και 58). Βέβαια τα δείγματα με τις προσθήκες σεληνίου Se min και Se max

εμφάνισαν τιμές συγκεντρώσεων επικατεχίνης κάπου ενδιάμεσα με τις τιμές του Μάρτυρα και των δειγμάτων με τις προσθήκες του δισθενούς σιδήρου και του υπεροξειδίου του υδρογόνου (Πίνακας 28).

Επίσης το δείγμα $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se min}$ σημείωσε στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 με το δείγμα του Μάρτυρα, ενώ οι τιμές των υπολοίπων δειγμάτων $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 \text{ min}$, $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 \text{ max}$ και $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Se max}$ δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς την συγκέντρωση του γαλλικού εστέρα της επιγαλλοκατεχίνης στο πείραμα επιταχυνόμενης οξείδωσης στη θερμοκρασία των 50 °C. Ωστόσο στατιστικά σημαντικές διαφορές με το δείγμα του Μάρτυρα, αλλά και με τα υπόλοιπα δείγματα, ως προς τη συγκέντρωση του γαλλικού εστέρα της επιγαλλοκατεχίνης σημείωσαν τα δείγματα με τις προσθήκες σεληνίου, δηλαδή τα Se min και Se max (Διάγραμμα 59)

Συμπερασματικά, τόσο η αύξηση της θερμοκρασίας στους 50 °C, όσο και οι προσθήκες του δισθενούς μετάλλου σιδήρου και του υπεροξειδίου του υδρογόνου, ιδιαίτερος στις μέγιστες συγκεντρώσεις τους, φαίνεται να επιτάχυναν τις διαδικασίες οξειδοαναγωγής και να μείωσαν τις συνολικές ποσότητες των φλαβονολών του οίνου.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η δημιουργία του οξειδωτικού καφετιάσματος στους λευκούς οίνους έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της αντιοξειδωτικής του ικανότητας. Αρχικά και στα δυο πειράματα οξείδωσης παρουσιάστηκε αύξηση του δείκτη καστανώσης με το χρόνο, ενώ η αύξηση της θερμοκρασίας στο πείραμα οξείδωσης στους 50 °C φαίνεται πως επιτάχυνε τις αντιδράσεις οξειδοαναγωγής σε όλα τα δείγματα. Τη μεγαλύτερη αύξηση της απορρόφησης στα 420 nm κατά το διάστημα των 12 ημερών και τις υψηλότερες τιμές του συντελεστή του ρυθμού μεταβολής του χρώματος k , αλλά και της μεταβολής $\% \Delta A_{420}$, σημείωσαν τα δείγματα με τις προσθήκες δισθενούς σιδήρου και υπεροξειδίου του υδρογόνου στις μέγιστες συγκεντρώσεις και στα δύο πειράματα επιταχυνόμενης οξείδωσης. Συνεπώς τόσο η αύξηση της θερμοκρασίας στους 50 °C, όσο και η καταλυτική δράση του δισθενούς σιδήρου και του υπεροξειδίου του υδρογόνου, ιδιαίτερος στις μέγιστες συγκεντρώσεις τους, συντέλεσαν στην επιτάχυνση των αντιδράσεων οξειδοαναγωγής και στην αύξηση της αμαύρωσης των λευκών οίνων. Επομένως η προσθήκη του δισθενούς μετάλλου σιδήρου σε συνδυασμό με το υπεροξείδιο του υδρογόνου στις μέγιστες συγκεντρώσεις τους σχετίζονται με την αύξηση δημιουργίας της οξειδωτικής αμαύρωσης στο λευκό οίνο.

Επιπλέον η αύξηση του καφέ χρώματος συνέβαλε στη μεγαλύτερη εξάντληση του ολικού και ελεύθερου θειώδους ανυδρίτη, αφήνοντας έτσι τα κρασιά χωρίς προστασία από περαιτέρω οξείδωση. Συγκεκριμένα τόσο η αύξηση της θερμοκρασία στο πείραμα επιταχυνόμενης οξείδωσης στους 50 °C, όσο και οι προσθήκες σιδήρου και υπεροξειδίου του υδρογόνου, ιδιαίτερος στις μέγιστες συγκεντρώσεις τους, επιτάχυναν την εξάντληση των ποσοτήτων του ολικού και ελεύθερου θειώδους ανυδρίτη και κατά συνέπεια και τη μείωση της αναγωγικής τους ικανότητας. Ωστόσο η προσθήκη σεληνίου, ανεξαρτήτως συγκέντρωσης, δεν επηρέασαν την μείωση του θειώδους ανυδρίτη σε κανένα από τα δυο πειράματα οξείδωσης.

Επίσης οι συγκεντρώσεις των ολικών φαινολικών ουσιών καθώς και αυτές των φλαβονολών παρουσίασαν μείωση με το χρόνο ιδιαίτερος στα δείγματα με τις μέγιστες συγκεντρώσεις δισθενούς σιδήρου και υπεροξειδίου του υδρογόνου. Παρ'όλα αυτά η μείωση της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών ουσιών δε σχετίζεται με την αύξηση του οξειδωτικού καφετιάσματος στα δείγματα με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις και προσθήκες. Αντιθέτως, η πτώση της συγκέντρωσης των φλαβαν-3-ολών παρουσίασε συσχέτιση με την αύξηση του δείκτη καστανώσης κατά το διάστημα των 12 ημερών και συνεπώς με την εμφάνιση του οξειδωτικού καφετιάσματος στο κρασί. Συγκεκριμένα, μείωση στη συγκέντρωση των φλαβονολών σημειώθηκε και στα δυο πειράματα επιταχυνόμενης οξείδωσης. Ωστόσο στο πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 50 °C, τόσο η αύξηση της θερμοκρασίας στους 50 °C, όσο και η προσθήκη του δισθενούς μετάλλου σιδήρου και υπεροξειδίου του υδρογόνου, ιδιαίτερος στις μέγιστες συγκεντρώσεις τους, επιτάχυναν τη μείωση της συγκέντρωσης των φλαβονολών. Επομένως τη μεγαλύτερη ευαισθησία στις αντιδράσεις οξειδοαναγωγής σημείωσαν οι συγκεντρώσεις των φλαβονολών, σε σχέση με τις συγκεντρώσεις των ολικών φαινολικών ουσιών του οίνου. Συνεπώς, η μείωση της συγκέντρωσης των φλαβαν-3-ολών σχετίζεται με την εμφάνιση του οξειδωτικού καφετιάσματος στο λευκό οίνο και στα δύο πειράματα επιταχυνόμενης οξείδωσης.

Επίσης οι φλαβανόλες που ταυτοποιήθηκαν στον οίνο την 12^η ημέρα δειγματοληψίας ήταν η κατεχίνη, η επικατεχίνη και ο γαλλικός εστέρας της επιγαλλοκατεχίνης. Η κατεχίνη ήταν αυτή που βρέθηκε στη μεγαλύτερη συγκέντρωση, όμως οι συγκεντρώσεις της δεν παρουσίασαν στατιστικά

σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα δείγματα την 12^η ημέρα σε κανένα από τα δύο πειράματα επιταχυνόμενης οξειδωσης. Αντιθέτως στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα δείγματα σημείωσαν οι συγκεντρώσεις της επικατεχίνης και του γαλλικού εστέρα της επιγαλλοκατεχίνης, ιδιαιτέρως στο πείραμα ταχείας οξειδωσης στους 50 °C. Επομένως τόσο η υψηλή θερμοκρασία, όσο και η προσθήκη του FeCl₂·4H₂O και του H₂O₂, ιδιαιτέρως στη μέγιστή τους συγκέντρωση, συνέβαλαν στην οξειδωση και συνεπώς στη μείωση της συγκέντρωσης των φλαβονολών, έχοντας ως αποτέλεσμα την αύξηση του καφέ χρώματος στον οίνο.

