



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS**

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

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**ΣΥΧΓΡΟΝΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**  
**(i) ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΑ (ii) ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ**

**Μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία**

Μελέτη ρυθμού οξείδωσης οίνων μετά από προσθήκη αντιοξειδωτικών ενώσεων

**Ευανθία Χ. Παπανικολάτου**

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:  
Καλλίθρακα Σταματίνα, Καθηγήτρια ΓΠΑ

**ΑΘΗΝΑ, 2023**

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

**Μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία**

Μελέτη ρυθμού οξείδωσης οίνων μετά από προσθήκη αντιοξειδωτικών ενώσεων

“Study of oxidation rate of wine after the addition of antioxidant compounds”

**Ευανθία Χ. Παπανικολάτου**

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Καλλίθρακα Σταματίνα, Καθηγήτρια ΓΠΑ (επιβλέπουσα)

Γαρδέλη Χρυσανγή, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ

Σαμαράς Ιωάννης, Καθηγητής Ιόνιο Πανεπιστήμιο

## Μελέτη ρυθμού οξείδωσης οίνων μετά από προσθήκη αντιοξειδωτικών ενώσεων

*ΠΜΣ Σύγχρονη Τεχνολογία Τροφίμων (i) Γαλακτοκομία (ii) Οινολογία  
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου  
Εργαστήριο Οινολογίας & Αλκοολούχων Ποτών*

### Περίληψη

Η δημιουργία του καφετιάσματος στους λευκούς οίνους αποτελεί ένδειξη της υποβάθμισης της ποιότητάς τους (επίδραση σε άρωμα, χρώμα, γεύση) και συνδέεται με τη μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Στη συγκεκριμένη έρευνα μελετήθηκε η συμπεριφορά δειγμάτων οίνου Ρομπόλας μετά την προσθήκη των αντιοξειδωτικών ουσιών metabisulfite potassium, ascorbic acid, glutathione, chips δρυός, ταννίνες γιγάρτων και σελήνιο σε δύο συγκεντρώσεις της κάθε αντιοξειδωτικής ουσίας. Επίσης ερευνήθηκε ο ρυθμός οξείδωσής τους στο διάστημα 12 ημερών της επιταχυνόμενης οξείδωσης στη θερμοκρασία των 55 °C. Πιο συγκεκριμένα στην αρχή πραγματοποιήθηκε η αξιολόγηση της απορρόφησης όλων των δειγμάτων στα 420 nm, του ρυθμού μεταβολής χρώματος k, της μεταβολής της απορρόφησης  $\Delta A\%_{420nm}$ . Στη συνέχεια έγινε η αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο DPPH, η εκτίμηση των ολικών φαινολικών ενώσεων με τη μέθοδο Folin, ο προσδιορισμός του ελεύθερου και ολικού θειώδη ανυδρίτη και τέλος, ο ποσοτικός προσδιορισμός των φλαβονοειδών (φλαβανολών) και μη φλαβονοειδών ενώσεων (υδροξυκιναμωμικά οξέα, βενζοϊκά οξέα) μέσω της χρήσης της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης HPLC στην αρχή και το τέλος του διαστήματος των δώδεκα ημερών, δηλαδή της επιταχυνόμενης οξείδωσης. Από τις φλαβανόλες βρέθηκε να έχουν τη μεγαλύτερη συγκέντρωση ο εστέρας της επικατεχίνης με γαλλικό οξύ κι η προκυανιδίνη- $B_1$  ενώ από τα υδροξυκιναμωμικά οξέα το καφταρικό οξύ.

Αποδείχθηκε τελικά ότι στις δεδομένες συνθήκες του πειράματος (55 °C) οι αντιδράσεις του καφετιάσματος επιταχύνθηκαν με τη προσθήκη του ασκορβικού οξέος (αύξηση απορρόφησης στα 420nm, k και  $\Delta A\%$ ). Αυτή η παρατήρηση συνδέθηκε άμεσα με τη μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας και των επιπέδων του θειώδη ανυδρίτη (ελεύθερου και ολικού). Είναι πιθανό η δημιουργία του υπεροξειδίου του υδρογόνου που παράγεται κατά την οξείδωση του ασκορβικού οξέος να είναι υπεύθυνη για το φαινόμενο της οξείδωσης που παρατηρήθηκε. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και μετά την προσθήκη των ταννινών των γιγάρτων πιθανώς λόγω οξείδωσης των φαινολικών ενώσεων και την δημιουργία κινονών. Αντιθέτως η προσθήκη σεληνίου φαίνεται να προστατεύει τον οίνο από το καφέτιασμα διατηρώντας υψηλά τα επίπεδα του θειώδη ανυδρίτη.

**Επιστημονική περιοχή:** Οινολογία

**Λέξεις κλειδιά:** Ρομπόλα, Λευκός οίνος, Αντιοξειδωτική ικανότητα, Οξείδωση, Φαινολικές ενώσεις, Θειώδης ανυδρίτης, Σελήνιο, Ασκορβικό οξύ, DPPH, Folin

## **Study of oxidation rate of wine after the addition of antioxidant compounds**

*MSc Wine & Spirits Technology  
Department of Food Science & Human Nutrition  
Laboratory of Oenology & Alcoholic Drinks*

### **Abstract**

The formation of browning in white wines indicates a degradation in quality regarding aromas, color, and flavor. This degradation is related to antioxidant activity at a temperature of 55°C during a 12-day experiment of accelerated browning. In this research, the behavior of Robola wine samples was evaluated for the rate of oxidation after the addition of antioxidant compounds such as potassium metabisulfite, glutathione, ascorbic acid, oak chips, grape seed tannins, and selenium in two different concentrations each. This evaluation occurred after comparing the results of the antioxidant activity of the DPPH method, the total phenolics of the Folin method, the evaluation of sulfur dioxide levels (free and total), and the amount of flavonoid (flavanols and flavonols) and non-flavonoid (benzoic acids, hydroxycinnamates) quantifying compounds using High-Pressure Chromatography (HPLC) at the beginning and end of the accelerated browning. In the end of twelve-days accelerated browning experiment, the highest concentrations of flavanols and flavonols were found in epicatechin gallate, catechin and procyanidin-B<sub>1</sub>.

Finally, under the experiment's conditions (55°C), the reactions of oxidation were accelerated from the samples with ascorbic acid, taking into consideration the increase of absorption at 420 nm, high *k* and  $\Delta A\%$  values. This acceleration was connected also with the decrease in antioxidant activity and the levels of sulfur dioxide (free and total). It is possible that hydrogen peroxide which is produced during the oxidation of ascorbic acid is responsible for the oxidation effect which had occurred. Relative results were observed after the addition of grape seed tannins, possibly because of the oxidation of phenolic compounds and the production of quinones. On the contrary, the addition of selenium appears to protect wines from browning, maintaining high levels of sulfur dioxide.

**Scientific area:** Oenology

**Keywords:** Robola, White wine, Antioxidant activity, Phenolic compounds, Sulfur dioxide, Dpph, Folin, Selenium, Ascorbic acid

## Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής ερευνητικής μου διπλωματικής θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν σε αυτή. Οι μεταπτυχιακές σπουδές μου στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών και συγκεκριμένα στον τομέα Οινολογίας του προγράμματος της σύγχρονης τεχνολογίας τροφίμων έλαβαν τέλος με αυτήν.

Κατά κύριο λόγο οφείλω να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γ. Π. Α. κα Καλλίθρακα Σταματίνα, υπεύθυνη για τη διπλωματική μου, όχι μόνο για τη μεταλαμπάδευση των γνώσεων, την υποστήριξη και καθοδήγησή της κατά την εκπόνησή της διπλωματικής μου εργασίας αλλά και τη βοήθειά της σε ανθρώπινο επίπεδο σε δυσκολίες που συναντήθηκαν στην πορεία.

Θα ήθελα επιπρόσθετα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κο Σαμαρά Ιωάννη του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Ιονίου Πανεπιστημίου για τη φιλοξενία στο εργαστήριο του τμήματος αυτού και την συνεργασία μας κατά τη διάρκεια υλοποίησης της εργαστηριακής αυτής μελέτης. Χωρίς τη στήριξή του θα ήταν αδύνατη η διεκπεραίωση αυτού του έργου. Ακόμα, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την αποδοχή του να αξιολογήσει την παρούσα μελέτη.

Δε θα μπορούσα να παραλείψω τις ευχαριστίες μου προς τη Χριστοφή Στεφανία, Υποψήφια Διδάκτωρ του Εργαστηρίου Οινολογίας και Αλκοολούχων Ποτών του Γ. Π. Α. και την κυρία Νίκη Προξενιά, μέλος ΕΔΠ του Εργαστηρίου Οινολογίας και Αλκοολούχων Ποτών του Γ. Π. Α.. Χωρίς τη συμβολή και των δύο η ολοκλήρωση της μελέτης αυτής θα ήταν αδύνατη.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ακόμα τη Χρυσανγή Γαρδέλη, Επίκουρη Καθηγήτρια του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών που δέχτηκε να λάβει μέρος στην αξιολόγηση της μελέτης αυτής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω βαθύτατα τους γονείς μου, που με υποστήριξαν κατά τη διάρκεια της πορείας αυτής, όπου ο ρόλος τους έπαιξε καταλυτικό ρόλο για την πραγμάτωση αυτού του έργου.

---

Με την άδειά μου η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία ελέγχθηκε από λογισμικό ανίχνευσης κειμενικής ομοιότητας που διαθέτει το Ίδρυμα και διαπιστώθηκε η πρωτοτυπία της.

## Περιεχόμενα

Περίληψη .....	i
Abstract.....	ii
Ευχαριστίες.....	iii
Περιεχόμενα.....	iv
Σκοπός και αντικείμενο μελέτης .....	vii
<b>1) Εισαγωγή</b> .....	1
1.1) Οίνος και χημική του σύσταση .....	1
1.2) Νερό .....	2
1.3) Σάκχαρα .....	2
1.4) Αλκοόλες.....	3
1.5) Οργανικά οξέα.....	7
1.6) Αζωτούχες ενώσεις .....	11
1.7) Πτητικές ενώσεις/Άρωμα.....	16
1.7.1) Πρωτογενές ή ποικιλιακό άρωμα.....	16
1.7.2) Δευτερογενές άρωμα.....	17
1.7.3) Τριτογενές άρωμα.....	19
1.8) Φαινολικά συστατικά .....	20
1.8.1) Φλαβονοειδή φαινολικά συστατικά.....	21
1.8.2) Μη Φλαβονοειδή συστατικά.....	27
<b>2) Οξείδωση οίνων</b> .....	29
2.1) Αντιδράσεις αμαύρωσης (browning reactions).....	30
2.2) Αντίδραση Fenton .....	30
2.3) Χημική οξείδωση .....	31
2.4) Χημική Οξείδωση και προϊόντα.....	32
2.5) Ενζυμική Οξείδωση .....	33
2.6) Αλληλεπίδραση φαινολικών συστατικών οίνου με οξυγόνο .....	36
2.7) Ο ρόλος των Μετάλλων στην οξείδωση του οίνου .....	37
2.8) Οξείδωση στους λευκούς οίνους.....	38
2.9) Οξείδωση και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά οίνου.....	39

2.9.1) Επίδραση στο χρώμα .....	39
2.9.2) Επίδραση στο άρωμα .....	40
2.10) Αντιοξειδωτική δράση φαινολικών συστατικών.....	43
2.11) Αντιοξειδωτικές ουσίες οίνων.....	43
2.11.1) Ασκορβικό οξύ (Ascorbic Acid) .....	43
2.11.2) Γλουταθειόνη (Glutathione).....	46
2.11.3) Θειώδης ανυδρίτης.....	48
2.11.4) Chips Δρυός.....	51
2.11.5) Ταννίνες γιγάρτων (seed tannin).....	53
2.11.6) Σελήνιο (Se).....	54
2.12) Αντιμετώπιση της οξείδωσης των οίνων.....	56
<b>3) Υλικά και μέθοδοι.....</b>	<b>58</b>
3.1) Υλικά.....	58
3.2) Όργανα .....	58
3.2.1) Φασματοφωτόμετρο.....	58
3.2.2) Αυτόματος τιτλοδότης Oeno-20 .....	59
3.2.3) Σύστημα υγρής χρωματογραφίας (HPLC).....	59
<b>4) Πειραματική πορεία .....</b>	<b>60</b>
4.1) Δείγματα προς ανάλυση .....	60
4.2) Θερμοκρασία πειράματος της οξείδωσης .....	60
4.3) Προετοιμασία δειγμάτων .....	60
4.4) Δειγματοληψίες.....	60
<b>5) Μέθοδοι.....</b>	<b>61</b>
5.1) Απορρόφηση στα 420 nm .....	61
5.2) Μέθοδος Folin-Ciocalteu (Προσδιορισμός των ολικών φαινολικών ενώσεων) .....	62
5.3) Μέθοδος DPPH-Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας.....	63
5.4) Προσδιορισμός θειώδη ανυδρίτη .....	64
5.4.1) Μέτρηση Ελεύθερου.....	64
5.4.2) Μέτρηση Ολικού .....	64
5.5) Προσδιορισμός φαινολικών ενώσεων μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC) 64	
<b>6) Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων .....</b>	<b>66</b>

<b>7) Αποτελέσματα και συζήτηση.....</b>	<b>67</b>
7.1) Απορρόφηση 420 nm.....	67
7.2) Θειώδης ανυδρίτης (SO <sub>2</sub> ).....	75
7.3) Αντιοξειδωτική ικανότητα -μέθοδος DPPH .....	81
7.4) Προσδιορισμός ολικών φαινολικών – μέθοδος Folin-Ciocalteu .....	87
<b>8) Αποτελέσματα των φαινολικών ενώσεων με την HPLC .....</b>	<b>95</b>
<b>9) Συμπεράσματα .....</b>	<b>115</b>
<b>10) Βιβλιογραφία.....</b>	<b>118</b>



### **Σκοπός και αντικείμενο μελέτης**

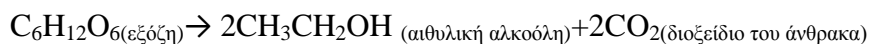
Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας είναι η μελέτη του ρυθμού οξείδωσης λευκού οίνου εξετάζοντας την έκταση του καφετιάσματος, τα επίπεδα του θειώδους ανυδρίτη (ελεύθερου και ολικού) μετά από προσθήκη αντιοξειδωτικών ουσιών και με ταυτόχρονη παρακολούθηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, των ολικών φαινολικών ουσιών και της μεταβολής της χημικής τους σύστασης (πολυφαινολικής), με παραμονή των δειγμάτων σε θερμοκρασία 55<sup>0</sup>C. Η οξείδωση αποτελεί μια διαδικασία που συμβαίνει αυθόρμητα παρουσία οξυγόνου και δεν είναι επιθυμητή εκτός ελάχιστων εξαιρέσεων, καθώς συμβάλλει στην υποβάθμιση του οίνου (απώλεια αρωμάτων και εμφάνιση δυσάρεστων, καφέτιασμα και άλλων αποτελεσμάτων).

## 1) Εισαγωγή

### 1.1) Οίνος και χημική του σύσταση

Από τα αρχαία χρόνια το κρασί κατείχε σημαντική θέση στην καθημερινότητα των ανθρώπων για πολλούς διαφορετικούς λόγους. Η εξέχουσα θέση του στην αρχαιότητα αποδεικνύεται από τα συμπόσια του Σωκράτη όπου υπήρχε άφθονο και συνόδευε φιλοσοφικές συζητήσεις όπως και από τις φαρμακευτικές του ιδιότητες σύμφωνα με τον Ιπποκράτη, τα χρόνια που δεν ήταν γνωστοί άλλοι τρόποι αντιμετώπισης των ασθενειών. Ξεκινώντας από τον ορισμό του, πρόκειται για ένα αλκοολούχο ποτό που προέρχεται από τη ζύμωση των σταφυλιών. Η ζύμωση αυτή λαμβάνει χώρα αυθόρμητα σε θερμοκρασία δωματίου υπό τη δράση των ζυμομυκήτων που βρίσκονται στο εξωτερικό του φλοιού των σταφυλιών (Estreicher K., 2006). Οι ζυμομύκητες μεταφέρονται στο σταφύλι μέσω του αέρα ή των εντόμων (Lafon-Lafourcade, 1983) και ο πληθυσμός που φαίνεται να υπερτερεί σε αριθμό συνήθως είναι αυτός του είδους *Kloeckera apiculata* αλλά και άλλων ειδών όπως *Candida*, *Cryptococcus*, *baryomyces*, *Issatchenkia*, *Kluuyveromyces*, *Metschnikowia* και *Pichia* (Ribe´reau-Gayon et al.,1956; Fleet & Heard,1993). Ο ζυμομύκητας *Saccharomyces cerevisiae* που είναι και ο υπεύθυνος για την αλκοολική ζύμωση, βρίσκεται σε χαμηλό μέγεθος πληθυσμού στον φλοιό του σταφυλιού. Όμως με την έναρξη την αλκοολικής ζύμωσης ξεκινά να πολλαπλασιάζεται και από την τρίτη ημέρα είναι εμφανής η ολοκληρωτική κυριαρχία του (Ribereau-Gayon et al.,2006;Carrascosa et al., 2011). Μια αλλαγή που συνδέεται με την αντοχή του στην παρουσία της αιθανόλης,θειωδών των σακχάρων, των μεγάλων θερμοκρασιών και την απουσία οξυγόνου (Fleet & Heard,1993; Fleet, 2007; Carrascosa et al., 2011). Ο ζυμομύκητας αυτός, ξεκινώντας την κατανάλωση των περιεχόμενων σακχάρων του μούστου παράγει αλκοόλη και νερό. Η ζύμωση των σταφυλιών ανακαλύφθηκε τυχαία το 8000 π.Χ ,όταν ξεκίνησαν οι πρώτες εγκαταστάσεις πληθυσμών (Estreicher K., 2006). Από τους πιο σύγχρονους επιστήμονες, αυτός που τελικά θεμελίωσε την αξιόπιστη προσέγγιση της αλκοολικής ζύμωσης και απέδειξε ότι ο υπαίτιος γι' αυτήν ζυμομύκητας βρίσκεται στον φλοιό του σταφυλιού, ήταν ο Louis Pasteur το 1866 (Gayon et al., 2006).

Αλκοολική ζύμωση ονομάζεται επισήμως η διαδικασία όπου τα σάκχαρα, κυρίως γλυκόζη και φρουκτόζη, μετατρέπονται σε αλκοόλη και διοξείδιο του άνθρακα, η οποία αποτυπώνεται ως εξής:



Φυσικά αυτό αποτελεί μια γενική εικόνα της αλκοολικής ζύμωσης καθώς παράλληλα παράγονται άλλα δευτερεύοντα προϊόντα, εξίσου σημαντικά για την ποιότητα τους κρασιού εκτός από την αιθυλική αλκοόλη. Με τη βοήθεια χημικών, βιοχημικών και φυσικοχημικών αντιδράσεων που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης παράγονται ανώτερες αλκοόλες, εστέρες, γλυκερόλη, σουκινικό οξύ, διακετύλιο, ακετοΐνη, 2,3-βουτανεδιόλη. Ταυτόχρονα ουσίες που βρίσκονται στον μούστο μεταβολίζονται από τους ζυμομύκητες (Moreno-Arribas & Polo, 2009).

Σύμφωνα με τον Σουφλερό ο οίνος χαρακτηρίζεται ως ένα υδατο-αλκοολικό διάλυμα που περιέχει οργανικά και ανόργανα συστατικά. Από τις Οργανικές ενώσεις περιέχονται αλκοόλες, οργανικά οξέα, σάκχαρα και πολυσακχαρίτες, αζωτούχες ενώσεις, αρωματικές ενώσεις, φαινολικές ενώσεις, βιταμίνες, ένζυμα και πτητικές ενώσεις. Οι ανόργανες ενώσεις που συναντώνται είναι ανιόντα (όπως  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{Br}^-$  και άλλα) και κατιόντα (όπως  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) (Vlahou et al., 2022). Παρόλα αυτά η περιεκτικότητά του κρασιού σε ανόργανα συστατικά είναι πιο μικρή από αυτή του αντίστοιχου γλεύκους, διότι σχηματίζονται τρυγικά άλατα που καθιζάνουν (H.- D. Belitz et al., 2011, pg.931).

### **1.2) Νερό**

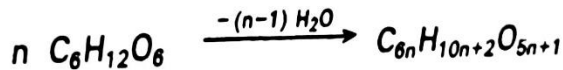
Το νερό στον οίνο καταλαμβάνει το 80 με 85 % των συστατικών του οίνου και ο προσδιορισμός του γίνεται μέσω προσδιορισμού του στερεού υπολείμματος στους εκατό βαθμούς Κελσίου σύμφωνα με τον Σουφλερό (1997). (Vlahou et al., 2022)

### **1.3) Σάκχαρα**

Τα σάκχαρα ή υδατάνθρακες είναι οργανικές ενώσεις που συναντώνται συχνά και παντού στη φύση. Η φυτική τους προέλευση οφείλεται στην αντίδραση της φωτοσύνθεσης κατά την οποία το διοξείδιο του άνθρακα και το νερό παρουσία ηλιακού φωτός παράγουν τα σάκχαρα. Αποτελούν μια από τις βασικότερες πηγές ενέργειας και κατηγοριοποιούνται σε μονοζαχαρίτες, ολιγοζαχαρίτες και πολυσακχαρίτες.

Η κατηγορία των μονοσακχαριτών περιέχει τις πολυϋδροξυ-αλδεΐδες και κετόνες με μια αλειφατική αλυσίδα ανθράκων. Τα πιο γνωστά παραδείγματα από αυτή την κατηγορία είναι η γλυκόζη, η φρουκτόζη και η γαλακτόζη.

Οι ολιγοσακχαρίτες που είναι πολυμερισμένα σάκχαρα ,απαρτίζονται από 10 άτομα ανθράκα το λιγότερο. Πρόκειται για πολυμερισμό μονοσακχαριτών και αποβάλλεται νερό σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση:



**Εικόνα 1:** Πολυμερισμός μονοσακχαριτών  
(H.- D. Belitz et al., 2011)

Τα πιο γνωστά παραδείγματα ολιγοσακχαριτών είναι η σακχαρόζη ή αλλιώς η κοινή ζάχαρη, η μαλτόζη και η λακτόζη.

Τέλος οι πολυσακχαρίτες είναι πολυμερή που απαρτίζονται από μονοσακχαρίτες πλήθους  $n$  μονάδων, με αριθμό  $n$  μεγαλύτερο του 10. Έχουν μεγάλο μοριακό βάρος κι έχουν σημαντικές διαφορές από τα υπόλοιπα είδη σακχάρων, όπως μικρή διαλυτότητα σε νερό, όχι γλυκιά γεύση και αδράνεια. Κάποιοι εκπρόσωποι των πολυσακχαριτών είναι το άμυλο, η κυτταρίνη και η πηκτίνη.

Στο κρασί, τα σάκχαρα που βρίσκονται ενώ έχει ολοκληρωθεί η ζύμωση πλήρως, είναι οι εξόζες και συγκεκριμένα η φρουκτόζη και γλυκόζη σε μικρές ποσότητες (0,03-0,5 %). Στους ατελώς ζυμωμένους οίνους τα ποσοστά τους είναι υψηλότερα, με μεγαλύτερο αυτό της φρουκτόζης καθώς η ζύμωσή της είναι πιο αργή. Παρόλα αυτά είναι πιθανό να εντοπιστούν και πεντόζες όπως η αραβινόζη, η ραμνόζη και η ξυλόζη (H.- D. Belitz et al., 2011,pg 929).

Η ποσότητα των σακχάρων που αποτελεί το 95% των στερεών συστατικών του μούστου και προσδιορίζεται σε βαθμούς Brix και Baume .

Οι βαθμοί Brix απεικονίζουν τα γραμμάρια των σακχάρων(γραμμάρια διαλυμένης ουσίας) στα 100 γραμμάρια διαλύματος. Που όμως συνδέονται με το παραγόμενο αλκοόλ καθώς 1,75 γραμμάρια σακχάρου αντιστοιχεί σε 1% αλκοολικό βαθμό.(Yair Maergalit, 1997)

Οι βαθμοί Baume του μούστου ,ένας άλλος τρόπος εκτίμησης των επιπέδων σακχάρων. χρησιμοποιούνται γιατί η τιμή τους ανταποκρίνεται πολύ καλά με το αλκοόλ που θα παραχθεί (ειδικά μεταξύ των τιμών 10 με 12) (Gayon et al., 2006,pg.261). Οι βαθμοί Baume (°B ή °Bé) αντιστοιχούν ουσιαστικά στο ειδικό βάρος του διαλύματος των σακχάρων και υπάρχουν δύο κλίμακες βαθμών Baume, η μια για διαλύματα πυκνότερα του νερού και η άλλη για αυτά με μικρότερη πυκνότητα (Ball, 2006).

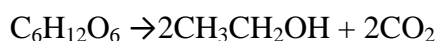
#### 1.4) Αλκοόλες

Οι αλκοόλες παράγονται είτε ως κύρια προϊόντα κατά την αλκοολική ζύμωση είτε ως υποπροϊόντα αντιδράσεων που λαμβάνουν τότε χώρα. Οι κυριότερες αλκοόλες που περιέχονται στο κρασί είναι:

## Αιθανόλη

Η αιθανόλη αποτελεί τη βασικότερη αλκοόλη της αλκοολικής ζύμωσης και η παραγωγή της εξαρτάται από την ποσότητα των σακχάρων και την πορεία της αλκοολικής ζύμωσης.

Η αντίδραση της αλκοολικής ζύμωσης περιγράφεται παρακάτω:



Θεωρητικά τα 140g σακχάρων( Mw σακχάρου=140) μετατρέπονται σε 92g αιθανόλης(Mw αιθανόλης=46), με θεωρητική απόδοση 51% καθώς ένα μέρος των σακχάρων μετατρέπονται σε άλλες ενώσεις όπως αλδεΐδη, σουκινικό οξύ και υψηλότερες αλκοόλες . Η πραγματική απόδοση είναι 46-47%.

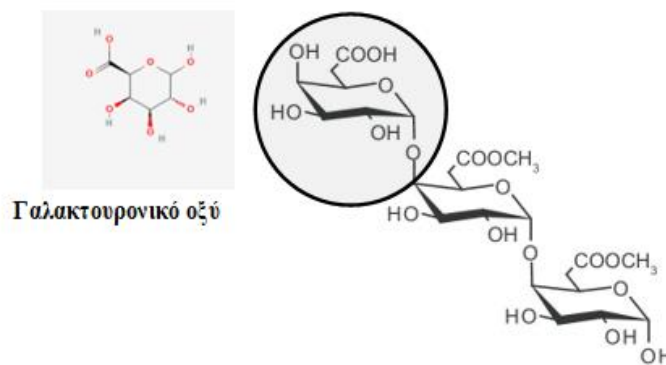
Έχει υπολογιστεί ότι 1,75 βαθμών Brix αντιστοιχεί σε 1% (v/v) αιθανόλη.

Η περιεκτικότητα της αιθανόλης ή αλλιώς του αλκοόλ στα κρασιά του εμπορίου φαίνεται στον πίνακα 1 που ακολουθεί.

**Πίνακας 1**

<b>Είδος κρασιού</b>	<b>Περιεκτικότητα αλκοόλ</b>
Επιτραπέζια	7-14%
Αφρώδη	11-13%
Sherry	16-18%
Porto και επιδόρπια	<17%
Όψιμου τρύγου επιδόρπια	8-13%

Υπάρχουν δύο μέθοδοι για τον προσδιορισμό της αιθανόλης (αλκοόλ) στο κρασί, η αραιομετρία και το σημείο ζέσεως. Βάσει της αραιομετρίας και πιο συγκεκριμένα της υδρομετρικής μεθόδου, αποστάζεται γνωστού όγκου δείγμα κρασιού σε καθαρή αλκοόλη στους 78,3 °C βαθμούς (Τσακίρης Αργύρης, 2009). Μόλις συλλεχθεί το απόσταγμα συμπληρώνεται νερό έτσι ώστε το νέο διάλυμα του αποστάγματος να έχει τον ίδιο όγκο με το αρχικό δείγμα. Λαμβάνεται μέτρηση με το υδρόμετρο στους 20°C και με πίνακες αναγωγής βρίσκεται το ποσοστό της περιεχόμενης αλκοόλης. Ο άλλος τρόπος εκτίμησης της αλκοόλης είναι με βάση το σημείο βρασμού του δείγματος με χρήση θερμομέτρων ευαισθησίας 0,1°C όπου υπάρχουν πίνακες αντιστοίχισης της θερμοκρασίας και του περιεχόμενου αλκοόλ. Τα αλκοολικά δείγματα που χρησιμοποιούνται για τις παραπάνω μεθόδους χρειάζεται να περιέχουν αιθανόλη σε εύρος 9-15%, κι αυτές έχουν αξιοπιστία (+/- 0,5%) της πραγματικής περιεκτικότητας σε αλκοόλη.



**Εικόνα 2:** Πολυμερές πηκτίνης (1,2)

### Μεθανόλη

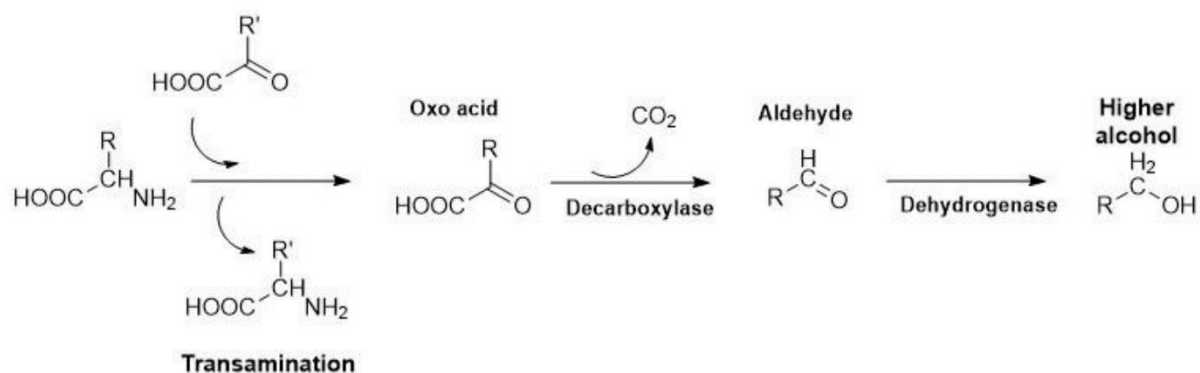
Η μεθανόλη πρόκειται για μια αλκοόλη που προέρχεται από την υδρόλυση των πηκτινών του σταφυλιού από τις πηκτινάσες (μεθυλεστεράσες) (Hodson et al., 2017). Περιέχεται σε μεγαλύτερα επίπεδα στους βόστρυχες, τους φλοιούς και τα γίγαρτα των σταφυλιών κατά την ζύμωσή τους, κάτι που οφείλεται στην υδρόλυση των πηκτινών (H.- D. Belitz et al., 2011,pg 929). Οι πηκτίνες είναι συμπολυμερή γαλακτουρονικού οξέος και των μεθυλεστερών του, που συνδέονται μέσω δεσμών 1→4 (εικόνα 2). Η υδρόλυση των ομάδων μεθυλεστερά που υπάρχουν στην πηκτίνη (πηκτινεστεράσες) και το σπάσιμο των δεσμών C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> της πηκτίνης, μέσω της δράσης των υδρολυτικών ενζύμων που υπάρχουν φυσιολογικά στο σταφύλι, οδηγούν στον σχηματισμό της μεθανόλης.