Επιπροσθέτως οι συγκεντρώσεις των υδροξυκινναμωμικών οξέων δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων στο ταχείας οξειδωσης στους 35 °C. Αντιθέτως στο πείραμα επιταχυνόμενης οξειδωσης στη θερμοκρασία των 50 °C παρατηρήθηκε ότι τόσο η αύξηση της θερμοκρασίας στους 50 °C, όσο και οι αυξημένες συγκεντρώσεις του μετάλλου Fe(II) και του H₂O₂ μείωσαν τις συγκεντρώσεις των υδροξυκινναμωμικών οξέων. Επομένως οι συγκεντρώσεις των υδροξυκινναμωμικών οξέων σχετίζονται με την αύξηση του οξειδωτικού καφετιάσματος του οίνου, ιδιαιτέρως στο πείραμα επιταχυνόμενης οξειδωσης στη θερμοκρασία των 50 °C. Ακόμη όσον αφορά τα υδροξυκινναμωμικά οξέα του οίνου, το καφταρικό οξύ ήταν αυτό που βρέθηκε στη μεγαλύτερη συγκέντρωση κατά την 12^η ημέρα δειγματοληψίας και στα δύο πειράματα ταχείας οξειδωσης. Επιπλέον στο κρασί ταυτοποιήθηκαν και το κουταρικό, φερταρικό, καφεϊκό, φερουλικό και π-κουμαρικό οξύ σε αρκετά μικρότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με αυτής του καφταρικού οξέος.

Επίσης τη μεγαλύτερη μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, στα πειράματα ταχείας οξειδωσης στους 35°C και 50°C, παρουσίασαν τα δείγματα με τις προσθήκες του μίγματος FeCl₂·4H₂O και H₂O₂ στις μέγιστες συγκεντρώσεις όπου είχαν προστεθεί στο κρασί. Επομένως τόσο η αύξηση της απορρόφησης στα 420 nm κατά το διάστημα των 12 ημερών, όσο και οι τιμές του συντελεστή k σχετίζονται με τη μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δυο πειραμάτων οξειδωσης στους 35 και 50 °C. Επιπλέον η αύξηση της θερμοκρασίας στους 50 °C επιτάχυνε τις αντιδράσεις οξειδοαναγωγής και συνεπώς τη μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας στο χρόνο σε όλα τα δείγματα. Όσον αφορά τις προσθήκες σεληνίου, ανεξαρτήτως συγκέντρωσης, δεν επηρέασαν την αντιοξειδωτική ικανότητα των δειγμάτων στα οποία είχαν προστεθεί.

Συμπληρωματικά και η συγκέντρωση των ολικών ελεύθερων σουλφρυδυλομάδων (SH) παρουσίασε ξεκάθαρη μείωση κατά το διάστημα των 12 ημερών και στα δύο πειράματα επιταχυνόμενης οξειδωσης στις θερμοκρασίες των 35 °C και 50 °C. Τη μεγαλύτερη μείωση της συγκέντρωσης των ομάδων -SH στο χρόνο σημείωσαν τα δείγματα με τις υψηλές συγκεντρώσεις του δισθενούς μετάλλου σιδήρου και υπεροξειδίου του υδρογόνου. Συνεπώς τόσο η αύξηση της θερμοκρασίας στους 50 °C, όσο και οι προσθήκες σιδήρου και υπεροξειδίου του υδρογόνου, ιδιαίτερα στις μέγιστες συγκεντρώσεις τους, συντέλεσαν στη μείωση της συγκέντρωσης των ολικών ελεύθερων σουλφρυδυλομάδων του οίνου. Το αποτέλεσμα αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η αύξηση του οξειδωτικού καφετιάσματος φέρει ανάλογη επιδείνωση στη συγκέντρωση των ομάδων SH και στην αντιοξειδωτική ικανότητα των λευκών οίνων.

Με βάση όλων των προαναφερόμενων συμπερασμάτων φαίνεται πως η ανάπτυξη της αμαύρωσης των λευκών οίνων είναι αποτέλεσμα συνδυασμού τόσο της θερμοκρασίας, όσο και της καταλυτικής δράσης του δισθενούς μετάλλου σιδήρου και του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Καθώς όσο αυξάνεται η θερμοκρασία και οι συγκεντρώσεις του Fe²⁺ και του H₂O₂, τόσο το φαινόμενο της οξειδωσης επιταχύνεται ενώ τόσο μεγαλύτερη θα είναι και η ανάπτυξη του καφέ χρώματος (browning) στο λευκό κρασί.

Παράλληλα η προσθήκη του σεληνίου, ανεξαρτήτως συγκέντρωσης, στο πείραμα επιταχυνόμενης οξείδωσης στους 35 °C προστάτευε τον οίνο από το καφέτιασμα. Αντιθέτως, στο πείραμα επιταχυνόμενης οξείδωσης στη θερμοκρασία των 50 °C, παρόμοια δράση του σεληνίου δεν παρατηρήθηκε ίσως λόγω παρεμπόδισης από την υψηλότερη θερμοκρασία. Συνεπώς η προσθήκη σεληνίου στο πείραμα επιταχυνόμενης οξείδωσης στη θερμοκρασία των 35 °C συντέλεσε στη μείωση του ρυθμού εμφάνισης της αμάρωσης στο λευκό οίνο. Επιπλέον, στα δείγματα όπου πραγματοποιήθηκε η προσθήκη σεληνίου σε συνδυασμό με το σίδηρο και το υπεροξειδίο του υδρογόνου, σημειώνεται ότι το σελήνιο δεν παρείχε αντιοξειδωτική προστασία σε κανένα από τα δύο πειράματα ταχείας οξείδωσης, καθώς υπερισχύει η δράση του δισθενούς μετάλλου σιδήρου το οποίο επιταχύνει την οξείδωση.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

- Adams, D. O. & Liyanage, C. (1993). Glutathione Increases in Grape Berries at the Onset of Ripening. *American Journal of Enology and Viticulture*, **44**: 333-338.
- Allen, M.S., Lacey, M.J., Harris, R.L.N. & Brown, W.V. (1991). Contribution of methoxypyrazines to Sauvignon Blanc wine aroma. *American Journal of Enology and Viticulture*, **42**: 109–112.
- Allen, M. S., Lacey, M. J., & Boyd, S. J. (1995). Methoxypyrazines in Red Wines: Occurrence of 2-Methoxy-3-(1-methylethyl) pyrazine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **43**(3): 769–772.
- Allen, M.S. and Lacey, M.J. (1998). Methoxypyrazines of Grapes and Wines. *ACS Symposium Series*, **714**: 31–38.
- Ali, K., Maltese, F., Choi, Y., Verpoorte, R. (2010). Metabolic constituents of grapevine and grape-derived products. *Phytochemistry Reviews*, **9**: 357-378.
- Arce, L., Ríos, A., & Valcárcel, M. (1998). Direct determination of biogenic amines in wine by integrating continuous flow clean-up and capillary electrophoresis with indirect UV detection. *Journal of Chromatography A*, **803**(1-2): 249–260.
- Arnous, A., Makris, D. P., & Kefalas, P. (2001). Effect of principal polyphenolic components in relation to antioxidant characteristics of aged red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49** (12): 5736–5742.
- Augustyn, O. P. H., Rapp, A., & Van Wyk, C. J. (1982). Some Volatile Aroma Components of *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, **3**: 53-60.
- Bayonove, C., Cordonnier, R., & Dubois, P. (1975). Study of a fraction characteristic of the aroma of Cabernet-Sauvignon grape variety. Identification of 2-methoxy-3-isobutylpyrazine. *C. R. Acad. Sci. Paris, Ser. D*, **281**: 75-78.
- Badea, G. A. & Antocea, O. A. (2015). Glutathione as a possible replacement of sulfur dioxide in winemaking technologies: A review. *Scientific Papers. Series B. Horticulture*, **59**: 123-140.
- Barbulescu, I., Ferdes, M., Carmen, B., Rodica, A. & Teodorescu, R. (2012). Improving wine-making products with selenium and total polyphenols. *Romanian Biotechnological Letters*, **17**: 7646-7655.
- Battin, E. E. & Brumaghim, J. L. (2009). Antioxidant Activity of Sulfur and Selenium: A Review of Reactive Oxygen Species Scavenging, Glutathione Peroxidase, and Metal-Binding Antioxidant Mechanisms. *Cell Biochem Biophys.*, **55** :1–23.
- Bauza, T., (1995). Les amines biogenes du vin: Metabolisme et toxicite, Bauza, T., Blaise, A., Teissedre, P., Cabanis, J., and Kanny, G., Eds., Paris: OIV, 1995, **68**: 42–67.
- Belitz, D. H., Grosch, W. & Schieberle, P., (2009). *Food Chemistry*, Ed. 4th, Springer.