Επίσης αυξάνει στη συγκέντρωση της μεθανόλης η συμπαράμονή του γλεύκους με τους φλοιούς των σταφυλιών καθώς περιέχουν μεγάλη ποσότητα πηκτινασών. (Yair Maergalit, 1997). Γι' αυτόν τον λόγο οι ερυθροί οίνοι περιέχουν μεγαλύτερα ποσοστά μεθανόλης (120 έως 250 mg/L) από τους λευκούς οίνους ( 40 έως 120 mg/L), αφού παραμένουν μεγαλύτερο χρονικό διάστημα με τους φλοιούς. Επίσης, οι οίνοι που προέρχονται από προσβεβλημένα σταφύλια από τον μύκητα *Botrytis cinerea* ή από το είδος μη *Vitis vinifera* έχει βρεθεί ότι έχουν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις μεθανόλης (Hodson et al., 2017).

Τέλος, η μεθανόλη ενώ από χημική άποψη είναι τοξική και θανατηφόρος σε ποσότητα 100 με 250 ml ανά άτομο, στην ποσότητα που βρίσκεται στο κρασί δεν θεωρείται επικίνδυνη. (Yair Maergalit, 1997). Μια δήλωση που υποστηρίζουν και οι Hodson et al., (2017), θεωρώντας ότι ακόμα και στα μέγιστα επιτρεπτά όρια δε φαίνεται να μπορούν να βλάψουν τον ανθρώπινο οργανισμό.

### Ανώτερες αλκοόλες

Οι ανώτερες αλκοόλες προέρχονται κυρίως από τα αμινοξέα και η παρουσία τους είναι συνήθης στα προϊόντα ζύμωσης. Τα αμινοξέα μετατρέπονται σε αλκοόλες ακολουθώντας μια αλυσιδωτή σειρά αντιδράσεων. Πρώτα μια απαμίνωση, μια αποκαρβοξυλίωση και μια αναγωγή όπως φαίνεται ακολούθως.



**Εικόνα 3:** Παραγωγή ανώτερων αλκοολών (I. Ferreira & Guido, 2018)

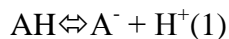
Η δημιουργία των ανώτερων αλκοολών από αμινοξέα και η απαμίνωση που συμβαίνει για να παραχθούν, έχουν σημαντικό ρόλο για την εξέλιξη της ζύμωσης καθώς συμβαίνουν όταν υπάρχει έλλειψη συγκεκριμένων αμινοξέων και συμβάλλουν στην ολοκλήρωσή της (Yair Maergalit, 1997). Υπάρχει περίπτωση να προέρχονται από σάκχαρα και συγκεκριμένα από τα α-κετοξέα, τα οποία αποκαρβοξυλιώνονται και ανάγονται (Τσακίρης Αργύρης, 2009). Ανώτατες αλκοόλες που έχουν εντοπιστεί στο κρασί είναι η n-προπανόλη, η n-βουτανόλη, η ισοπροπανόλη, η ισοβουτανόλη, η n-αμυλοαλκοόλη, η 3 μεθυλοβουτανόλη, η 2-μεθυλοβουτανόλη, η n-εξανόλη και η 2-φαινυλαιθανόλη. Μπορούν να βρεθούν σε συγκέντρωση 100-500mg/l (Yair Maergalit, 1997).

Άλλες αλκοόλες που υπάρχουν στο κρασί είναι οι πολυαλκοόλες σύμφωνα με τους Vlahou et al. (2022) κάποιες από τις οποίες είναι η γλυκερόλη, η βουτανεδιόλη-2,3, η ινοσιτόλη, η μαννιτόλη και η σοβιτόλη. Η κύρια πολυαλκόλη που αποτελεί παραπροϊόν της αλκοολικής ζύμωσης είναι η γλυκερόλη και σύμφωνα με τους H.- D. Belitz et al. (2011) είναι υπεύθυνη για το σώμα του κρασιού. Αυτή επηρεάζεται από την ποσότητα του παραγόμενου αλκοόλ, τη θερμοκρασία της ζύμωσης και το στέλεχος του ζυμομύκητα που χρησιμοποιήθηκε. Έχει φανεί ότι τα ποσοστά της γλυκερόλης είναι μεγαλύτερα όσο μεγαλύτερη είναι η θερμοκρασία, γι' αυτό εντοπίζονται σε υψηλότερα ποσοστά στους ερυθρούς οίνους. Επίσης υψηλότερη συγκέντρωση έχουν τα κρασιά που προέρχονται από υπερώριμα σταφύλια και σταφύλια προσβεβλημένα με *Botrytis cinerea*. Τέλος τα όρια της συγκέντρωσής της στο

κρασί είναι 4-12 g/l και αντίστοιχα στο σταφύλι η συγκέντρωση είναι 0,5 g/l (Yair Maergalit, 1997).

### 1.5) Οργανικά οξέα

Χαρακτηριστικό όλων των οξέων, ανόργανων και οργανικών, είναι η όξινη γεύση που οφείλεται στο κατιόν υδρογόνου (H.- D. Belitz et al., 2011). Συγκεκριμένα τα οξέα του κρασιού προέρχονται από δύο πηγές. Είτε δημιουργούνται στο σταφύλι και καταλήγουν στο κρασί (όπως το τρυγικό, το μηλικό και το κιτρικό οξύ) είτε παράγονται κατά την οينوποιητική διαδικασία (γαλακτικό, σουκινικό, οξικό και άλλα οξέα). Προτού επεξηγηθούν τα κύρια οξέα που απαντώνται στον οίνο, είναι σημαντικό να επεξηγηθεί η σημαντικότητα του ρόλου της οξύτητας στην οينوποίηση. Η οξύτητα των οίνων επηρεάζει όχι μόνο την οργανοληπτική τους ισορροπία αλλά και τη μικροβιακή σταθερότητα, το χρώμα τους, την μηλογαλακτική τους ζύμωση, την παλαίωσή τους, την τρυγική και πρωτεϊνική σταθερότητα. Τα οργανικά οξέα του κρασιού θεωρούνται ασθενή, ένας ορισμός που συνεπάγεται την μικρότερη ικανότητά τους να απελευθερώνουν κατιόντα υδρογόνου και τη μικρότερη σταθερά ιοντισμού τους. Η αντίδραση ιοντισμού των ασθενών οργανικών οξέων στο κρασί είναι:



Η σταθερά ιοντισμού  $K_d$  περιγράφεται ως  $K_d = [A^-][H^+]/[AH]$  κι όσο μεγαλύτερη είναι τόσο αυξάνεται η ισχύς του οξέος όπως και η ικανότητα απελευθέρωση κατιόντων υδρογόνου. Τα  $[A^-]$ ,  $[H^+]$  και  $[AH]$  αποτελούν τις συγκεντρώσεις των ιοντισμένων μορφών  $A^-$  και  $H^+$  και των πρωτονιωμένων αντίστοιχα  $AH$  του οξέος. Εφόσον εμπλέκονται τα κατιόντα υδρογόνου που απελευθερώνονται από το οξύ στη σχέση αυτή, εμπλέκεται κι αντίστοιχα η έννοια του pH. Το pH ορίζεται ως  $pH = -\log[H^+]$  κι αντικατοπτρίζει την πραγματική συγκέντρωση των κατιόντων υδρογόνου, όχι όμως και την πραγματική συγκέντρωση των οξέων. Η σχέση (1) λοιπόν, λογαριθμίζοντας τα δύο μέλη αποκτά την μορφή αυτή:

$$\text{Log } [A^-]/[AH] = pH - pK_a (2) \text{ όπου } -\log K_d = pK_a$$

Έτσι φαίνεται η σχέση της πραγματικής συγκέντρωσης του οξέος με το pH, που σχετίζεται περισσότερο με την πραγματικότητα αφού τα ασθενή οξέα δεν δίστανται πλήρως. Με την έννοια της ογκομετρούμενης οξύτητας απεικονίζεται το σύνολο των όξινων υδρογόνων, σε ιοντική ή μοριακή κατάσταση. Μόνο που χρειάζεται να ληφθούν υπόψιν τα αλκάλια όπως το K (κάλιο) που βρίσκονται στο περιβάλλον του κρασιού και αντικαθιστούν κάποια από τα



κατιόντα υδρογόνου των οξέων, για να εκτιμηθεί η συνολική οξύτητα. Οπότε η ολική οξύτητα υπολογίζεται από την επακόλουθη σχέση:

$$\text{Ολική οξύτητα} = \text{Ογκομετρούμενη οξύτητα (TA)} + [\text{K}^+]$$

Τα δύο κυριότερα οξέα του κρασιού που σχηματίζονται στο σταφύλι και θα βρεθούν στο κρασί είναι το τρυγικό και το μηλικό. Τα δύο αυτά οξέα υπόκεινται αλλαγές στη συγκέντρωσή τους κατά την ωρίμανση των σταφυλιών, με διαφορετικούς τρόπους. Το τρυγικό οξύ παραμένει σχεδόν αμετάβλητο ενώ το μηλικό ελαττώνεται όσο προχωράει η ωρίμανση εξαιτίας της αναπνοής.

### **Τρυγικό οξύ**

Το τρυγικό οξύ περιέχεται στο σταφύλι σε υψηλά ποσοστά και συνεισφέρει σημαντικά στην οξύτητα του κρασιού (Volschenk et al., 2006; Chidi et al., 2018). Δεν μεταβολίζεται όπως το μηλικό οξύ κατά την αναπνοή κυρίως κατά το στάδιο του περκασμού (λόγω αναγκών για συμμετοχή του σε μεταβολικές πορείες όπως ο κύκλος του πυρουβικού οξέος ή ο TCA κύκλος) (Volschenk et al., 2017) και όπως αναφέρθηκε πιο πάνω η συγκέντρωσή του είναι σχετικά σταθερή. Παρόλα αυτά η συγκέντρωσή του τρυγικού οξέος στο σταφύλι εξαρτάται από εξωτερικούς παράγοντες όπως την ποικιλία του σταφυλιού και τη σύσταση του εδάφους στον αμπελώνα.

Μια συνήθης συγκέντρωση τρυγικού οξέος στο τέλος της ανάπτυξης του σταφυλιού άρα και της ράγας, είναι 4,5 με 10 g/l (Ribéreau-Gayon et al., 2006; Chidi et al., 2018). Σύμφωνα με τους Apichai et al στις πιο κρύες χώρες έχει παρατηρηθεί ότι τα επίπεδα του τρυγικού οξέος είναι υψηλότερα σε σχέση με τις πιο ζεστές χώρες. Τέλος να σημειωθεί ότι χρησιμοποιείται ευρέως για τη διόρθωση της οξύτητας και τη ρύθμιση του pH, εξαιτίας της μεγάλης του σταθερότητας και του γεγονότος ότι οι ζυμομύκητες και άλλοι μικροοργανισμοί δεν το μεταβολίζουν (Volschenk et al., 2006; Chidi et al., 2018).

### **Μηλικό οξύ**

Το L -μηλικό οξύ βρίσκεται σε πολλά φρούτα όπως και το σταφύλι, σύμφωνα με τον Kueger. Πιο ειδικά η συγκέντρωσή του αναμένεται να είναι μεταξύ των 2 με 6 g/L μετά τον περκασμό κατά την ωρίμανση της ράγας (Ribéreau-Gayon et al., 2000). Σε εξαιρετικά ψυχρές περιοχές η συγκέντρωσή του μπορεί να έχει πολύ μεγαλύτερη τιμή (περίπου 15 g/l) (Gallander, 1977). Όπως το τρυγικό έτσι κι αυτό εξαρτάται από την ποικιλία του σταφυλιού.

Η γεύση του χαρακτηρίζεται από αυτή του «πράσινου», ενώ σε υψηλή συγκέντρωση αποκτά μια ξινή γεύση που προσομοιάζεται με αυτή του άγουρου μήλου (Noble, 1998; Volschenk et

al., 2017). Επίσης, το οξύ αυτό πολλές φορές χρειάζεται να μετατραπεί σε γαλακτικό οξύ μέσω της μηλογαλακτικής ζύμωσης, υπό τη δράση γαλακτικών βακτηρίων. Έτσι η ξινή γεύση του μηλικού αντικαθιστά την πιο μαλακιά γεύση του γαλακτικού οξέος, κάτι που δεν ευεργετεί ιδιαίτερα τους λευκούς οίνους (παράγεται διακετύλιο) (Bartowsky & Henschke, 2004).

### **Κιτρικό οξύ**

Το κιτρικό οξύ κατέχει σπουδαίο ρόλο στις βιοχημικές διεργασίες της ράγας όπως και των βακτηρίων ή των ζυμομυκήτων. Για παράδειγμα, σύμφωνα με τους Nielsen & Arneborg (2007) όσο μεγαλύτερη η ποσότητα του κιτρικού οξέος κατά την αλκοολική ζύμωση τόσο πιο αργά αναπτύσσονται οι ζυμομύκητες. Σύμφωνα με τους Kalathenos et al. (1995) η συγκέντρωσή του κυμαίνεται μεταξύ των 0,5 με 1 g/l στον μούστο, πριν την έναρξη της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Πολλές φορές προστίθεται κατά την αλκοολική ζύμωση και ενώ προσδίδει την αίσθηση της φρεκάδας, μπορεί να προκαλέσει την ανάπτυξη ανεπιθύμητων μικροοργανισμών (Chidi et al., 2018).

### **Άλλα οξέα που παράγονται κατά τη ζύμωση**

Σύμφωνα με τους Vlahou et al. (2022) τα οργανικά οξέα που παράγονται κατά την αλκοολική ζύμωση είναι πολλά όπως το σουκινικό οξύ, το πυρουβικό, το οξικό, το γαλακτικό, το ηλεκτρικό, το κιτρομηλικό, το οξαλοξικό και το φουμαρικό οξύ.

### **Γαλακτικό οξύ**

Σύμφωνα με τον Robinson (2006) το γαλακτικό οξύ είναι ένα οργανικό οξύ που συμβάλει στην ολική οξύτητα του κρασιού και οι Osborne et al. (2000) υποστηρίζουν ότι προσδίδει μια λιπαρή αίσθηση. Στο κρασί εντοπίζεται φυσιολογικά στη συγκέντρωση 1 με 3 g/l όπως αναφέρουν οι Boulton et al. (2006) που όμως σύμφωνα με τους Volschenk et al. (2006) αγγίζει υψηλότερες τιμές στα κρασιά που έχουν υποστεί μηλογαλακτική ζύμωση. Οι οινοποιοί όταν δεν επιθυμούν την παραγωγή του προσθέτουν θειώδη ανυδρίτη, στον οποίο τα βακτήρια *Oenococcus* και *Lactobacillus* είναι ευαίσθητα και έτσι σταματούν οι μεταβολικές διεργασίες τους που το συνθέτουν (Osborne et al., 2000). Πολλές φορές βέβαια παράγεται σε μικρές ποσότητες κατά τη διάρκεια της εκχύλισης από τους φλοιούς των σταφυλιών ή όταν γίνεται σταθεροποίηση του κρασιού με ψύξη (Jackson & Schuster, 1997). Σύμφωνα με τον Lonvaud-Funel (1999) οι μεγάλες ποσότητες γαλακτικού οξέος στο κρασί

ενώ μπορεί να μην είναι ανεπιθύμητες, είναι όμως επικίνδυνες γιατί τα υπάρχοντα γαλακτικά βακτήρια είναι ικανά να προκαλέσουν αλλοιώσεις (Lonvaud-Funel, 1999; Chidi et al., 2018).