- Benítez, P., Castro, R., Antonio Sanchez, P. J., & Barroso, C. G. (2002a). Influence of metallic content of fino sherry wine on its susceptibility to browning. *Food Research International* **35**: 785-791.
- Benítez, P., Castro, R. & Barroso, C. G. (2002 b). Removal of iron, copper and manganese from white wines through ion exchange techniques: effects on their organoleptic characteristics and susceptibility to browning. *Anal. Chim. Acta* **458**: 197–202.
- Berg, H.W., & Akiyoshi, M. (1956). Some factors involved in browning of white wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **7**: 1-7.
- Blanchard, L., P. Darriet & D. Dubourdieu. (2004). Reactivity of 3-mercaptohexanol in red wine: Impact of oxygen, phenol fractions, and sulfur dioxide. *Am. J. Enol. Vitic.* **55**:115-120.
- Bors W, Michel C, Stettmeier K (2000) *Arch. Biochem. Biophys.*, **374**: 347–355
- Boulton, R. B. (2003). A radical view of oxidative reactions in wine. In IX Congreso latinoamericano de viticultura y enología. P. Pszczółkowski (Ed.), pp. 107-123. Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago.
- Bradshaw, M. P., Prenzler, P. D. & Scollary, G. R. (2001). Ascorbic acid-induced browning of (+)-catechin in a model wine system. *J. Agric. Food Chem.*, **49**: 934–939.
- Bradshaw, M. P., Cheynier, V., Scollary, G. R. & Prenzler, P. D. (2003). Defining the ascorbic acid crossover from anti-oxidant to pro-oxidant in a model wine matrix containing (+)- catechin. *J. Agric. Food Chem.*, **51**: 4126–4132.
- Bradshaw, M.P., Scollary, G.R. and Prenzler, P.D. (2004), Examination of the sulfur dioxide–ascorbic acid anti-oxidant system in a model white wine matrix. *J. Sci. Food Agric.*, **84**: 318-324.
- Bradshaw, M. P., Barril, C., Clark A. C., Prenzler P. D. & Scollary, G.R.(2011). Ascorbic Acid: A Review of its Chemistry and Reactivity in Relation to a Wine Environment, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **51** (6): 479-498.
- Buckingham, J., & Munasinghe, V. R. N. (2015). *Dictionary of Flavonoids*. Boca Raton: CRC Press.
- Cacho, J., J. Enrique Castells, Adoración Esteban, Berta Laguna, Nuria Sagristá. (1995). Iron, Copper, and Manganese Influence on Wine Oxidation. *Am J Enol Vitic.*, **46**: 380-384.
- Charles-Bernard, M., Kraehenbuehl, K., Rytz, A., & Roberts, D.D. (2005). Interactions between volatile and nonvolatile coffee components. 1. Screening of nonvolatile components. *J. Agric. Food Chem.*, **53**: 4417–4425.
- Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J. N. (1995). The Influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. Yeasts and Lactic Acid Bacteria on the Ethylphenol Content of Red Wines. *Am J Enol Vitic.*, **46** (4): 463-468.
- Chauvet, J., Brechot, P., Dubois, C., Dupuy, P., & Dorange, J. L. (1982). Malic and citric acid stimulating growth of malolactic bacteria in wine [*Leuconostoc oenos*, metabolism]. *Sciences des Aliments*, **2**: 495.

- Cheynier, V., Trousdale, E., Singleton, V., Salgues, M., Wylde, R. (1986). Characterization of 2-S-glutathionyl caftaric acid and its hydrolysis in relation to grape wines. *J. Agric. Food Chem.*, **34**: 217–221.
- Cheynier, V., Basire, N. & Rigaud, J. (1989 a). Mechanism of trans-caffeoyltartaric acid and catechin oxidation in model solutions containing grape polyphenoloxidase. *J. Agric. Food Chem.*, **37**: 1069–1071.
- Cheynier, V., Souquet, J. M. & Moutounet, M. (1989 b). Glutathione Content and Glutathione to Hydroxycinnamic Acid Ratio in *Vitis vinifera* Grapes and Musts. *American Journal of Enology and Viticulture*, **40** (4): 320-324.
- Cheynier, V., Rigaud, J., Souquet, J.-M., Duprat, F., & Moutounet, M. (1990). Must Browning in Relation to the Behavior of Phenolic Compounds During Oxidation. *American Journal of Enology and Viticulture*, **41**: 346-349.
- Cheynier, V., & Ricardo da Silva, J. M. (1991). Oxidation of grape procyanidins in model solutions containing trans-caffeoyl-tartaric acid and polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **39**: 1047–1049.
- Cheynier, V., Masson, G., Rigaud, J. & Moutounet, M. (1993). Estimation of must oxidation during pressing in Champagne. *Am. J. Enol. Vitic.*, **44**: 393–9.
- Cheynier, V. (2002) Oxygen in wine and its role in phenolic reactions during ageing. In Allen M., Bell S., Rowe N. and Wall G. (eds), *Uses of Gases in Winemaking*. Adelaide, SA, Australian Society of Viticulture and Enology, 23–27.
- Cheynier, V. (2006). Flavonoids in wine. In: *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*, 273–299, Boca Raton: CRC Taylor and Francis Group
- Chinnici, F., Sonni, F., Natali, N. & Riponi, C. (2013). Oxidative evolution of (+)-catechin in model wine solutions containing sulfur dioxide, ascorbic acid or gallotannins. *Food Research International*, **51** (1): 59-65.
- Chong, M. F. F., MacDonald, R., & Lovegrove, J.A. (2010). Fruit polyphenols and CVD risk: a review of human intervention studies. *The British Journal of Nutrition*, **104**: S28-S39.
- Cilliers, J. L., & Singleton, V. L. (1990). Nonenzymic autoxidative reactions of caffeic acid in wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, **41**: 84–86.
- Claus, H. (2017). Laccases of *Botrytis cinerea*. In: König H., Uden G., Fröhlich J. (eds) *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Springer, Cham., 339-356.
- Covas, M. I., Gambert, P., Fitó, M., & de la Torre, R. (2010). Wine and oxidative stress: up-to-date evidence of the effects of moderate wine consumption on oxidative damage in humans. *Atherosclerosis*, **208** (2): 297-304.
- Cueva, C., Mingo, S., Muñoz-González, I., Bustos, I., Requena, T., del Campo, R., Martín-Álvarez, P., Bartolomé, B. & Moreno-Arribas, M. (2012), Antibacterial activity of wine phenolic compounds and oenological extracts against potential respiratory pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, **54**: 557-563.
- Cullère, L., Cacho, J., & Ferreira, V. (2007), An assessment of the role played by some oxidation-related aldehydes in wine aroma. *J. Agric. Food Chem.*, **55**: 876–881.