### **Πτητική οξύτητα και οξικό οξύ**

Ο όρος της πτητικής οξύτητας αναφέρεται σε μια ομάδα πτητικών οξέων που βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις όπως το οξικό, το φορμικό, το προπιονικό και το βουτυρικό οξύ σύμφωνα με την Yair Maergalit (1997) και το μυρμηγκικό (Ribereau-Gayon et al., 2006).

Το βασικότερο πτητικό οξύ είναι το οξικό οξύ, το οποίο αποτελείται από δύο άτομα άνθρακα και παράγεται κατά την αλκοολική ζύμωση, με χαρακτηριστική όξινη γεύση. Απαιτείται οξυγόνο κατά την παραγωγή του από τα οξικά βακτήρια, τα οποία οξειδώνουν την αιθανόλη σε οξικό οξύ. Εάν η επαφή με το οξυγόνο είναι ανεξέλεγκτη είναι δυνατόν όλη η ποσότητα του κρασιού να μετατραπεί σε ξύδι (οξικό οξύ) (Yair Maergalit, 1997). Σύμφωνα με τους Bartowsky et al. (2003) η παραγωγή του πραγματοποιείται κατά την αρχή ή το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης, εκτός από τα οξικά βακτήρια και από τα μεταβολικά μονοπάτια των ζυμών (Pronk et al., 1996; Ghosh et al., 2012). Ως προς τη βακτηριακή προέλευση του οξικού οξέος να προστεθεί η παραγωγή του κατά την μηλογαλακτική ζύμωση όπου το κιτρικό οξύ διασπάται από τα γαλακτικά βακτήρια (Chauvet et al., 1982; Vlahou et al., 2022). Ως προς την παραγωγή του από το μεταβολισμό των ζυμών, ο ζυμομύκητας *Saccharomyces Cerevisiae* εμπλέκεται ως έμμεσος ενεργειακός εξισορροπιστής στη σχέση μεταξύ παραγωγής οξικού οξέος και γλυκερόλης. (Remize et al., 1999, Erasmus et al., 2004; Goold et al. 2017). Υπάρχουν πολυάριθμα μεταβολικά μονοπάτια με αντιδράσεις οξείδωσης και αναγωγής που χρειάζονται αναγέννηση του  $\text{NAD}^+$  ή του  $\text{NADH}$  για να πραγματοποιηθούν. Ξεκινώντας με τη βιοσύνθεση της γλυκερόλης και το σκόρπισμα των προϊόντων της γλυκόλυσης, αναγεννάται το  $\text{NAD}^+$ , δε συντίθεται γι' αυτό αιθανόλη. Όταν όμως υπάρχει πλεονάζουσα ποσότητα  $\text{NAD}^+$ , παράγεται οξικό οξύ από την ακεταλδεΐδη για να μετατραπεί το  $\text{NAD}^+$  σε  $\text{NADH}$  (Michnick et al., 1997; Remize et al., 1999). Ουσιαστικά όλη αυτή η πορεία συμβαίνει σαν ανταπόκριση του σακχαρομύκητα στο οσμωτικό στρες από την παρουσία πολλών σακχάρων, στην αρχή της αλκοολικής ζύμωσης (Hohmann, 2002). Η μέγιστη αποδεκτή συγκέντρωση του οξικού οξέος στον οίνο είναι 1,2 g/l για να μην επηρεάσει τα αρώματα του κρασιού, με εξαίρεση τα κρασιά που προέρχονται από σταφύλια που προσβλήθηκαν από βοτρυτή και τα ice wines (OIV, 2010).

Τέλος να αναφερθεί ότι η υψηλή πτητική οξύτητα είναι συνέπεια διάσπασης ενώσεων όπως το τρυγικό οξύ, η γλυκερόλη και τα εναπομείναντα σάκχαρα από τα γαλακτικά βακτήρια. (Ribereau-Gayon et al., 2006; Vlahou et al., 2022). Ένας τρόπος αποφυγής της υψηλής

πτητικής οξύτητας επομένως και της παραγωγής οξικού οξέος μέσω ζυμών, είναι η χαμηλότερη περιεκτικότητα σακχάρων στο γλεύκος (Bely et al., 2003).

### **1.6) Αζωτούχες ενώσεις**

Οι πιο γνωστές ενώσεις στο σταφύλι που περιέχουν το στοιχείο του αζώτου είναι τα αμινοξέα και τα πολυμερή όπως οι πρωτεΐνες. Όλες αυτές οι ενώσεις περιέχουν τη χαρακτηριστική αμινομάδα, η οποία διαθέτει ένα άτομο αζώτου με ένα ζεύγος ασύζευκτων ηλεκτρονίων και τρία άτομα υδρογόνου που μπορεί να αντικατασταθούν από άλλα άτομα ή ομάδες. Στο μούστο και τον οίνο οι βασικές αζωτούχες ενώσεις είναι το αμμώνιο και τα ελεύθερα αμινοξέα που αποτελούν την κύρια πηγή αζώτου κατά την αλκοολική ζύμωση (Waterhouse et al., 2016). Στη σάρκα του σταφυλιού περιέχονται και ελεύθερα ιόντα με μεγαλύτερο ποσοστό αυτό του καλίου ( $K^+$ ), το οποίο βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση όσο πιο κοντά στην περιφέρεια της ράγας βρίσκεται (Τσακίρης Αργύρης, 2009).

Οι ποσότητες των αζωτούχων ενώσεων σχετίζεται με τον βαθμό ωρίμανσης των σταφυλιών, από την ποικιλία, το χρόνο της παραμονής με τα στέμφυλα, τη θερμοκρασία, τη ζύμωση και την οξύτητα του μούστου. Επίσης οι ανόργανες αζωτούχες ενώσεις βρίσκονται σε μικρότερες συγκεντρώσεις συγκριτικά με τις ενώσεις οργανικής φύσης (οι τελευταίες αποτελούν στο 95% των ενώσεων στον οίνο) και τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε αυτές την έχουν οι ερυθροί οίνοι συγκριτικά με τους λευκούς (Ribereau & Gayon et al., 1982; Vlahou et al., 2022).

#### **Ανόργανες χημικές ενώσεις**

Η κύρια μορφή αζώτου ανόργανης φύσης που χρησιμοποιείται ως πηγή θρεπτικών στην αλκοολική ζύμωση από τους ζυμομύκητες και μπορεί να βρεθεί στο κρασί είναι το αμμώνιο ( $NH_4^+$ ) (Waterhouse et al., 2016) και τα νιτρικά (Ronald S. Jackson, 2008). Οι ανόργανες ενώσεις που περιέχουν άζωτο συναντώνται κυρίως ως αμμωνιακά άλατα  $[(NH_4)_3PO_4]$  τα οποία ελαττώνονται έως το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης, καθώς αποτελεί πηγή  $NH_4^+$  (Ribereau-Gayon et al., 2005; Vlahou et al., 2022).

#### **Οργανικές χημικές ενώσεις**

##### **Αμινοξέα**

Τα αμινοξέα που περιέχονται στο γλεύκος και το παραγόμενο κρασί περιέχουν διάφορες χαρακτηριστικές ομάδες που μπορούν να ιονιστούν στις συνθήκες pH που κυριαρχούν στην κάθε περίπτωση. Η απλή τους μορφή περιέχει δύο ομάδες, τη χαρακτηριστική ομάδα των

καρβοξυλικών οξέων (R-COOH) και αυτή των αμινών (R-NH<sub>2</sub> ή R-NH-R'). Μια από της μορφές των αμινοξέων και των πρωτεϊνών στον οίνο είναι η zwitterions όπου συνυπάρχουν οι ιονισμένες ομάδες αμφοτέρων φορτίων (θετικό και αρνητικό). Ο ακριβής τρόπος ιονισμού μπορεί να προβλεφθεί με ακρίβεια όταν είναι γνωστές οι τιμές του pH και του ισοηλεκτρικού σημείου pI. Όταν οι δύο αυτές τιμές είναι ίσες τότε το συνολικό φορτίο είναι μηδενικό στην ένωση του αμινοξέος ή της πρωτεΐνης. Όμως όταν ισχύουν οι ανισότητες pH>pI ή pH<pI τότε η περιγραφόμενη ένωση έχει αρνητικό ή θετικό φορτίο αντίστοιχα. Στις συνθήκες του οίνου συνήθως η τιμή του pI είναι μεγαλύτερη από αυτή του pH, δηλαδή το συνολικό φορτίο είναι θετικό και γι'αυτό μπορούν να δημιουργηθούν ιοντικοί δεσμοί με αρνητικά φορτισμένες ενώσεις. Επίσης οι πρωτεΐνες είναι δυνατόν να σχηματίσουν δεσμούς υδρογόνου ως αποδέκτες υδρογόνου με ενώσεις όπως οι πολυφαινόλες ή ο μπετονίτης.

Τα α-αμινοξέα που κυριαρχούν στο κρασί είναι αυτά που η ομάδα (-NH<sub>2</sub>) είναι συνδεδεμένη με τον ίδιο άνθρακα που βρίσκεται η ομάδα (-COOH), με βασικότερο την προλίνη. Η προλίνη μπορεί να εντοπιστεί σε συγκεντρώσεις έως και 4000mg/L, ακολουθούμενη από αργινίνη,βαλίνη και αργινίνη. Παρόλα αυτά δεν αποτελούν όλα τους αφομοιώσιμη πηγή ζώτου από τους ζυμομύκητες, καθώς το άζωτο που αφομοιώνεται από τους ζυμομύκητες (YAN) κατά την αλκοολική ζύμωση, βρίσκεται από την ακόλουθη σχέση

$$YAN = \text{Αμμώνιο (mg/L σε N)} + \text{Ελεύθερα αμινοξέα (mg/L σε N)}$$

Στους οίνους η συγκέντρωση των α-αμινοξέων είναι μικρότερη από αυτή στο γλεύκος, διότι έχει ήδη χρησιμοποιηθεί από τις ζύμες (Waterhouse et al., 2016).

### **Πρωτεΐνες**

Οι πρωτεΐνες είναι πολυμερή αμινοξέων που συνδέονται με αμιδικούς δεσμούς (R-CONH-R') και περιέχουν τουλάχιστον εκατό αμινοξέα. Το πρωτεϊνικό περιεχόμενο σε γλεύκος και οίνο λευκών ποικιλιών σταφυλιού είναι 20–250mg/L και 30–275mg/L. Στον οίνο συναντώνται πρωτεΐνες μεγαλύτερης τιμής από 3 kDa, άγευστες όπου πολλές από αυτές είναι ευαίσθητες στη θερμοκρασία, μετουσιώνονται και προκαλούν θόλωμα. Ο κύριος ζυμομύκητας που χρησιμοποιείται στην οινοποίηση είναι ο *S. Cerevisiae* που θα μπορούσε να χρησιμοποιήσει τις πρωτεΐνες ως θρεπτική πηγή όμως λόγω έλλειψης πρωτεολυτικής δράσης δε μπορεί να χρησιμοποιηθούν οι πρωτεΐνες του σταφυλιού ως νιτρική πηγή για την ανάπτυξή του (Waterhouse & Laurie, 2006).

Επίσης, οι πρωτεΐνες που συναντώνται στο κρασί βρίσκονται σε χαμηλή συγκέντρωση έχουν όμως τεχνολογική και οικονομική σημασία γιατί επηρεάζουν τη σταθερότητα και την διαύγεια των οίνων. Η πλειοψηφία των πρωτεϊνών αυτών είναι κυρίως (PR) πρωτεΐνες, που

συντίθενται στο σταφύλι και συνδέονται με παθογένεια (φυσιολογικά είναι μέρος της αντιμετώπισης παθογόνων μικροοργανισμών Van Loon, (1985) κι έχουν τα εξής χαρακτηριστικά: αντιστέκονται στην πρωτεόλυση και επιβιώνουν στις συνθήκες χαμηλού pH στον οίνο. Τέτοιου είδους πρωτεΐνες είναι η χιτινάσες και οι πρωτεΐνες τύπου θαυματίνη (Robinson & Davies, 2000; R. B. Ferreira et al., 2001). Η μεγαλύτερη κατηγορία είναι οι θαυματίνες όμως η χιτινάση αποτελεί το 50% των υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών στις ράγες του σταφυλιού.

Η μετουσίωση των πρωτεϊνών που αποτελεί το πρώτο βήμα για τη δημιουργία εκνεφώματος, οδηγεί στο σχηματισμό ιζήματος ή την κροκίδωση τους κι έτσι καταλήγει στη δημιουργία ενός καθόλου ελκυστικού για τον καταναλωτή, θολώματος (R. B. Ferreira et al., 2001). Οι μηχανισμοί εξήγησης της δημιουργίας θολώματος περιγράφεται ως μια διαδικασία δύο βημάτων παρόλο που δεν είναι πλήρως κατανοητά. Το πρώτο είναι η μετουσίωση ως ανταπόκριση στο ερέθισμα υψηλών θερμοκρασιών κατά την αποθήκευση και το δεύτερο η συγκέντρωσή τους και η κροκίδωσή τους για τον τελικό σχηματισμό του. Κάποιοι από τους παράγοντες που σχετίζονται με τη δημιουργία θολώματος είναι η ωρίμανση του σταφυλιού (αυξάνονται ανάλογα), το κλίμα, το έδαφος, η ποικιλία κι άλλες (Bayly & Berg, 1967). Το Terroir επηρεάζει με λίγα λόγια την ποιότητα και την ποσότητα των πρωτεϊνών (R. B. Ferreira et al., 2001).

Υπάρχουν όμως και πρωτεΐνες που δεν προκαλούν νέφωμα, οι οποίες εντοπίζονται τόσο στο γλεύκος όσο και στον τελικό λευκό κυρίως οίνο οι οποίες είναι οι μαννοπρωτεΐνες, η ινβεργτάση, οι γλυκοπρωτεΐνες και οι πρωτεογλυκάνες των τοιχώματων των κυττάρων. Ασκούν σημαντική επιρροή στην ποιότητα του οίνου λόγω της σταθεροποίησης δρώντας ενάντια στις πρωτεΐνες που επηρεάζονται από τη θέρμανση, επηρεάζουν τις ιδιότητες του αφρού στους αφρώδεις οίνους και αλληλεπιδρούν με τις αρωματικές ενώσεις (van Sluyter et al., 2015).

Η αστάθεια των πρωτεϊνών όμως και κυρίως στους λευκούς οίνους αποτελεί μείζον πρόβλημα που αντιμετωπίζεται με διαυγαστικά μέσα (Bayly & Berg, 1967; Hsu & Heatherbell, 1987a; Waters, Wallace, & Williams, 1992). Η συγκέντρωση λοιπόν, των πρωτεϊνών μειώνεται εξαιτίας της χρήσης παραγόντων διαύγασης όπως ο μπετονίτης.

Τρόποι διαύγασης εκτός του μπετονίτη που είναι ο πιο συνήθης, είναι τα ένζυμα που διασπούν τις πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες φυκιών αρνητικά φορτισμένοι, η χιτίνη (απομακρύνει όμως επιθυμητές ενώσεις αρώματος) (van Sluyter et al., 2015).

Σύμφωνα με έρευνες, η δημιουργία θολώματος από τις πρωτεΐνες δε σχετίζεται μόνο με την ποσότητα και το είδος των πρωτεϊνών, καθώς επηρεάζεται από τη θερμοκρασία, την ύπαρξη φαινολικών συστατικών και πολυσακχαριτών (Mesquita et al., 2001; Vlahou et al., 2022).

Ας αναφερθεί ότι πρωτεΐνες δημιουργούν δεσμούς με τις ταννίνες, ειδικά στην περίπτωση των ερυθρών οίνων που παραμένουν τα στέμφυλα με το γλεύκος για κάποιο χρονικό διάστημα (Waterhouse et al., 2016).