- Cvetkovic, J., Stafilov, T. & Mihajlovic, D. (2001). Nickel and strontium nitrates as modifiers for the determination of selenium in wine by Zeeman electrothermal atomic absorption spectrometry. *Fresenius J. Anal. Chem.*, **370** (8): 1077.
- Danilewicz, J. C. (2003). Review of reaction mechanisms of oxygen and proposed intermediate reduction products in wine: central role of iron and copper. *Am. J. Enol. Vitic.*, **54**:73–85.
- Danilewicz, J. C. (2007), Interaction of sulfur dioxide, polyphenols, and oxygen in a wine model system: central role of iron and copper. *Am. J. Enol. Vitic.*, **58**: 53–60.
- Danilewicz, J. C., Seccombe, J. T. & Whelan, J. (2008), Mechanism of interaction of polyphenols, oxygen, and sulfur dioxide in model wine and wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, **59**: 128–136.
- Dawes H., Boyes S., Keene J. and Heatherbell D. (1994), *Am. J. Enol. Viticult.*, **45** (3): 319.
- Dell'Agli, M., Buscialà, A., & Bosisio, E. (2004). Vascular effects of wine polyphenols. *Cardiovascular Research*, 63(4), 593–602.
- 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** (1): 76-94.
- du Toit, W. J., Lisjak, K., Stander, M. & Prevo, D. (2007). Using LC-MS/MS to assess glutathione levels in South African white grape juices and wines made with different levels of oxygen. *J. Agric. Food Chem.*, **55**: 2765–2769.
- Elias, R. J., & Waterhouse, A. L. (2010). Controlling the Fenton Reaction in Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**(3): 1699–1707.
- Escudero, A., Asensio, E., Cacho, J., & Ferreira, V. (2002). Sensory and chemical changes of young white wines stored under oxygen. An assessment of the role played by aldehydes and some other important odorants. *Food Chem.*, **77** (3): 325-331.
- Escudero, A., Campo, E., Farina, L., Cacho, J., & Ferreira, V. (2007). Analytical characterization of the aroma of five premium red wines. Insights into the role of odor families and the concept of fruitiness of wines. *J. Agric. Food Chem.*, **55**: 4501–4510.
- Eschnauer, H., Alt, F., Messerschmidt, J. & Tölg, G. (2019). SELENIUM IN WINE: . In: Nève, J. and Favier, A. Ed. *Selenium in Medicine and Biology: Proceedings of the Second International Congress on Trace Elements in Medicine and Biology*. March 1988, Avoriaz, France. Berlin, Boston: De Gruyter, 23-28.
- Fedrizzi, B., Magno, F., Badocco, D., Nicolini, G., & Versini, G. (2007). Aging effects and grape variety dependence on the content of sulfur volatiles in wine. *J. Agric. Food Chem.*, **55**: 10880–10887.
- Fenton, H. J. H., (1894). Oxidation of tartaric acid in the presence of iron. *J. Chem. Soc.*, **75**: 1-11.
- Fenton, H. J. H., & Jackson, H. J. (1899). The oxidation of polyhydric alcohols in presence of iron. *Journal of Chemical Society., Trans.*, **75**: 1-11.
- Fernández-Zurbano, P., Ferreira, V., Pena, C., Escudero, A., Serrano, F. & Cacho, J. (1995). Prediction of Oxidative Browning in White Wines as a Function of Their Chemical Composition. *J. Agric. Food Chem.*, **43**:2813–2817.

- Fernández-Zurbano, P., Ferreira, V., Escudero, A., & Cacho, J. (1998). Role of Hydroxycinnamic Acids and Flavanols in the Oxidation and Browning of White Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**(12): 4937–4944
- Ferreira, V., Escudero, A., Fernandez, P. E., Cacho, J. (1997). Changes in the profile of volatile compounds in wines stored under oxygen and their relationship with the browning process. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **205**: 392-396.
- Feuillat, M. (1974). Nitrogen constituents of grapes and wines. *Le Vigneron Champenois*, **5**: 201-210.
- Frankel, E.N., Kanner, J., German, J.B., Parks, E., Kinsella, J.E. (1993). Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet*, **341**(8843): 454-457.
- Frias, S., Diaz, C., Conde, J. E. & Perez Trujillo, J.P. (2003). Selenium and mercury concentrations in sweet and dry bottled wines from the Canary Islands, Spain. *Food Addit. Contam.*, **20** (3): 237.
- Gnekow, B. & Ough, C. S. (1976). Methanol in Wines and Musts: Source and Amounts, *Am. J. Enol. Vitic.*, **27** (1): 1-6.
- Goldberg, D. M., Yan, J., Diamandis, E. P., Karumanchiri, A., Waterhouse, A. L., Soleas, G. J. (1993). A definitive gas-chromatographic mass-spectrometric assay for resveratrol suitable for industrial and biological samples. *Clin. Biochem.*, **26**: 126-127.
- Gonzales Cartagena, L., Pérez-Zúñiga, F. J., & Abad, F. B. (1994). Interactions of some environmental and chemical parameters affecting the colour attributes of wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, **45**: 43–48.
- Gonzalez-Gallego, J., Garcia-Mediavilla, M. V., Sanchez-Campos, S., Tunon, M.J. (2010). Fruit polyphenols, immunity and inflammation. *The British Journal of Nutrition*, **104**: S15-S27.
- Grainger, K. (2009). *Wine quality: Tasting and Selection*, 8, John Wiley & Sons.
- Green, M.J., & H.A.O. Hill. (1984). Chemistry of dioxygen. *Methods Enzymol.* **105**: 3-22.
- Guyot, S., Vercauteren, J., & Cheynier, V. (1996). Structural determination of colourless and yellow dimers resulting from (+)-catechin coupling catalysed by grape polyphenoloxidase. *Phytochemistry*, **42**: 1279–1288.
- Haber, F. & Weiss, J. (1934). *Proc. R. Sot. London Ser. A* **147**: 332-351.
- Haslam, E. (1980). In vino veritas: oligomeric procyanidins and the aging of red wines. *Phytochemistry*, **19**: 1577–1582.
- Hodson, G., Wilkes, E., Azevedo, S., & Battaglene, T. (2017). Methanol in wine. *BIO Web of Conferences*, **9**: 02028.
- Hornsey, I. S., (2007). *The Chemistry and Biology of Winemaking*. Royal Society of Chemistry.
- Jackson R.S. (1994), *Wine Science. Principles and Applications*, Academic Press, San Diego.

- Jackson, R. S. (2002). Wine Tasting. A Professional Handbook. Brock University. Food Science and Technology, International Series, Academic Press, Ontario.
- Jackson, R. S. (2008). Wine Science: Principles and Applications, 3^d Ed., Academic Press is in imprint of Elsevier. Elsevier Inc., San Diego, California, USA.
- Jeandet, P., Bessis, R., Maume, B. F., Sbaghi, M. (1993). Analysis of resveratrol in Burgundy wines. *J. Wine Res.*,**4**: 79-85.
- Jeandet, P., Bessis, R., Maume, B. F., Meunier, P., Peyron, D., & Trollat, P. (1995). Effect of Enological Practices on the Resveratrol Isomer Content of Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **43**(2): 316–319.
- Kallithraka, S., Arvanitoyannis, I., El-Zajouli, A., & Kefalas, P. (2001). The application of an improved method for trans-resveratrol to determine the origin of Greek red wines. *Food Chemistry* **75**(3): 355–363.
- Kallithraka, S., Arvanitoyannis, I., Kefalas, P., El-Zajouli, A., Soufleros, E., & Psarra, E. (2001). Instrumental and sensory analysis of Greek wines; implementation of principal component analysis (PCA) for classification according to geographical origin. *Food Chemistry*, **73**:501–514.
- Kallithraka, S., Tsoutsouras, E., Tzourou, E., & Lanaridis, P. (2006).Principal phenolic compounds in Greek red wines. *Food Chemistry* **99**:784–793.
- Kallithraka, S., Salacha, M. I., & Tzourou, I. (2009). Changes in phenolic composition and antioxidant activity of white wine during bottle storage: Accelerated browning test versus bottle storage. *Food Chemistry* **113**: 500-505.
- Kedare S. B. & Singh R. P.(2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J. Food Sci. Technol.*, **48**(4): 412-22.
- Kilmartin, P. A. (2010). Understanding and controlling non enzymatic wine oxidation, Editor: Andrew G. Reynolds, In Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Managing Wine Quality, Woodhead Publishing, 432-458.
- Kinsella, J.E., Frankel, E., German, B., Kanner, J. (1993). Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. *Food Technology*, **47**:85.
- Koch, J. & Sajak, E. (1959). Weinberg u. Keller, **10**: 35.
- Kontogeorgos, N. and I. G. Roussis, 2014: Total free sulphhydryls of several white and red wines. *South African Journal of Enology and Viticulture*, **35** (1): 125-127.
- Kushnereva, E.V. (2015). Formation of biogenic amines in wine production. *Appl. Biochem. Microbiol.*, **51**:108–112.
- Laborde, J. (1904), *Rev. Viticult.* **21**: 8.
- Lambropoulos, I. & Roussis, I. G. (2007). Inhibition of the decrease of volatile esters and terpenes during storage of a white wine and a model wine medium by caffeic acid and gallic acid. *Food Res. Int.* **40**: 176–181.
- Lamuela-Raventos, R. M. & Waterhouse, A. L. (1993). Occurrence of resveratrol in selected California wines by a new HPLC method., *J. Agric. Food Chem.*, **41**: 521-523.

- Langcake, P., (1981). Disease resistance of *Vitis* spp. and the production of the stressmetabolites resveratrol, e-viniferin, a-viniferin and pterostilbene. *Physiological Plant Pathology*, **18** (2): 213-226.
- Laszlo, J., van Rooyen, T. J., & Kirschbaum, A. F. (1978), The combination of molecular oxygen in grape must and young wine and its consequences. *S. Afr. J. Sci.*, **74**: 95-98.
- Laurie, V. F. & Waterhouse, A. L. (2006). Oxidation of glycerol in the presence of hydrogen peroxide and iron in model solutions and wine. potential effects on wine color. *J. Agric. Food Chem.*, **54**: 4668–4673.
- Levantesi, G., Marfisi, R., Mozaffarian, D., Franzosi, M. G., Maggioni, A., Nicolosi, G. L., Schweiger, C., Sillelta, M., Tavazzi, L., Tognoni, G., Marchioli, R. (2013). Wine consumption and risk of cardiovascular events after myocardial infarction: results from the GISSI-Prevenzione trial. *Int. J. Cardiol.*, **63**(3): 282-287.
- Lavigne, V., Pons, A., Darriet, P., & Dubourdieu, D. (2008). Changes in the sotolon content of dry white wines during barrel and bottle aging. *J. Agric. Food Chem.*, **56**: 2688–2693.
- Letan, A. (1966). The Relation of Structure to Antioxidant Activity of Quercetin and Some of Its Derivatives I. Primary Activity. *Journal of Food Science*, **31** (4): 518-523.
- Lehtonen (1996), Determination of amines and amino acids in wine: a review. *Am. J. Enol. Vitic.*, **47**: 127-133.
- Li, H., Guo, A., & Wang, H. (2008). Mechanisms of oxidative browning of wine *Food Chemistry*, **108**: 1-13.
- Lotito, S.B., L. Actis-Goretta, M.L. Renart, M. Caligiuri, D. Rein, H.H. Schmitz, F.M. Steinberg, C.L. Keen, & C.G. Fraga. (2000). Influence of oligomer chain length on the antioxidant activity of procyanidins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **276**: 945-951.
- Maggu, M., Winz, R., Kilmartin, P. A., Trought, M. C. T. & Nicolau, L. (2007). Effect of skin contact and pressure on the composition of Sauvignon Blanc must. *J. Agric. Food Chem.*, **55**: 10281–10288.
- Makhotkina, O., Kilmartin, P. A. (2009). Uncovering the influence of antioxidants on polyphenol oxidation in wines using an electrochemical method: Cyclic voltammetry. *J. Electroanal. Chem.*, **633**: 165–174.
- Makris, D. P., & Rossiter, J. T. (2000). Heat-Induced, Metal-Catalyzed Oxidative Degradation of Quercetin and Rutin (Quercetin 3-O-Rhamnosylglucoside) in Aqueous Model Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48** (9): 3830–3838.
- Makris, D. P., Psarra, E., Kallithraka, S., & Kefalas, P. (2003). The effect of polyphenolic composition as related to antioxidant capacity in white wines. *Food Research International*, **36**: 805–814.
- Marais, J., & Pool, H. J. (1980). Effect of storage time and temperature on the volatile composition and quality of dry white table wines. *Vitis*, **19**: 151–164.
- Marks, A. C. & Morris, J. R. (1993). Ascorbic acid effects on the post-disgorgement oxidative stability of sparkling wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, **44**: 227–31.
- Martens, S., Mithöfer, A. (2005). Flavones and flavones synthases. *Phytochemistry*, **66**: 2399-2407.

- Mayer, A. M., & Harel, E. (1979). Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry*, **18**(2): 193–215.
- Mehanso, H., Butler, L. G., & Carlson, D. M. (1987). Dietary tannins and salivary proline-rich proteins: interactions, induction and defense mechanisms. *Annual Review of Nutrition*, **7**: 423–440.
- Mesquita, P. R., Piçarra-Pereira, M. A., Monteiro, S., Loureiro, V. B., Teixeira, A. R., & Ferreira, R. B. (2001). Effect of Wine Composition on Protein Stability. *Am. J. Enol. Vitic.*, **52** (4):324-330.
- Mestres, M., Busto, O., & Guasch, J. (2000). Analysis of organic sulfur compounds in wine aroma. *J. Chromatogr., A*, **881**, 569–581.
- Minussi, R. C., Rossi, M., Bologna, L., Cordi, L., Rotilio, D., Pastore, G. M. & Duran, N. (2003), Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines. *Food Chem.*, **82**: 409.
- Moreno-Arribas, M. V., & Polo, M. C. (2009). *Wine Chemistry and Biochemistry*, 378, Ed. 1st, New York: Springer.
- Nagel, C. W., & Graber, W. D. (1988). Effect of must oxidation on quality of white wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, **39**: 1–4.
- Nikfardjam, M. P., László, G. Y., & Dietrich, H. (2006). Resveratrol-derivatives and antioxidative capacity in wines made from botrytized grapes. *Food Chemistry*, **96**(1); 74-79.
- Nikolantonaki, M., Chichuc, I., Teissedre, P. L., & Darriet, P. (2010). Reactivity of volatile thiols with polyphenols in a wine-model medium: Impact of oxygen, iron, and sulfur dioxide. *Anal. Chim. Acta*, **660**: 102–109.
- Nikolantonaki, M., Jourdes, M., Shinoda, K., Teissedre, P.-L., Quideau, S., & Darriet, P. (2012). Identification of adducts between an odoriferous volatile thiol and oxidized grape phenolic compounds: Kinetic study of adduct formation under chemical and enzymatic oxidation conditions. *J. Agric. Food Chem.*, **60**: 2647–2656.
- Nunez-Delicado, E., Serrano-Megias, M., Perez-Lopez, A. J., & Lopez-Nicolas, J. M. (2007). Characterization of polyphenol oxidase from Napoleon grape. *Food Chemistry*, **100**: 108-114.
- OIV-MA-AS2-10. (2009). Folin-Ciocalteu Index. Type IV method. Available: <https://www.oiv.int/en/technical-standards-and-documents/methods-of-analysis/compendium-of-international-methods-of-analysis-of-wines-and-musts-2-vol>. Last accessed 06 October 2021.
- Oliveira, C. M., Ferreira, A. C. S., De Freitas, V., & Silva, A. M. S. (2011). Oxidation mechanisms occurring in wines. *Food Research International*, **44**: 1115-1126.
- Ozmianski, J., & Sapis, J. C. (1989). Fractionation and identification of some low molecular weight grape seed phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **37**:1293–1297.
- Ozmianski, J., Cheynier, V., & Moutounet, M. (1996). Iron-Catalyzed Oxidation of (+)-Catechin in Model Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **44** (7): 1712–1715.