### **Ολιγοπεπτίδια**

Τα ολιγοπεπτίδια είναι πολυμερή όπως οι πρωτεΐνες, αποτελούνται όμως από δύο έως είκοσι αμινοξέα. Ένα από τα γνωστότερα που συναντάται στο σταφύλι είναι η γλουταθειόνη (GSH), αποτελούμενο από τα αμινοξέα γλυκίνη, κυστεΐνη και γλουταμίνη. Θεωρείται μια πηγή αφομοιώσιμου αζώτου, παρόλα αυτά οι ζυμομύκητες συνθέτουν γλουταθειόνη κατά την αλκοολική ζύμωση σε σημαντικό βαθμό. Ένας άλλος τρόπος που μπορεί να βρεθούν ολιγοπεπτίδια στο κρασί είναι κατά την αυτόλυση των ζυμών, χωρίς να έχει μελετηθεί ακόμη αρκετά (Waterhouse et al., 2016).

### **Αρωματικές αζωτούχες ενώσεις**

Η κυρίαρχη ομάδα αζωτούχων αρωματικών ενώσεων που βρίσκονται στο κρασί είναι οι πυραζίνες. Πρόκειται για ετεροκυκλικές οργανικές ενώσεις οι οποίες συνεισφέρουν στο άρωμα και τη γεύση πολλών προϊόντων όπως και το κρασί. Η 2-μεθόξυ-3-ισοβουτυλοπυραζίνη για παράδειγμα, είναι υπεύθυνη για το χαρακτηριστικό ποικιλιακό άρωμα της πράσινης πιπεριάς της ποικιλίας Cabernet Sauvignon. Συνήθως βρίσκεται σε συγκέντρωση 1–2 ng/L και είναι αισθητό κι ευχάριστο από όλους (η τιμή είναι πάνω από το κατώφλι αντίληψης) ενώ σε συγκέντρωση 8-20 ng/l ενώ συνεχίζει να προσδίδει ευχάριστη γεύση, σε μεγαλύτερες τιμές συμβαίνει το αντίθετο. Εκχυλίζονται κυρίως κατά την πίεση των σταφυλιών από τους φλοιούς τους και παράγονται πολλές ακόμα χωρίς να περνούν το κατώφλι αντίληψης (Allen et al., 1996). Υπάρχει μια ακόμη ομάδα νιτρικών κυκλικών ενώσεων, υπεύθυνων για το άρωμα στο κρασί, αυτή των πυριδινών. Όμως οι ενώσεις αυτές προκαλούν δυσάρεστες οσμές, όπως για παράδειγμα η 2-ακετυλτετραϋδροπυριδίνη που είναι υπεύθυνη για το άρωμα του mousiness (Heresztyn, 1986).

### **Βιογενείς αμίνες**

Οι βιογενείς αμίνες είναι αζωτούχες χημικές ενώσεις που παράγονται κυρίως μέσω αποκαρβοξυλίωσης αμινοξέων και κάποια από τα προϊόντα που εντοπίζονται είναι αυτά που

προέρχονται από ζύμωση (τρανσαμίνωση αλδευδών και κετονών) (Waterhouse et al., 2016, Ηλιοπούλου Σ.,2011; Askar. et. al, 1988). Έχει βρεθεί ότι υπάρχει μια ποικιλομορφία στο είδος και την ποσότητα των βιογενών αμινών, η οποία επηρεάζεται από τις αμπελουργικές και οινολογικές τεχνικές. Όσον αφορά τον οίνο τα υπεύθυνα βακτήρια για τη δημιουργία τους είναι τα γαλακτικά βακτήρια που σχετίζονται με τη μηλογαλακτική ζύμωση, ενώ οι εμπορικές ή οι γηγενείς ζύμες έχουν μικρή ικανότητα παραγωγής τους. Συνήθως τα βακτήρια που παράγουν βιογενείς αμίνες είναι αλλοιογόνα και ανήκουν στο είδος *Pediococcus* (Waterhouse et al., 2016).Βέβαια παίζει ρόλο και το στάδιο της οινοποίησης όπως και οι συνθήκες αποθήκευσης. Σύμφωνα με τους Onal et al. (2013) οι βιογενείς αμίνες ανάλογα με την διάταξη των ατόμων άνθρακα, κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες. Στις αλειφατικές όπως η πουτρεσκίνη, στις αρωματικές όπως η τυραμίνη και η 2-φαινυλαιθυλαμίνη και τέλος στις ετεροκυκλικές όπως η ισταμίνη και η τρυπταμίνη. Όπως υποστηρίζουν οι (Smit et al., 2014) οι ποσότητές τους εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες όπως την ποικιλία, το βαθμό ωρίμανσης, τη λίπανση (σύμφωνα με τους Vlahou et al (2022) η αζωτούχα λίπανση προκαλεί αύξηση στη συγκέντρωση των βιογενών αμινών στο σταφύλι) και την άρδευση του αμπελώνα, τις κλιματικές συνθήκες. Επίσης κατά την οινοποιητική διαδικασία η συγκέντρωσή τους εξαρτάται από τον αλκοολικό τίτλο και τις συνθήκες ζύμωσης όπως το pH, τη θερμοκρασία, τα επίπεδα του θειώδη ανυδρίτη και τη διάρκεια παλαίωσης. Ουσιαστικά αυτοί οι παράγοντες επηρεάζουν την αύξηση των πρόδρομων ενώσεων των αμινοξέων ή την ανάπτυξη στελεχών που έχουν το ένζυμο της αποκαρβοξυλάσης (Anli & Bayram, 2009; Guo et al., 2015). Κάποιες από τις βασικές βιογενείς αμίνες τους είναι η ισταμίνη, η τυραμίνη και η πουτρεσκίνη. Εντοπίζονται σε μικρότερες συγκεντρώσεις στους λευκούς οίνους σε σύγκριση με τους ερυθρούς, με συνολική συγκέντρωση μικρότερη από 4 mg/L, καθώς δεν είναι συνήθης η πραγματοποίηση της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Γενικά, οι βιογενείς αμίνες προκαλούν δυσμενείς επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία (Waterhouse et al., 2016). Για παράδειγμα η ισταμίνη προκαλεί προβλήματα όπως αγγειοδιαστολή και εμφάνιση φλεγμονών, ενώ οι τυραμίνη, η τρυπταμίνη και η 2-φαινυλαιθυλαμίνη είναι υπεύθυνες για την εμφάνιση ημικρανιών όπως και την αυξημένη αρτηριακή πίεση (Souza et al., 2005; Vlahou et al., 2022).

Σύμφωνα με τους Soufleros et al. (2007) πραγματοποιήθηκε έρευνα σχετικά με τη συγκέντρωση δέκα βιογενών αμινών σε ελληνικούς οίνους. Βρέθηκε ότι η μέση τιμή τους ήταν στα 4,76 mg/L με μεγαλύτερες τις συγκεντρώσεις της πουτρεσκίνης, της αιθυλαμίνης μετά της καδαβερίνης και της μεθυλαμίνης (Vlahou et al.,2022). Είναι λοιπόν αναγκαίο πραγματοποιηθεί πρόληψη της δημιουργίας τους. Κάποιοι από τους τρόπους αποφυγής του



σηματισμού τους είναι η χρήση εναρκτηρίων πληθυσμών βακτηρίων χωρίς το ένζυμο της αποκαρβοξυλάσης, η πρόληψη της προσβολής από ανεπιθύμητους μικροοργανισμούς και η μείωση του περιεχόμενου αζώτου μέσω του ελέγχου των προσθηκών του (Waterhouse et al., 2016). Μάλιστα, σύμφωνα με το πρόγραμμα της Ευρωπαϊκής Ένωσης, Biam Food (2011) ανφέρεται το εξής: *«Ο έλεγχος των περιεχόμενων βιογενών αμινών στα προϊόντα τροφίμων, θα μειώσουν τον κίνδυνο εμφάνισης προβλημάτων υγείας των καταναλωτών και έτσι θα αυξήσουν τον ανταγωνισμό των βιομηχανιών.»*

### **Άλλες οργανικές αζωτούχες ενώσεις**

Στον οίνο μπορεί να βρεθούν κι άλλες οργανικές ενώσεις που περιέχουν άζωτο όπως η ουρία, νουκλειϊκές βάσεις (όπως η πουρίνη, η πυριμιδίνη), νουκλειϊκά οξέα, αμινο-ζάχαρα (όπως η γλυκοζαμίνη, η γαλακτοζαμίνη) κι άλλα (Vlahou et al., 2022).

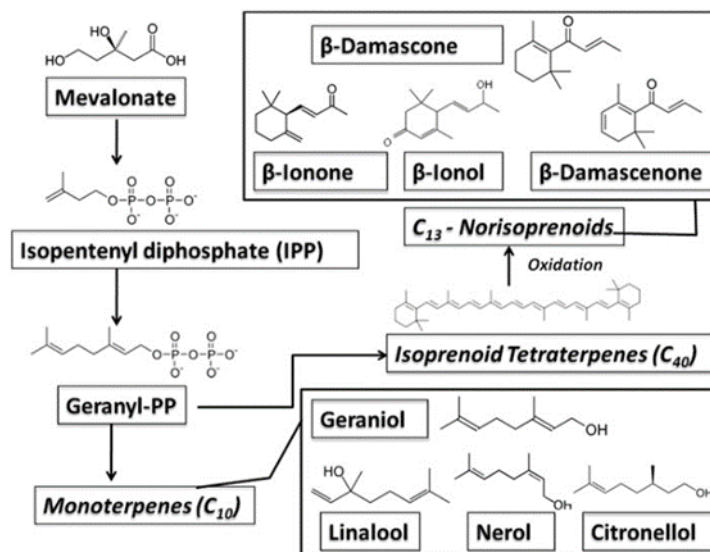
### **1.7) Πτητικές ενώσεις/Άρωμα**

Το άρωμα (όπως και η γεύση) στο κρασί οφείλεται σε ένα πλήθος αντιδράσεων ανάμεσα σε χημικές ενώσεις και αισθητικούς υποδοχείς. Η χημική σύσταση του κρασιού συνδέεται με την πρώτη ύλη που είναι το σταφύλι, τους μικροοργανισμούς που εμπλέκονται στη ζύμωση, τα προϊόντα αυτής και τις συνθήκες αποθήκευσης του. Η οργανοληπτική αξιολόγησή του κρασιού και των αρωμάτων του, ακολουθεί μια συγκεκριμένη σειρά βημάτων. Πρώτα αξιολογείται το χρώμα, στη συνέχεια το μπουκέτο των αρωμάτων του, η γεύση και τέλος η επίγευση (Styger et al., 2011).

#### **1.7.1) Πρωτογενές ή ποικιλιακό άρωμα**

Πρωτογενές άρωμα θεωρείται αυτό του οποίου οι αρωματικές ενώσεις προέρχονται από το σταφύλι (Τσακίρης Αργύρης, 2009). Το άρωμα και η γεύση της κάθε ποικιλίας σταφυλιού είναι μοναδικά παρόλο που η σύσταση των σταφυλιών παρουσιάζει κοινά χαρακτηριστικά. Αυτό συμβαίνει γιατί διαφέρουν τα ποσοστά οι περιεχόμενες χημικές ενώσεις που συνεισφέρουν στο εκάστοτε ποικιλιακό άρωμα (Polášková et al., 2008). Μια κατηγορία τέτοιων ενώσεων είναι τα ισοπρενοειδή μονοτερπένια (όπως η γερανιόλη, η λιναοόλη, η νεροόλη και η κιτρονελλοόλη) που προέρχονται από πρόδρομους μεταβολίτες του ακετυλο-CoA (ακέτυλο συνένζυμο A). Τα ισοπρενοειδή μονοτερπένια είναι υπεύθυνα για το ποικιλιακό άρωμα των κρασιών τύπου Μοσχάτου (Iriti & Faoro, 2006). Να αναφερθεί ότι τα μονοτερπένια βρίσκονται στο σταφύλι ελεύθερα ή ενωμένα με γλυκοσιδωμένους δεσμούς, χωρίς οσμή. Οι δεσμοί αυτοί πιστεύονταν ότι υδρολύονται κατά την αλκοολική ζύμωση από

τα ένζυμα των γλυκοσιδασών κι έτσι απελευθερώνονται ενώσεις που συνεισφέρουν αρωματικά στο κρασί (Palomo et al., 2007). Αποδείχθηκε όμως τελικά ότι οι ζυμομύκητες μέσω του μεταβολισμού τους εμπλέκονται στην συνεισφορά του ποικιλιακού αρώματος με σχηματισμό αρωματικών ενώσεων και όχι μέσω της προαναφερθείσας υδρόλυσης (Loscos et al., 2007). Άλλες αρωματικές ενώσεις που προσδίδουν χαρακτηριστικά αρώματα τροπικών φρούτων όπως για παράδειγμα στην ποικιλία Sauvignon blanc είναι οι θειόλες, που προέρχονται κι αυτές από άοσμες πρόδρομες χημικές ενώσεις. Παραδείγματα αυτών είναι η 4-μέθυλ-4-μερκαπτοπενταν-2-όνη και η 3-μερκαπτο-1-εξανόλη (Swiegers & Pretorius, 2007). Μια ακόμα ομάδα υπεύθυνη για το ποικιλιακό άρωμα είναι τα C<sub>13</sub> -νορισοπρενοειδή, που προέρχονται από οξείδωση των καροτενοειδών. Σε αυτή την ομάδα έντονων αρωματικών ενώσεων είναι η β-ιονόνη με άρωμα βιολέτας, η β-δαμασκηνόνη με άρωμα τριαντάφυλλου και η β-ιονόλη με άρωμα φρούτων και άνθρων (Iriti & Faoro, 2006). Τέλος, στο ποικιλιακό άρωμα συνεισφέρουν τα σεσκιτερπένια με βασικότερο την ροτουντόνη που είναι υπεύθυνη για το ποικιλιακό άρωμα του Shiraz, δηλαδή αρώματα πιπεριού (Siebert et al., 2008; Wood et al., 2008; Styger et al., 2011).



**Εικόνα 4:** Μερικές απο τις βασικότερες πτητικές ενώσεις που σχετίζονται με τα ποικιλιακά αρώματα (Iriti & Faoro, 2006)

### 1.7.2) Δευτερογενές άρωμα

Το δευτερογενές άρωμα σχετίζεται με τη δράση των ζυμομυκήτων καθώς οι ζύμες επηρεάζουν το άρωμα ακολουθώντας διάφορους μηχανισμούς. Μερικοί από τους οποίους είναι η αλκοολική ζύμωση, ο μεταβολισμός των ουδέτερων πρόδρομων χημικών ενώσεων σε αρωματικές, η de novo βιοσύνθεση των αρωματικών ενώσεων, η αλλοίωση εξαιτίας

βακτηριακών προσβολών, η αυτόλυση των ζυμών μετά το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης και άλλοι. Ο βασικότερος από αυτούς είναι η de novo (τα αρώματα που έχουν παραχθεί από ζυμομύκητα και συμμετέχουν σε μια βιολογική διεργασία) βιοσύνθεση των αρωματικών ενώσεων γιατί οι πτητικές ενώσεις που παράγονται κατά την αλκοολική ζύμωση, αποτελούν την πλειοψηφία αυτών που συνεισφέρουν στο τελικό άρωμα (OAV=odor activity value). Πολύ σημαντικό ρόλο σε αυτό έχει το στέλεχος του ζυμομύκητα.

Πολλοί μεταβολίτες που προκύπτουν κατά την αλκοολική ζύμωση, είτε τα προϊόντα είτε τα παραπροϊόντα αυτής επηρεάζουν το άρωμα σημαντικά. Ένα από τα κύρια προϊόντα είναι η αιθανόλη έχει την τάση να περιέχεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στα σύγχρονα κρασιά, διότι εξαιτίας της κλιματικής αλλαγής τα επίπεδα σακχάρων υψηλότερα. Αυτή η αλλαγή έχει αντίκτυπο στην αντίληψη του αρώματος και της γεύσης.

Ένα παραπροϊόν της αλκοολικής ζύμωσης είναι η γλυκερόλη. Είναι γνωστό ότι επηρεάζει την αίσθηση της λιπαρότητας (mouthfeel) στο κρασί και φαίνεται να συσχετίζεται με την ποιότητα των λευκών κρασιών. Επίσης η ακεταλδεΐδη αποτελεί την πρόδρομη ένωση για άλλες όπως η αιθανόλη, όταν βρίσκεται σε χαμηλή συγκέντρωση προσδίδει φρουτώδη αρώματα ενώ σε υψηλότερη ανεπιθύμητα αρώματα μήλου και πρασινάδας (Liu & Pilone, 2000). Από την ακεταλδεΐδη παράγεται το διακετύλιο, μια ένωση που παράγεται από αμφοτέρους ζύμες και βακτήρια (Lachenmeier & Sohnius, 2008). Το διακετύλιο σε χαμηλές συγκεντρώσεις προσδίδει αρώματα φρυγανισμένου ψωμιού, ξηρών καρπών ενώ σε υψηλότερες άρωμα βουτύρου (Romano & Suzzi, 1996).

Πέρα από τα παραπροϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης υπάρχουν κι αυτά από το μεταβολισμό των αμινοξέων. Εκτός από τον ρόλο που έχει η νιτρική σύσταση ως προς την κινητική της αλκοολικής αντίδρασης, επιδρά και στο αρωματικό περιεχόμενο (Hernández-Orte et al., 2005). Οι κύριες ενώσεις που προκύπτουν από αυτό το μεταβολικό μονοπάτι, συνήθως μέσω της αντίδρασης Ehrlich, οι ανώτερες αλκοόλες, τα πτητικά οξέα και εστέρες (Ehrlich, 1904). Παρόλα αυτά υπάρχουν κι άλλοι τρόποι μεταβολισμού αμινοξέων σε αρωματικές ενώσεις, όπως στην περίπτωση του καταβολισμού της μεθειονίνης. Αυτή μετατρέπεται σε θειούχες ενώσεις που αντιδρούν με καρβοξυλικά οξέα και οδηγούν τελικά στον σχηματισμό θειοεστέρων (Perpete et al., 2006). Οι σχηματιζόμενες θειούχες ενώσεις επιδρούν θετικά αλλά και αρνητικά στο οργανοληπτικό αποτέλεσμα του οίνου. Η 3-μερκαπτοεξανόλη για παράδειγμα προσδίδει φρουτώδη άρωμα και γεύση ενώ το υδρόθειο (H<sub>2</sub>S) οσμή κλούβιου αυγού (Swiegers & Pretorius, 2007). Σύμφωνα με τους (Taylor & Jenkins, 1966) το υδρόθειο έχει άμεση σχέση με το στέλεχος του ζυμομύκητα που χρησιμοποιείται.

Η κυρίαρχη ομάδα αρωματικών ενώσεων είναι οι πτητικοί εστέρες που προσδίδουν έναν φρουτώδη χαρακτήρα στον οίνο κι άλλα προϊόντα ζύμωσης (Lilly et al., 2000). Ο πρώτος τρόπος σχηματισμού τους, απουσία κάποιου ενζύμου, περιλαμβάνει την αντίδραση ανάμεσα σε ένα καρβοξυλικό οξύ και αλκοόλη (Lambrechts & Pretorius, 2019). Αυτός ο τρόπος είναι περιορισμένος σε σχέση με τις ενζυμικές αντιδράσεις, εξαιτίας του αργού σχηματισμού του. Οι εστέρες κατηγοριοποιούνται με βάση τη χημική τους σύσταση σε οξικούς εστέρες, σε αιθυλεστέρες, σε αιθυλεστέρες λιπαρών οξέων και διάφορους άλλους. Ξεκινώντας με τους οξικούς εστέρες, αυτοί προέρχονται από αντιδράσεις μεταξύ του συνενζύμου Co-A και λιπαρών οξέων συνεισφέροντας κατά 40 με 50% στο ολικό άρωμα, ειδικά στους νεαρούς οίνους (Duan et al., 2018). Σύμφωνα με τη Vlahou et al., (2022) ο οξικός αιθυλεστέρας για παράδειγμα έχει φρουτώδη αρώματα όπως μπανάνα, αχλάδι και μήλο που όμως σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις γίνεται δυσάρεστος. Οι αιθυλικοί εστέρες των λιπαρών οξέων προσδίδουν ευδιάκριτα αρώματα από φρούτα και άνθη κι έχουν υψηλό δείκτη OAV. Αυτοί δε, με μεσαίου μεγέθους ανθρακική αλυσίδα προσφέρουν στο κρασί ένα ευχάριστο άρωμα (Duan et al., 2018). Η τελική συγκέντρωση των εστέρων συνδέεται με το στέλεχος της ζύμης που χρησιμοποιείται όπως και με άλλους παράγοντες όπως η θερμοκρασία ζύμωσης, το pH και των επιπέδων οξυγόνου (Styger et al., 2011).

Τέλος, μια άλλη πορεία επιρροής στα παραγόμενα αρώματα του οίνου είναι η μηλογαλακτική ζύμωση, δηλαδή η μετατροπή του δικαρβοξυλικού μηλικού οξέος σε μονοκαρβοξυλικό γαλακτικό οξύ και διοξειδίο του άνθρακα. Με αυτόν τον τρόπο έχει αποδειχθεί ότι ενισχύεται το περιεχόμενο αρωμάτων και συγκεκριμένα των φρουτωδών (εξαιτίας των γαλακτικών βακτηρίων) και αρωμάτων βουτύρου, μειώνοντας τα φυτικά και χορτώδη αρώματα (Liu, 2002). Σύμφωνα με τους (Bloem et al., 2006) στις περιπτώσεις ζύμωσης σε δρύινα βαρέλια, με τη μηλογαλακτική ζύμωση ενισχύονται τα αρώματα από το βαρέλι όπως αυτό της βανίλιας.

### **1.7.3) Τριτογενές άρωμα**

Το τριτογενές άρωμα αποτελεί το σύνολο των αρωμάτων που δημιουργούνται κατά την ωρίμανση και την παλαίωση (Τσακίρης Αργύρης, 2009, σελ.470). Κατά τη διάρκεια της παλαίωσης και ωρίμανσης σε βαρέλι, το κρασί υπόκειται σε κάποιες αλλαγές. Μειώνονται τα ποικιλιακά αρώματα κι αυτά που δημιουργήθηκαν κατά τη ζύμωση, ενώ σχηματίζονται νέα.(Lambropoulos & Roussis, 2007; Styger et al., 2011). Επίσης, εκχυλίζονται αρωματικές ενώσεις και ταννίνες από το ξύλο του βαρελιού που προσδίδουν πολυπλοκότητα και πλούσιο άρωμα (Styger et al., 2011). Το ξύλο που χρησιμοποιείται συνήθως είναι η αμερικάνικη δρυς

και η γαλλική των οποίων η σύστασή επηρεάζει το τελικό αποτέλεσμα. Σύμφωνα με τους (Waterhouse & Towey, 1994), η αμερικάνικη δρυς προσδίδει μεγάλη συγκέντρωση cis-λακτονών στο κρασί σε σχέση με τη γαλλική δρυ. Η ποσότητα των ενώσεων που εκχυλίζονται γενικά, συνδέεται με τον ρυθμό απελευθέρωσής τους από το ξύλο και μετατροπής τους μέσω βιοχημικών αντιδράσεων. Για παράδειγμα οι περιερχόμενες αλδεύδες (όπως οι φουρανικές και συγκεκριμένα η φουρφουράλη) εκχυλίζονται σε σύντομο χρονικό διάστημα (τρεις μήνες για να παραμείνουν στο κρασί σε αυτή τη μορφή) ενώ οι φαινολικές αλδεύδες έχουν τη μέγιστη συγκέντρωση στους δώδεκα μήνες (η κυριότερη είναι η βανιλίνη) και είναι σταθερές (Garde-Cerdán & Ancín-Azpilicueta, 2006). Εξαιτίας της οξειδωτικής παλαίωσης που συμβαίνει στο βαρέλι η συγκέντρωση των αλδευδών αυξάνεται (Vlahou et al., 2022). Αντίθετα οι συγκεντρώσεις των αιθυλ-εστέρων και των λιπαρών οξέων με διακλαδισμένη αλυσίδα μειώνονται (Styger et al., 2011), διότι σύμφωνα με τους (Vlahou et al., 2022) πραγματοποιείται υδρόλυση των εστέρων και σχηματισμός άλλων εστέρων και ανώτερων αλκοολών. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ένα πιθανό πρόβλημα που μπορεί να εμφανιστεί κατά την ωρίμανση σε βαρέλι (συνήθως επαναχρησιμοποιούμενο), ο σχηματισμός των αιθυλ-φαινόλων με δυσάρεστη οσμή. Οι αιθυλ-φαινόλες παράγονται από ζυμομύκητες που προσβάλλουν το κρασί μέσω του ξύλου κι αυτοί ανήκουν στα είδη *Brettanomyces* και *Dekkera* (Garde-Cerdán & Ancín-Azpilicueta, 2006).

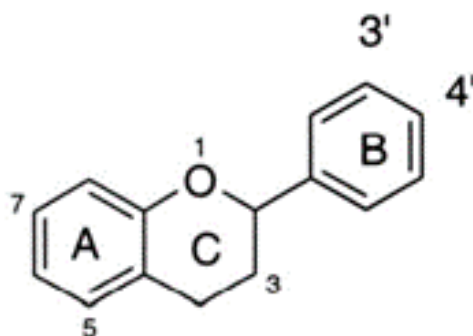
### **1.8) Φαινολικά συστατικά**

Στον οίνο περιέχονται πολυάριθμα φαινολικά συστατικά με τα περισσότερα να προέρχονται από το σταφύλι. Τα συστατικά αυτά κατέχουν σημαντικές λειτουργίες στο κρασί όπως την επίδραση που ασκούν στην αίσθηση του πικρού και του στυφού, στο χρώμα κυρίως των ερυθρών οίνων, τον ρόλο τους ως φυσικό συντηρητικό και απαραίτητο συστατικό για μακρόχρονη παλαίωση. Όταν έρχονται σε επαφή με τον ατμοσφαιρικό αέρα οξειδώνονται τα ίδια και αποκτούν καφετί χρώμα. Τα φαινολικά συστατικά του οίνου περιλαμβάνουν ένα ευρύ φάσμα ενώσεων και για αρχή διαχωρίζονται στα φλαβονοειδή και τα μη φλαβονοειδή. Τα φλαβονοειδή περιλαμβάνουν τις φλαβαν-3-όλες, τις φλαβονόλες και τις ανθοκυανίνες ενώ τα μη φλαβονοειδή περιλαμβάνουν τα υδροξυκινναμωμικά οξέα, τα βενζοϊκά οξέα και τα στυλβένια. Υπολογίζεται ότι σε ένα ποτήρι λευκό κρασί περιέχονται 40 mg φαινολικών συστατικών ενώ σε αντίστοιχο με ερυθρό 200mg. Για αρχή, να γίνει κατανοητό ότι οι απλές φαινόλες αποτελούνται από έναν αρωματικό δακτύλιο και μια ή δύο λειτουργικές ομάδες υδροξυλίου (όπως το καφεϊκό οξύ) και οι πολυφαινόλες περιέχουν στη δομή τους πολλούς

δακτυλίους φαινολών (όπως η κατεχίνη). Να σημειωθεί ότι οι πολύ απλές φαινόλες δε βρίσκονται στον οίνο.

### 1.8.1) Φλαβονοειδή φαινολικά συστατικά

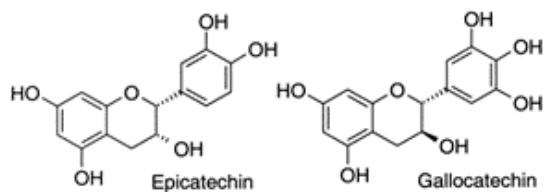
Τα φλαβονοειδή που υπάρχουν στο κρασί εντάσσονται στην κατηγορία των πολυφαινολών και διαθέτουν μια χαρακτηριστική δομή τριών δακτυλίων. Υπάρχει ένα κεντρικό άτομο οξυγόνου, μέρος του πυρανικού δακτυλίου C, ο οποίος ενώνεται με τους αρωματικούς δακτυλίους A και B. Ο ετεροκυκλικός δακτύλιος C έχει πολλές οξειδωτικές καταστάσεις και σε αυτό παίζει ρόλο το είδος των υποκαταστατών του όπως και στον περεταίρω καταμερισμό τους. Πιο συγκεκριμένα, η δημιουργία κορεσμένου δακτυλίου C οδηγεί στο σχηματισμό των φλαβονολών, η υποκατάσταση στον άνθρακα 4 με κετονομάδα στον σχηματισμό των φλαβονών κι όταν έχει τη μορφή αρωματικού δακτυλίου με θετικό φορτίο στον σχηματισμό των ανθοκυανιδινών. Άλλη υποκατάσταση που συμβαίνει είναι αυτή της αλκοόλης και δημιουργούνται οι ενώσεις που καταλήγουν σε -όλη, όπως η φλαβαν-3-όλη.



Εικόνα 5: Δομή Φλαβονοειδών (Waterhouse, 2002)

#### 1.8.1.1) Φλαβανόλες

Οι φλαβανόλες αποτελούν την πιο διαδεδομένη κατηγορία φαινολικών ενώσεων στον οίνο και περιλαμβάνει μονομερείς κατεχίνες, σε μορφή ολιγομερών ή πολυμερών προανθοκυανιδινών που προέρχονται από τα γίγαρτα ή τους φλοιούς. Ονομάζονται και φλαβαν-3-όλες, υποδεικνύοντας τη θέση της αλκοολικής ομάδας (άνθρακας 3). Στα σταφύλια υπάρχουν δύο στεροϊσομερή φλαβαν-3-ολών, η trans μορφή (2R,3S) (+)- κατεχίνη και τη cis μορφή (2R,3R)(-)- επικατεχίνη. Αμφότερες δομές έχουν υποκατασταθεί από την κατεχόλη (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>) στον δακτύλιο B στις θέσεις 3' και 4'. Άλλη υποκατάσταση στο B δακτύλιο είναι η 3'4'5' τριϋδροξυ μορφή, που ονομάζεται γαλλο-κατεχίνη, που δεν έχει βρεθεί σε σημαντικό βαθμό σε αντίθεση με την επιγαλλοκατεχίνη που έχει εντοπιστεί στα γίγαρτα των σταφυλιών.



**Εικόνα 6:** Cis και Trans Φλαβαν-3-όλες (Waterhouse, 2002)

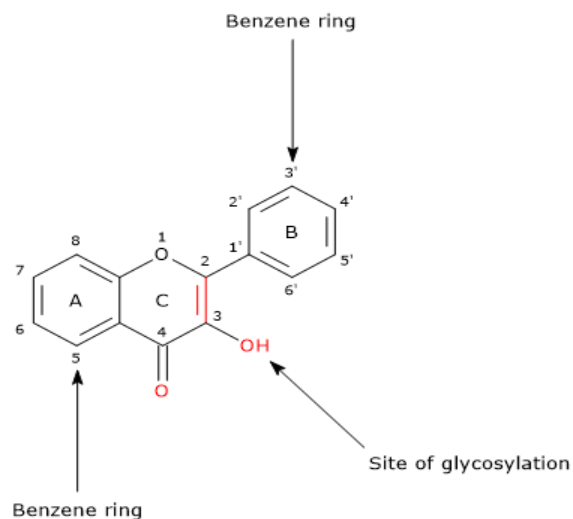
Στον οίνο είναι συνηθισμένο να βρίσκονται γαλλο-εστέρες, όπου το γαλλικό οξύ έχει υποστεί εστεροποίηση στη θέση 3 του δακτυλίου C των επικατεχινών στο γαλλικό εστέρα της επικατεχίνης ή στις επιγαλλοκατεχίνες. Οι κυρίαρχες φλαβαν-3-όλες στα γίγαρτα των σταφυλιών είναι η επικατεχίνη, η κατεχίνη και πολυμερη, στα οποία υπάρχουν μονάδες επικατεχινών και εστεροποιημένων επικατεχινών με γαλλικό οξύ (Geny et al., 2003). Οι γαλλικοί εστέρες της επικατεχίνης βρίσκονται σε χαμηλή περιεκτικότητα στους λευκούς οίνους συγκριτικά με τους ερυθρούς και σπανίως εκχυλίζονται από το βαρέλι (Ronald S. Jackson, 2008). Τέλος, από τις μονομερείς φλαβονόλες, μόνο τέσσερις μπορεί να βρεθούν στον οίνο και είναι συνήθως κατεχίνες, με συγκέντρωση 40-120 mg/L. Οι μονομερείς κατεχίνες έχουν πικρή και στυφή γεύση (Waterhouse, 2002).