- Ough, C. S. (1971), Measurement of histamine in California wines. *J. Agric. Food Chem.*, **19** (2): 241-244
- Papadopoulou, D., & Roussis, I. G. (2001). Inhibition of the decline of linalool and a-terpineol in muscat wines by glutathione and N-acetyl-cysteine. *Italian Journal of Food Science*, **13**: 413-419.
- Papadopoulou, D., & Roussis, I. G. (2008). Inhibition of the decrease of volatile esters and terpenes during storage of a white wine and a model wine medium by glutathione and N-acetylcysteine. *International Journal of Food Science & Technology*, **43**: 1053-1057.
- Patel, P., Herbst-Johnstone, M., Soon, A.L., Gardner, R. C., Weaver, R., Nicolau, L. & Kilmartin, P. A. (2010). Influence of Juice Pressing Conditions on Polyphenols, Antioxidants and Varietal Aroma of Sauvignon blanc Microferments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58** (12): 7280-7288.
- Patrianakou, M., & Roussis, I. G. (2013). Decrease of Wine Volatile Aroma Esters by Oxidation. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, **34** (2): 241-245
- Peng, Z., Duncan, B., Pocock, K. F. & Sefton, M. A. (1998). The effect of ascorbic acid on oxidative browning of white wines and model wines. *Aust. J. Grape Wine Res.*, **4**: 127– 135.
- Pezet, R., Pont, V., Cuenat, P. (1994). Method to determine resveratrol and pterostilbene in grape berries and wines using high performance liquid chromatography and highly sensitive fluorimetric detection. *J. Chromatogr. A*, **663**: 191- 197.
- Poux, C., & Ournac, A. (1970). Free and polypeptidic amino-acids in wine. In *Annales de Technologie Agricole.*, 19 (3), 217, 147 rue de l Université, 75338 Paris Cedex 07, France: Institut national de la recherche agronomique.
- Preys, S., Mazerolles, G., Courcoux, P., Samson, A., Fischer, U., Hanafi, M., Bertrand, D., & Cheynier, V. (2006). Relationship between polyphenolic composition and some sensory properties in red wines using multiway analyses. *Analytica Chimica Acta*, **563**: 126-136.
- Radler, F., & Fäth, K. P. (1991) Histamine and other biogenic amines in wines. *American Society for Enology and Viticulture, Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine: Seattle, Washington, Usa.*
- Ramey, D. D., & Ough, C. S. (1980). Volatile ester hydrolysis or formation during storage of model solutions and wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **28**: 928-934.
- Rapp, A., & Versini, G. (1991). Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds of wines. In: *Proceeding of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine. The American Society for Enology and Viticulture*, 156–164, Seattle, Washington, USA.
- Ratty, A. K. & Dass, N. P. (1988). Effects of flavanoids on non-enzymatic lipid peroxidation: Structure-activity relationship. *Biochemical Medicine and Metabolic Biology*, **39**: 69-79.
- Rauhut, D., Kurbel, H., Dittrich, H. H., & Grossmann, M. (1996). Properties and differences of commercial yeast strains with respect to their formation of sulfur compounds. *Wein Wissenschaft, Wiesbaden*, **51**: 187–192.

- Recamales, A., Sayago, A., González-Miret, M. L., & Hernanz, D. (2006). The effect of storage conditions on the phenolic composition and colour of white wine. *Food Research International*, **39**: 220–229.
- Ribéreau-Gayon, J. (1933). Contribution à l'étude des oxidations et réductions dans les vins. Application à l'étude de vieillissement et des casses, pp 21, Thèse, Delmas Bordeaux.
- Ribereau-Gayon, J. (1935) *Rev. Viticult.*, **82**: 367.
- Ribereau-Gayon, P., & Sapis, J. C. (1965). On the presence in wine of tyrosol, tryptophol, phenylethyl alcohol and gamma-butyrolactone, secondary products of alcoholic fermentation. *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences. Serie D: Sciences naturelles*, **261**(8) :1915-1916.
- Ribereau-Gayon J., Peynaud E., Sudraud P. And Ribereau-Gayon P. (1982), *Sciences et Techniques du Vin*, 1, *Analyse et Contrôle du Vin*, 2nd Ed., Dunod, Paris.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A. & Dubourdier, D. (2000). Phenolic compounds. In *Handbook of Enology*, 2, 129–185, John Willey & Sons Ltd., New York.
- Ribereau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2006). The chemistry of wine stabilization and treatments. *Handbook of Enology*, 2, 141- 204, ed. 2nd, West Sussex-UK: John Wiley and Sons Ltd.
- Ricardo da Silva, J. M., Cheynier, V., Souquet, J. M., Moutonet, M., Cabanis, J. C., & Bourzeix, M. (1991). Interaction of grape seed proteins in relation to wine fining. *Journal of Science and Food Agriculture*, **57**: 111–125.
- Roland, A., Schneider, R., Razungles, A., & Cavelier, F. (2011). Varietal thiols in wine: discovery, analysis and applications. *Chemical reviews*, **111**: 7355-7376.
- Robichaud, J. L., & Noble, A. C. (1990). Astringency and bitterness of selected phenolics in wine. *Journal of Science and Food Agriculture*, **53**: 343–353.
- Rossi, J. A., & Singleton, V. L. (1966). Contribution of grape phenols to oxygen absorption and browning of wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, **17**: 231–239.
- Roussis, I. G., Lambropoulos, I., & Papadopoulou, D. (2005). Inhibition of the decline of volatile esters and terpenols during oxidative storage of Muscat-white and Xinomavro-red wine by caffeic acid and N-acetyl-cysteine. *Food Chemistry*, **93**: 485-492.
- Roussis, I. G., Lambropoulos, I. & Tzimas, P. (2007). Protection of volatiles in a wine with low sulfur dioxide by caffeic acid or glutathione. *Am. J. Enol. Vitic.*, **58**: 274–278.
- Roussis, I. G. & Sergianitis, S. (2008). Protection of some aroma volatiles in a model wine medium by sulphur dioxide and mixtures of glutathione with caffeic acid or gallic acid. *Flavour Fragrance J.*, **23**: 35–39.
- Roussis, I. G., I. Lambropoulos, P. Tzimas, A. Gkoulioti, V. Marinos, D. Tsoupeis and I. Boutaris, 2008: Antioxidant activities of some Greek wines and wine phenolic extracts. *Journal of food composition and analysis*, 21, 614-621.
- Salacha, M. I., Kallithraka, S., & Tzourou, I. (2008). Browning of white wines: correlation with antioxidant characteristics, total polyphenolic composition and flavanol content. *International Journal of Food Science and Technology* **43**: 1073–1077.
- Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J.A. and Saura-Calixto, F. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci. Food Agric.* **76**: 270-276.