### 1.8.1.2) Φλαβανόνες

Η μόνη διαφορά των φλαβανονών από τις φλαβονόλες είναι η απουσία του υδροξυλίου (-OH) στη 3 θέση και τα παράγωγά τους αποτελούν συστατικά του ξύλου των βαρελιών (δρύινο). Τα τελευταία μπορούν να βρεθούν στους οίνους λόγω της εκχύλισης που συμβαίνει κατά την ωρίμανση (Κουράκου, 1998; Vlahou et al., 2022).

### 1.8.1.3) Φλαβονόλες

Οι φλαβονόλες (όπως η quercetin) είναι μια κατηγορία ενώσεων που βρίσκονται σε γλυκοσιδιωμένη μορφή και εντοπίζονται στον φλοιό των σταφυλιών.



**Εικόνα 7:** Φλαβονόλες (3)

Στον άνθρακα 3 μπορεί να συνδεθεί ένας υδροξυ-υποκαταστάτης (Vlahou et al., 2022; Martens & Mithöfer, 2005). Βρίσκονται στη μικρότερη ποσότητα σε σχέση με τα υπόλοιπα φλαβονοειδή του κρασιού, όμως σε μεγαλύτερη στους ερυθρούς σε σχέση με τους λευκούς οίνους.

Υπάρχουν τρεις μορφές απλών φλαβονοειδών-αγλυκονών στα σταφύλια, η quercetin, η myricetin (3'4'5' trihydroxy) και η kaempferol (4' hydroxy). Επίσης, οι φλαβονόλες έχουν αντηλιακή προστασία κι αυξάνονται σε ποσότητα όσο εκτίθενται στον ήλιο. Η έρευνα που διεξήχθη με βάση την ποικιλία Pinot noir απέδειξε ότι η έκθεση στον ήλιο αύξησε σε μεγάλο βαθμό το σύνολο των φλαβονολών, όπως συνέβη και με την ποικιλία Cabernet Sauvignon. Σύμφωνα με αυτά τα αποτελέσματα οι φλαβονόλες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες της έκθεσης των σταφυλιών στον ήλιο κι έμμεσα της ποιότητάς τους (Waterhouse, 2002).

#### **1.8.1.4) Ταννίνες**

Οι ταννίνες είναι μίγματα φαινολικών ενώσεων μεγάλου μοριακού βάρους. Κατηγοριοποιούνται σε συμπυκνωμένες ταννίνες, μίγματα δηλαδή πολυμερών των φλαβονοειδών και τις υδρολυόμενες ταννίνες που αποτελούν μίγματα γαλλοτανινών ή ελλαγικών ταννινών (Waterhouse, 2002). Συνεισφέρουν οργανοληπτικά στον οίνο. Για παράδειγμα, οι μονομερείς φλαβαν-3-όλες είναι υπεύθυνες για την πικρή γεύση, οι πιο πολύπλοκες ταννίνες (δηλαδή ενωμένες με άλλες ενώσεις) έχουν στυφή αίσθηση ενώ τα πολυμερή τους συνδυάζουν και τα δύο χαρακτηριστικά (Jackson, 2009).



### **Υδρολυόμενες ταννίνες**

Οι υδρολυόμενες ταννίνες που υπάρχουν στο κρασί προέρχονται από το δρύινο βαρέλι και αποτελούνται από εστέρες γαλλικών ή ελλαγικών οξέων με σάκχαρα όπως η γλυκόζη. Χωρίζονται περαιτέρω λοιπόν σε γαλλοταννίνες και ελλαγιταννίνες, ανάλογα με το οξύ που περιέχουν (Waterhouse, 2002). Οι οίνοι που περιέχουν γαλλοταννίνες ακόμα και συμπυκνωμένες ταννίνες, όσο παλαιώνουν υπόκεινται σε υδρόλυση του γαλλικού οξέος (καθώς είναι ευδιάλυτο) γι' αυτό και εντοπίζεται σε όλους τους παλαιωμένους οίνους (Waterhouse, 2002). Οι πιο δημοφιλείς υδρολυόμενες ταννίνες είναι η βεσκαλαγίνη και η κασταλαγίνη, οι οποίες υδρολύονται σε μικρότερου μοριακού βάρους ενώσεις (βισκαλίνη και κασταλίνη αντιστοίχως) (Ribereau-Gayon et al., 2006). Οι ελλιγιταννίνες διαφέρουν ως προς τη σύστασή τους ανάλογα με το είδος δρυός που προέρχονται (αμερικάνικο ή ευρωπαϊκό) και παρεμποδίζουν την οξειδωση των φαινολικών ενώσεων του οίνου γιατί απορροφούν γρήγορα το διαλυμένο οξυγόνο (Vlahou et al., 2022; Vivas & Glories, 1996). Όσο ο οίνος ωριμάζει σε δρύινο βαρέλι, περιέχει διαλυμένες στο αλκοόλ ελλαγιταννίνες όπου μέρος τους, υδρολύονται σε ελλαγικό οξύ ή αποσυντίθενται. Υπάρχουν κι αδιάλυτες ελλαγιταννίνες οι οποίες βρίσκονται στο ξύλο δρυός και υδρολύονται, σχηματίζοντας ελλαγικό οξύ που καταλήγει στο κρασί (Viriot et al., 1993; Amarowicz & Janiak, 2018).

### **Συμπυκνωμένες ταννίνες**

Οι συμπυκνωμένες ταννίνες γνωστές κι ως προανθοκυανιδίνες είναι ουσιαστικά πολυμερή δύο ή περισσότερων φλαβαν-3-ολών, που βρίσκονται στο σταφύλι. Βρίσκονται σε αφθονία σε διάφορα μέρη του όπως στα γιγάρτα, το φλοιό και τα στέμφυλα κι εκχυλίζονται στον οίνο κατά τη διάρκεια της οινοποίησης (Moreno-Arribas & Polo, 2009). Οι ταννίνες που βρίσκονται στους φλοιούς έχουν μεγαλύτερο βαθμό πολυμερισμού συγκριτικά με αυτές των γιγάρτων που έχουν μικρό βαθμό πολυμερισμού, με έντονη στυφή αίσθηση. Απο χημική σκοπιά, οι ταννίνες στον φλοιό του σταφυλιού έχουν περισσότερες επιγαλλοκατεχίνες ενώ αυτές των γιγάρτων γαλλικού εστέρα της επιγαλλοκατεχίνης (Vlahou et al., 2022; Cheynier, 2006). Στους ερυθρούς οίνους έχουν βρεθεί συγκεντρώσεις συμπυκνωμένων ταννινών έως και 4 g/l και ο πολυμερισμός τους τροποποιείται κατά τη διάρκεια της παλαίωσης του οίνου. Ο πολυμερισμός συμβαίνει ως εξής: δημιουργείται ανθρακικός δεσμός με τον άνθρακα 4 της μιας φλαβαν-3-όλης με τον άνθρακα 6 ή 8 κάποιας άλλης μονάδας (ταννίνη, πρωτεΐνη ή ανθοκυάνη).

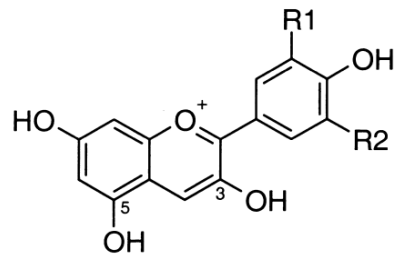
Υπάρχει μια μερίδα επιστημόνων που υποστηρίζει ότι η αντίληψη της στυφάδας των συμπυκνωμένων ταννινών αυξάνεται όσο μεγαλύτερες είναι σε μέγεθος (βαθμό

πολυμερισμού περίπου 70) (Cheynier et. Al. 2006; Vidal et. Al. 2003a), ενώ μια άλλη που πιστεύει ότι δεν είναι αρκετά διαλυτές για να είναι στυφές (Lea 1990)(Moreno-Arribas & Polo, 2009). Σύμφωνα με τους Ribereau-Gayon et al. (2006), υπάρχει συμφωνία στην αντίληψη της αύξησης της στυπτικότητας με την αύξηση του βαθμού πολυμερισμού των συμπυκνωμένων ταννινών, ενώ η πικρή γεύση σχετίζεται με την τις ταννίνες χαμηλού μοριακού βάρους (συνήθως μονομερή ταννινών) (Vlahou et al., 2022).

Σε πρόσφατες μελέτες που διεξήχθησαν αποδείχθηκε ότι οι συμπυκνωμένες ταννίνες των ερυθρών οίνων αλληλεπιδρούν σε διαφορετικό βαθμό, ανάλογα με τη συγκέντρωση των ταννινών και των πρωτεϊνών, που αλληλεπιδρούν με τις ταννίνες ανάλογα με τον βαθμό πολυμερισμού τους (Chira et al., 2012). Οι συμπυκνωμένες ταννίνες επιδρούν στο σώμα του οίνου κι αυξάνονται όσο παλαιώνει ο οίνος. Τα πολυμερή που σχηματίζονται κατά την παλαίωση του οίνου είναι πιθανό να περιέχουν χημικές ενώσεις όπως νερό, πολυσακχαρίτες και πεπτίδια κι έτσι βελτιώνεται ο οίνος οργανοληπτικά (Vlahou et al., 2022).

#### **1.8.1.5) Ανθοκυάνες**

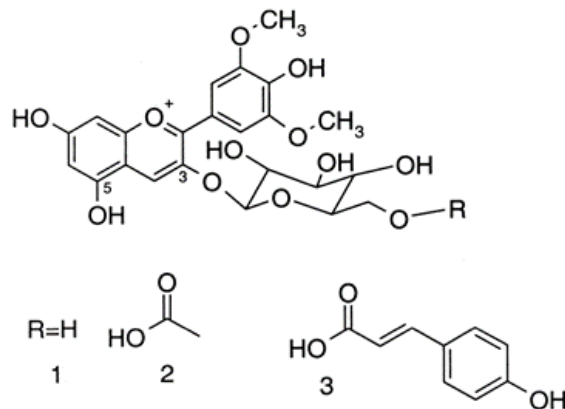
Ανθοκυάνες είναι οι φαινόλες με ερυθρό χρώμα (όπως για παράδειγμα η malvidin-3-glucoside), οι οποίες βρίσκονται κυρίως στον φλοιό των σταφυλιών ερυθρών ποικιλιών, όπως και σε άλλα φυτά και τρόφιμα (Waterhouse,2002). Ελληνικές ποικιλίες που αποδείχθηκε να έχουν τη μεγαλύτερη συμπύκωση ολικών ανθοκυανών είναι οι Βερτζαμί, Αγιωργίτικο και Μανδηλαριά (Vlahou et. al., (2020), Kallithraka, et al., (2006). Ως προς τη χημική δομή των ανθοκυανών ,πρόκειται για ένα π-σύστημα δακτυλίων. Οι δακτύλιοι A και C συμμετέχουν στη ροή 10 ηλεκτρονίων, με μια μικρή συνεισφορά από το δακτύλιο B όπως φαίνεται στην εικόνα 6. Όταν αυτή η ηλεκτρονιακή ροή διαταραχθεί, τότε χάνεται το χρώμα. Ως ανθοκυανιδίνη χαρακτηρίζεται το σύστημα των δακτυλίων του φλαβονοειδούς. Στον οίνο είναι δύσκολο να βρεθούν ανθοκυανιδίνες γιατί πρόκειται για ασταθείς ενώσεις, υπάρχουν όμως οι εξής: κυανιδίνη, πεονιδίνη, δελφινιδίνη, πετουνιδίνη, μαλβιδίνη (Waterhouse, 2002). Η μαλβιδίνη είναι η πιο δημοφιλής αναθοκυανιδίνη στους ερυθρούς οίνους, καθώς κυμαίνεται από 50% (Sangiovese) έως 90% (Grenache) (Vlahou et. al.,(2020), Ribéreau - Gayon et al., (2006).



R1, R2  
 H, OH; cyanidin  
 H, OCH<sub>3</sub>; peonidin  
 OH, OH; delphinidin  
 OH, OCH<sub>3</sub>; petunidin  
 OCH<sub>3</sub>, OCH<sub>3</sub>; malvidin

**Εικόνα 8:** Ανθοκυανιδίνες (Waterhouse, 2002)

Οι γλυκοσιδιωμένες ανθοκυάνες ονομάζονται ανοθοκυανίνες και στο είδος *Vitis Vinifera* εντοπίζεται μόνο αυτές που σχηματίζουν γλυκοσιδικό δεσμό στη θέση 3, ενώ στα αμερικάνικα είδη στις θέσεις 3 και 5.



**Εικόνα 9:** Ανθοκυανίνες (Waterhouse, 2002)

Τέλος, οι μορφές και οι ποσότητες των ανθοκυανών στον οίνο ποικίλλουν και επηρεάζουν το χρώμα του. Ο δακτύλιος C είναι ηλεκτρονιόφιλος και αντιδρά με νουκλεόφιλες ενώσεις όπως το νερό (η οποία αντίδραση εξαρτάται από το pH) και το διοξείδιο του θείου. Δηλαδή σε χαμηλό pH (τιμή μικρότερη από 1) επικρατεί η ερυθρή μορφή του φλαβυλίου. Σε λίγο μεγαλύτερο pH επικρατεί η άχρωμη μορφή της ψευδοβάσης (pKa=2,7), ενώ σε υψηλότερες τιμές pH εμφανίζεται μια μορφή κινόνης με βιολετί χρώμα αλλά σε μικρή ποσότητα (pKa=4,7).

### **1.8.2) Μη Φλαβονοειδή συστατικά**

Τα μη φλαβονοειδή συστατικά είναι μέρος των πολυφαινόλων, που έχουν όμως πιο απλή δομή σε σχέση με τα φλαβονοειδή. Στην ομάδα αυτή εντάσσονται τα φαινολικά οξέα( υδροξυκινναμωμικά, υδροξυβενζοϊκά) και τα στυλβένια (Visioli et al., 2020; Garrido & Borges, 2011). Αυτές οι ομάδες συνολικά διαθέτουν μια μέση συγκέντρωση των 60 με 566 mg/l στους ερυθρούς οίνους (Gutiérrez-Escobar et al., 2021; Castaldo et al., 2019).