- Santoro, M. (1995). Fractionation and characterization of must and wine proteins. *Am. J. Enol. Vitic.* **46**: 250-254.
- Saywell, L. G. (1934). Clarification of Wine. *Ind. Eng. Chem.* **26**: 981.
- Saucier, C. T. & Waterhouse, A. L. (1999). Synergetic activity of catechin and other antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* **47**: 4491–4494.
- Schneider, V. (1998). Must Hyperoxidation: A Review. *Am. J. Enol. Vitic.* **42**: 65-73.
- Schrauzer, G. N. (2000). Selenomethionine: a review of its nutritional significance, metabolism and toxicity. *Journal of Nutrition.* **130**(7):1653–1656.
- Seigneur, M., Bonnet, J., Dorian, B., Benchimol, D., Drouillet, F., Gouverneur, G., Larrue, J., Crockett, R., Boisseau, M., Ribbureau-Gayon, P., Bricaud, H. (1990). Effect of the consumption of alcohol, white wine and red wine on platelet function and serum lipid., *J. Appl. Cardiol.*, **5**: 215-222.
- Segurel, M. A., Razungles, A. J., Riou, C., Salles, M., & Baumes, R. L. (2004). Contribution of dimethyl sulfide to the aroma of Syrah and Grenache Noir wines and estimation of its potential in grapes of these varieties. *J. Agric. Food Chem.*, **52**: 7084–7093.
- Severin, E. S., Aleinikova, T. L., Osipov, E. V. (2003). *Biokhimiya (Biochemistry)*, Moscow, GEOTARMedia.
- Shahidi, F., Janitha, P. K., & Wanasundara, P. D. (1992). Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **32**: 67-103.
- Siemann, E. H. & Creasy, L. L. (1992). Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, **43**: 49-52.
- Silva Ferreira, A. C., Guedes de Pinho, P., Rodrigues, P., & Hogg, T. (2002). Kinetics of oxidative degradation of white wines and how they are affected by selected technological parameters. *J. Agric. Food Chem.*, **50**: 5919-5924.
- Silva Ferreira, A. C., Hogg, T., & P. Guedes de Pinho. (2003). Identification of Key Odorants Related to the Typical Aroma of Oxidation-Spoiled White Wines. *J. Agric. Food Chem.*, **51**: 1377–1381.
- Simpson, R. F. (1982). Factors affecting oxidative browning of white wine. *Vitis*, **21**: 233–239.
- Singleton, V. L., & Kramlinga, T. E. (1976). Browning of white wines and an accelerated test for browning capacity. *American Journal of Enology and Viticulture*, **27**: 157–160.
- Singleton, V. L., Salgues, M., Zaya, J., & Trousdale, E. (1985). Caftaric acid disappearance and conversion to products of enzymic oxidation in grape must and wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, **36**: 50–56.
- Singleton, V. L. (1987). Oxygen with Phenols and Related Reactions in Musts, Wines, and Model Systems: Observations and Practical Implications. *Am. J. Enol. Vitic.*, **38** :69-77.
- Singleton, V. L. (1989). Browning and oxidation of must and wines. In *Proceedings 4th Annual Midwest Regional Grape and Wine Conference*. D.V. Peterson et al., pp. 87-93. State Fruit Experiment Station, Southwest Missouri State University, Mountain Grove.

- Singleton, V. L. (2001). A survey of wine aging reactions, especially with oxygen. In Rantz J M (ed.) Proceedings of the ASEV 50th Anniversary Annual Meeting. Seattle, WA, American Society for Enology and Viticulture, 323–336.
- Sioumis, N., Kallithraka, S., Tsoutsouras, E., Makris, D., Kefalas, P. (2005). Browning development in white wines: dependence on compositional parameters and impact on antioxidant characteristics. *Eur Food Res Technol.*, **220**: 326–330.
- Sioumis, N., Kallithraka, S., Makris, D., & Kefalas, P. (2006). Kinetics of browning onset in white wines: Influence of principal redox-active polyphenols and impact on the reducing capacity. *Food Chemistry*, **94**: 98–104.
- Simonetti, R., Pietta, P. & Testolin, G. (1997). Polyphenol content and total antioxidant potential of selected Italian wines. *J. Agdc. Food Chem.*, **45**: 1152.
- Skouroumounis, G. K., Kwiatkowski, M. J., Francis, I. L., Oakey, H., Capone, D. L., Peng, Z., Duncan, B., Sefton, M. A. & Waters, E. J. (2005). The influence of ascorbic acid on the composition, colour and flavour properties of a Riesling and a wooded Chardonnay wine during five years' storage. *Aust. J. Grape Wine Res.*, **11**: 355–368.
- Snopek, L., Mlcek, J., Sochorova, L., Baron, M., Hlavacova, I., Jurikova, T., Kizek, R., Sedlackova, E., & Sochor, J. (2018). Contribution of Red Wine Consumption to Human Health Protection. *Molecules*, **23** (7): 1684.
- Soleas, G. J., Goldberg, D. M., Diamandis, E. P., Karumanchiri, A., Eng, E., & Yan, J. (1993). A gas chromatographic-mass spectrometric method for the analysis of resveratrol in juice and wine samples. *Am. J. Enol. Vitic.*, **44**, 344.
- Somers, T. C., & Pocock, K. F. (1990). Evolution of red wines. II. Promotion of the maturation phase. *Vitis*, **29**: 109–121.
- Soufleros, E. H, Bouloumpasi, E., Tsarchopoulos, C., & Biliaderis, C.G. (2003). Primary amino acid profiles of Greek white wines and their use in classification according to variety, origin and vintage. *Food Chemistry*, **80**(2): 261–273.
- Soufleros, E. H., Bouloumpasi, E., Zotou, A., & Loukou, Z. (2007). Determination of biogenic amines in Greek wines by HPLC and ultraviolet detection after dansylation and examination of factors affecting their presence and concentration. *Food Chemistry*, **101** (2): 704-716.
- Souza, S. C., Theodoro, K. H., Souza, É. R., Motta, S. da, & Glória, M. B. A. (2005). Bioactive amines in Brazilian wines: types, levels and correlation with physico-chemical parameters. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **48**(1): 53–62.
- Toland, T., Fugelsang, K. & Muller, C. (1996). Methods for Estimating Protein Instability in White Wines: A Comparison. *Am. J. Enol. Vitic.*, **47** (1): 111-112.
- Tominaga, T., Darriet, P. & Dubourdieu, D. (1996) Identification of 3-mercaptohexyl acetate in Sauvignon wine, a powerful aromatic compound exhibiting box-tree odor. (Identification de l'acétate de 3-mercaptohexanol, composé à forte odeur de buis, intervenant dans l'arôme des vins de Sauvignon). *Vitis*, **35**: 207–210.

- Tominaga, T., Murat, M.-L., & Dubourdiou, D. (1998). Development of a method for analyzing the volatile thiols involved in the characteristic aroma of wines made from *Vitis vinifera* L. Cv. Sauvignon Blanc. *J. Agric. Food Chem.*, **46**: 1044–1048.
- Vaimakis, V. & Roussis. I. G. (1996). Must oxygenation together with glutathione addition in the oxidation of white wine. *Food Chem.*, **57**, 419–422.
- Vauzour, D., Rodriguez-Mateos, A., Corona, G., Oruna-Concha, M.J. & Spencer, J.P.E. (2010). Polyphenols and human health: prevention of disease and mechanisms of action, *Nutrients*, **2** (11): 1106-1131.
- Villaño Débora, M. Soledad Fernández-Pachón, Ana M. Troncoso, M. Carmen García-Parrilla, (2005). Comparison of antioxidant activity of wine phenolic compounds and metabolites in vitro, *Analytica Chimica Acta*, **538** (1-2): 391-398.
- Vivas, N., & Glories, Y. (1996). Role of oak wood ellagitannins in the oxidation process of red wines during aging. *American Journal of Enology and Viticulture*, **47**(1): 103–107.
- Walker, R. (1985). Sulphiting agents in foods: Some risk/benefit considerations. *Food Additives & Contaminants*, **2** (1), 5–24.
- Waterhouse, A. L. (2002). Wine phenolics. *Annals of The New York Academy of Sciences*, **957**: 21–36.
- Waterhouse, A. L. & Laurie, V. F. (2006). Oxidation of Wine Phenolics: A Critical Evaluation and Hypotheses. *Am. J. Enol. Vitic.*, **57** (3): 306-313.
- Wildenradt, H. L., & Singleton, V. L. (1974). Production of aldehydes as a result of oxidation of polyphenolic compounds and its relation to wine aging. *Amer. J. Enol. Vitic.*, **25**: 119–126.
- Wissemann, K. W. & Lee, C. Y. (1980). Polyphenoloxidase activity during grape maturation and wine production, *Am. J. Enol. Vitic.*, **31**: 206.
- Witkowska, A., Zujko, M., Borawska, M. & Socha, K. (2006). Antioxidant properties and selenium content of wines. *Polish Journal of Environmental Studies.*, **15** (2a): 208-211.
- Yokotsuka, K., Nozaki, K., Takayanagi, T. (1994). Characterization of soluble glycoproteins in red wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, **45**: 410-416.

Ελληνική Βιβλιογραφία

- Βαϊμάκης, Β. (1998). Διδακτορική Διατριβή: Μέθοδοι Αντιμετώπισης της Οξείδωσης των Λευκών Οίνων, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα.
- Βολτέα, Σ. (2014). Μεταπτυχιακή Διατριβή: Χρήση Fe(II) και H₂O₂ για αποτίμηση της τάσης των λευκών οίνων προς οξείδωση. Ονοματεπώνυμο Επιβλέποντος: Ρούσσης, Ι.-Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα.
- Βοργιάς, Κ. Ε. (2013). Άσκηση 5: Σάκχαρα, Βιοχημεία 2013-2014, Πανεπιστημιακές Σημειώσεις, Ε.Κ.Π.Α., Αθήνα.
- Γιαβάσης, Ι. (2019). Σημειώσεις Θεωρίας: Τεχνολογίας & Ποιοτικού Ελέγχου Ζυμούμενων Τροφίμων, Πανεπιστημιακές Σημειώσεις, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Καρδίτσα.

- Ευρωπαϊκή Επιτροπή (2010). ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΑΠΟ ΤΑ ΘΕΣΜΙΚΑ ΟΡΓΑΝΑ, ΤΑ ΕΠΙΚΟΥΡΙΚΑ ΟΡΓΑΝΑ ΚΑΙ ΤΟΥΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ ΤΗΣ ΕΥΡΩΠΑΪΚΗΣ ΕΝΩΣΗΣ. Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης, C 43/30. Access: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:C:2010:043:0001:0060:EL:PDF>
- Κοντοκόστας, Σ. (2010). Πτυχιακή Διατριβή: Οι επιδράσεις της ζύμωσης και της ωρίμανσης του κρασιού στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Βόλος.
- Κοτσερίδης, Γ. & Προξενιά, Ν. (2015). Εργαστηριακές Ασκήσεις: Οινολογία Ι, Πανεπιστημιακές Σημειώσεις Εργαστηρίου Οινολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.
- Κοτσερίδης, Γ., Καλλίθρακα, Σ. & Προξενιά, Ν. (2017). Εργαστηριακές Ασκήσεις: Οινολογία ΙΙ, Πανεπιστημιακές Σημειώσεις Εργαστηρίου Οινολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.
- Κουράκου - Δραγώνα, Σ. (1998). Θέματα Οινολογίας, Τροχαλία, Αθήνα.
- Λέτσιου, Σ. (2010). Διδακτορική Διατριβή: Χαρακτηρισμός και ποσοτικός προσδιορισμός μορφών σεληνίου σε ορό αίματος και συσχέτισή του με διατροφικούς παράγοντες. Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο - Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας - Διατροφής, Αθήνα.
- Πολίτης, Γ., (1997). Φτιάχνοντας το κρασί μας., Εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα.
- Ρούσσης, Ι. (2015). 11. Σύσταση του οίνου, Διαφάνειες Παραδόσεων Οινολογίας 2015-2016,
- Σουλής, Θ. (1992). Μαθήματα οινοποιίας, Μέρος Α' , Α.Π.Θ., Υπηρεσία Δημοσιευμάτων, Πανεπιστημιακό Τυπογραφείο, Θεσσαλονίκη.
- Σουφλερός, Ε. (1997). Οινολογία: επιστήμη και τεχνογνωσία, Τόμος Ι, Τυπογραφία Παπαγεωργίου, Θεσσαλονίκη.
- Σουφλερός, Ε. Η. (2000). Οινολογία: Επιστήμη και Τεχνογνωσία, Τόμος Ι, Σουφλερός, Ε. Η., Θεσσαλονίκη.
- Τσέτουρας, Π. (2008). Οινοτεχνία, Η Επιστήμη του κρασιού στην πράξη, ISO 22000, Εκδόσεις Σταμούλη Α. Ε., Αθήνα.

Ιστοσελίδες

- Βαλαβανίδης, Θ. & Ευσταθίου, Κ. (2014). Η χημική ένωση του μήνα: L-Ασκορβικό οξύ (Βιταμίνη C).
Access: http://195.134.76.37/chemicals/chem_ascorbicacid.htm
- Ε. Ε. (2008). Πρόταση κανονισμός του Συμβουλίου σχετικά με την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1234/2007 για τη θέσπιση κοινής οργάνωσης των γεωργικών αγορών και ειδικών διατάξεων για ορισμένα γεωργικά προϊόντα («Ενιαίος κανονισμός ΚΟΑ») /* COM/2008/0489 τελικό - CNS 2008/0156 */, Βρυξέλλες. Access: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EL/TXT/?uri=CELEX:52008PC0489>
- Καρκαλούσος, Π., Γεωργίου, Ζ., Κρούπης, Χ., Παπαϊωάννου, Α., Πλαγεράς, Π., Σπυρόπουλος, Β., Τσότσου, Γ., Φούντζουλα, Χ. (2015). Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (απόδοσης) στην κλινική χημεία. Βασικές αρχές και παραδείγματα.. [Κεφάλαιο

Συγγράμματος]. Στο Καρκαλούσος, Π., Γεωργίου, Ζ., Κρούπης, Χ., Παπαϊωάννου, Α., Πλαγιάς, Π., Σπυρόπουλος, Β., Τσότσου, Γ., Φούντζουλα, Χ. (2015). Εργαστηριακές ασκήσεις κλινικής χημείας. [ηλεκτρ. βιβλ.] Αθήνα:Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών. Κεφ 8. Access : <http://hdl.handle.net/11419/5388>