#### **1.8.2.1) Στυλβένια**

Τα στυλβένια βρίσκονται σε μικρό αριθμό στον οίνο με κυριότερο εκπρόσωπό τους τη ρεσβερατρόλη. Η παραγωγή της οφείλεται στην επίδραση του *Botrytis* ή άλλων μυκητιολογικών προσβολών. Υπάρχουν δύο ισομέρη της ρεσβερατρόλης, το *cis* και *trans* σε ελεύθερη και γλυκοσιδιωμένη μορφή στον οίνο, ενώ στο σταφύλι δεν υπάρχει το *cis*. Εντοπίζεται κυρίως στον φλοιό της ράγας του σταφυλιού, με μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στους παραγόμενους ερυθρούς οίνους (συγκέντρωση περίπου 7 mg/l), ενδιάμεσες στους ροζέ (2mg/l) και πολύ μικρότερες στους λευκούς (0,5 mg/l). Να τονιστεί ότι έχει σημαντικότερες ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία όπως μείωση των καρδιακών παθήσεων και της εμφάνισης καρκίνου. (Waterhouse,2002). Από έρευνα που μελετήθηκαν 29 ελληνικές γηγενείς ποικιλίες, η Μανδηλαριά βρέθηκε να έχει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση σε *trans*-ρεσβερατρόλη (Vlahou et al., 2022, Kallithraka et al., 2001).

#### **1.8.2.2) Φαινολικά Οξέα**

Τα φαινολικά οξέα αποτελούν μια υποομάδα των φαινολικών ενώσεων, που διαθέτουν έστω μια λειτουργία των καρβοξυλικών οξέων. Σε αυτά τα οργανικά οξέα ανήκουν τα υδροξυκινναμωμικά και τα υδροξυβενζοϊκά οξέα. Παρόλο που ο βασικός ανθρακικός σκελετός παραμένει ίδιος, υπάρχει ποικιλομορφία εξαιτίας των διαφορετικών θέσεων των υδροξυλομάδων στον αρωματικό δακτύλιο. (Robbins, 2003). Οι συγκεντρώσεις των φαινολικών οξέων κυμαίνονται στα 100 με 200 mg/l στους ερυθρούς οίνους και 10 με 20 mg/l στους λευκούς. Κάποια από τα βενζοϊκά οξέα έχουν βρεθεί σε ίχνη όπως το σαλικυλικό οξύ (ορθοϋδροξυβενζοϊκό οξύ) και το γεντιστικό οξύ (2',5'διϋδροξυβενζοϊκό οξύ), ενώ έχουν ταυτοποιηθεί περίπου επτά σε αριθμό (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>). Στα σταφύλια συνήθως βρίσκονται σε γλυκοσιδιωμένη μορφή που ελευθερώνονται με υδρόλυση σε όξινες συνθήκες. Οι ελεύθερες μορφές τους συνήθως βρίσκονται στους ερυθρούς οίνους εξαιτίας της υδρόλυσης που λαμβάνει χώρα και της διάσπασης σύνθετων ενώσεων όπως οι ανθοκυάνες λόγω θερμότητας (Galvin, 1993;Ribéreau-Gayon et al., 2005).

Τα κινναμωμικά οξέα (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>) βρίσκονται στα σταφύλια και τους παραγόμενους οίνους . Συνήθως εντοπίζονται σε εστεροποιημένη μορφή με τρυγικό οξύ, ενώ ανιχνεύονται σε

χαμηλές συγκεντρώσεις στην ελεύθερη μορφή τους (Ribéreau-Gayon et al., 2005). Οι εστέρες καφεϊκού οξέος και του κουμαρικού οξέος με τρυγικό αποτελούν τα πιο ευοξειδωτα συστατικά του γλεύκος (Cheynier et al., 1989a, 1989b; Ribéreau-Gayon et al., 2005).

Τα φαινολικά οξέα είναι άχρωμα σε αλκοολικό περιβάλλον και αποκτούν κίτρινο χρώμα λόγω οξειδωσης. Δεν έχουν ιδιαίτερη γεύση ή οσμή, όμως αποτελούν τις πρόδρομες ενώσεις των αρωματικών φαινολών που παράγονται υπο την επίδραση μικροοργανισμών όπως ο μύκητας *Brettanomyces* ή βακτήρια. Για παράδειγμα, σε ερυθρούς οίνους εντοπίζονται οι αιθυλ-φαινόλες και οι αιθυλ- γουαϊακόλες, ενώ στους λευκούς οίνους οι βινυλ-φαινόλες και οι παραγόμενες βινυλ- γουαϊακόλες. Όλες αυτές οι ενώσεις δημιουργούνται με την αποσύνθεση του p-κουμαρικού οξέος και του φερουλικού (Chatonnet, 1995; Ribereau-gayon et al., 2020).

#### **1.8.2.3) Βενζοϊκά Οξέα**

Τα βενζοϊκά οξέα βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις στους νεαρούς οίνους και προέρχονται από την υδρόλυση γαλλοεστέρων των υδρολυόμενων και συμπυκνωμένων ταννινών. Το γαλλικό οξύ για παράδειγμα, ανιχνεύεται σε παλαιωμένους κόκκινους οίνους με χρήση χρωματογραφίας, δηλαδή σταθεροποιείται κατά τη διάρκεια της παλαίωσης. Περιέχεται σε συγκέντρωση 70 mg/l στους ερυθρούς και περίπου 10 mg/l στους λευκούς οίνους.

#### **1.8.2.4) Υδροξυκιναμωμικά οξέα**

Τα υδροξυκιναμωμικά οξέα είναι φαινολικές ενώσεις οι οποίες κυριαρχούν στο γλεύκος και στους λευκούς οίνους. Είναι οι πρώτες ενώσεις που υπόκεινται σε οξειδωση και ξεκινούν το καφέτιασμα (browning) στον οίνο. Τα πιο κοινά είναι το κουμαρικό, φερουλικό και καφεϊκό οξύ που όμως δεν ανιχνεύονται στο σταφύλι ελεύθερα. Μπορούν να βρεθούν σε εστεροποιημένη μορφή με τρυγικό οξύ που χρησιμοποιούνται οι αντίστοιχες ονομασίες χάριν διευκόλυνσης p-κουταρικό, φερταρικό και καφαρικό οξύ. Στις υδροαλκολικές συνθήκες του οίνου υδρολύονται απελευθερώνοντας τις απλούστερες μορφές που κάποιες δημιουργούν δεσμούς με την αιθανόλη. Αξιολογώντας τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των υδροξυκιναμωμικών οξέων και των αντίστοιχων εστέρων τους στον οίνο, δεν εμφανίζουν πικρή ή στυφή γεύση (Waterhouse, 2002).

## 2) Οξείδωση οίνων

Η οξείδωση μιας οργανικής ένωσης εξηγείται ως μια αντίδραση όπου ελαττώνονται τα διαθέσιμα ηλεκτρόνια του άνθρακα της ένωσης αυτής. Κάτι τέτοιο συμβαίνει γιατί δημιουργούνται νέοι δεσμοί του άνθρακα με πιο ηλεκτραρνητικά άτομα όπως το οξυγόνο, το άζωτο ή κάποιο αλογόνο ή διασπώνται δεσμοί με πιο ηλεκτροθετικά άτομα όπως το υδρογόνο. Αντιστοίχως αναγωγή θεωρείται η αύξηση των διαθέσιμων ηλεκτρονίων του άνθρακα. Το γεγονός αυτό προκύπτει από τη διάσπαση των δεσμών μεταξύ του άνθρακα και ηλεκτραρνητικότερων ατόμων ή από τη δημιουργία δεσμών με ηλεκτροθετικότερα άτομα (John McMurry, 2012). Αρχικά, στο κρασί αποτελεί ένα πολύπλοκο μείγμα νερού, αιθανόλης, οργανικών και ανοργανων ενώσεων. Πολλές οργανικές ενώσεις του συμμετέχουν σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις είτε κατά την παραγωγή του είτε κατά την αποθήκευσή του (Nenadis & Paraskevoudou, 2016).

Οξειδοαναγωγική αντίδραση ονομάζεται η αντίδραση κατά την οποία γίνεται μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ ενώσεων, όπου τα άτομα αυτών των ενώσεων υπόκεινται αλλαγή του αριθμού οξείδωσής τους. Ως αριθμό οξείδωσης ορίζεται το πραγματικό ηλεκτρικό φορτίο των ατόμων (μονοατομικά ιόντα) ή το υποθετικό ηλεκτρικό φορτίο τους που υπολογίζεται με μαθηματικές πράξεις (Gammon & Ebbing, 1999). Όσο αναφορά την αντίδραση της οξείδωσης, αυτή σχετίζεται με την ενεργοποίηση του μοριακού οξυγόνου δηλαδή δημιουργούνται οι δραστικές μορφές ROS (Vlahou et al., 2022). Γενικώς οι μορφές ROS (Reactive oxygen species) περιγράφουν τα είδη που έχουν παραχθεί από το οξυγόνο όπου είναι είτε ρίζες οξυγόνου, είτε ενώσεις που εύκολα οξειδώνουν ή μετατρέπονται ρε ρίζες (Cos et al., 2004; Halliwell & Gutteridge, 2015). Πιο συγκεκριμένα στον οίνο, οι δραστικές μορφές ROS παράγονται από τη βασική κατάσταση του οξυγόνου (singlet form) παρουσία καταλύτη (σιδήρου) καθώς δεν είναι σύνηθες να συμβεί στο περιβάλλον του κρασιού απουσία φωτός (Waterhouse & Laurie, 2006). Έχουν βλαβερή δράση για τον ανθρώπινο οργανισμό καθώς οδηγούν σε ασθένειες όπως καρκίνο, καρδιαγγειακές και νευροεκφυλιστικές διαταραχές και γήρανση (Rizwan Ahmad & Ahtesham Hussain, 2022). Επίσης οι μορφές αυτές συντελούν από άποψη χημείας στη δημιουργία άλλων πιο δραστικών ενώσεων, όπως για παράδειγμα το υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) και τις ρίζες υδροξειδίου ( $\cdot OH$ ). Βαθμιδωτά στη συνέχεια παράγονται δραστικές ελεύθερες ρίζες οι οποίες έχουν μικρή διάρκεια ζωής σύμφωνα με τους Waterhouse et al. και με τις οποίες αντιδρούν οι πολυφαινόλες που βρίσκονται στον οίνο (Waterhouse & Laurie, 2006; Vlahou et al., 2022). Τα νέα προϊόντα της αντίδρασης πολυφαινολών και ελεύθερων ριζών παρουσία

του ενζύμου της πολυφαινολοξειδάσης, είναι οι κινόνες. Αυτές με τη σειρά τους συμμετέχουν είτε σε αντιδράσεις συμπύκνωσης προς αδιάλυτες χρωστικές ενώσεις καφέ χρώματος (σύμφωνα με τους Nagel & Graber αυτή η διεργασία ορίζεται ως browning) είτε σε αντιδράσεις πολυμερισμού με πρωτεΐνες (Martinez et al., 1995; Friedman, 1996; Karbowiak et al., 2009).

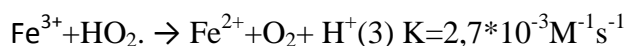
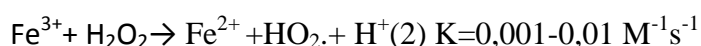
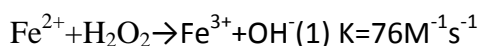
Αυτές οι αντιδράσεις είναι ενζυμικές (Nagler & Grabber, 1988) ή μη ενζυμικές (Cilliers & Singleton, 1990). Οι ενζυμικές αντιδράσεις οξειδωσης συνήθως λαμβάνουν χώρα στην αρχή της οينوποιητικής διαδικασίας, ενώ οι αντίστοιχες μη ενζυμικές μετά την αλκοολική ζύμωση (Singleton, V.L. et al., 1976). Σύμφωνα με τους Kallithraka et al. (2009) εξίσου ενζυμικές και μη αντιδράσεις συμμετέχουν στην τροποποίηση της φαινολικής σύστασης (Vlahou et al., 2022).

### **2.1) Αντιδράσεις αμαύρωσης (browning reactions)**

Οι αντιδράσεις αμαύρωσης ή καφετιάσματος αποτελούν μέρος της πορείας αποικοδόμησης η οποία λαμβάνει χώρα στα προϊόντα της φύσης. Όταν αυτά με τη σειρά τους οξειδωθούν, σχηματίζονται ενδιάμεσα προϊόντα δραστικά τα οποία ακολούθως πολυμερίζονται. Τελικά, σχηματίζουν ουσίες σκοτεινού χρώματος (αμαύρωση). Αυτές οι αντιδράσεις αμαύρωσης των τροφίμων, κατηγοριοποιούνται ανάλογα με τις αντιδράσεις που πραγματοποιούνται στα πρώτα στάδια της αποικοδόμησης ή ανάλογα με τον καταλύτη των αντιδράσεων (είτε ενζυμικών είτε όχι). Οι αντιδράσεις αμαύρωσης λοιπόν στα τρόφιμα είναι αυτές της οξειδωτικής, της μη οξειδωτικής αμαύρωσης, της καραμελοποίησης και της αντίδρασης σακχάρων με αμίνες (αντίδραση Maillard) (E.K. Βουνδούρη & Μ.Γ. Κοντομηνά, 2015).

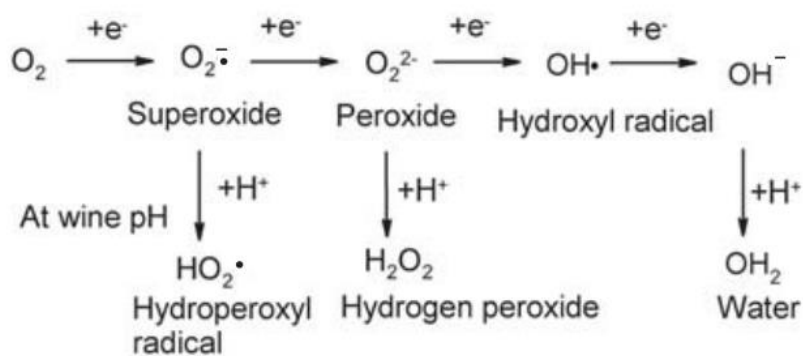
### **2.2) Αντίδραση Fenton**

Αντίδραση Fenton χρησιμοποιείται ευρέως όπως για παράδειγμα την αποικοδόμηση επικίνδυνων ρύπων, έχει άμεση απόδοση, είναι μια περιβαλλοντικά φιλική διαδικασία και απλή σε λειτουργία (Masombocon et. al., 2009; Neyens and Bayens, 2003). Στην αντίδραση αυτή οι αναγωγικές ενώσεις είναι αποτελεσματικές συμβάλλοντας στην παραγωγή ριζών υδροξυλίου OH, επιταχύνοντας έτσι την αντιοξειδωτική πορεία από Fe<sup>3+</sup> σε Fe<sup>2+</sup>. Ο ρόλος των διαφόρων αντιοξειδωτικών στην αντίδραση αυτή δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως. Είναι γνωστό ότι η ρίζα υδροξυλίου είναι το πρωταρχικό παραγόμενο οξειδωτικό (Pignatello et. al., 2006). Οι αλυσιδωτές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα είναι οι ακόλουθες (Neyens and Bayens, 2003; Luo et. al., 2016; Hou et. al., 2016):



### 2.3) Χημική οξείδωση

Κυρίως η οξείδωση στο κρασί όταν είναι υπερβολικά μακρόχρονη δεν συνεισφέρει θετικά στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του, ενώ σε άλλες περιπτώσεις ύπαρξης μικρής ποσότητας οξυγόνου βοηθούν στην ανάδειξη του κρασιού. Όπως προαναφέρθηκε το διατομικό οξυγόνο έχει μειωμένη ικανότητα αντίδρασης με τις φαινολικές και οργανικές ενώσεις στο pH του οίνου [εισαγωγική παράγραφος Β] γι' αυτό το λόγο δημιουργούνται οι δραστικές μορφές ROS. Αυτές οι μορφές οξυγόνου υποδεικνύουν την αρχή μιας συνεχούς πορείας αντιδράσεων αναγωγής και μεταφοράς ηλεκτρονίων (Waterhouse & Laurie, 2006; Vlahou et. al., 2022) (**Εικόνα 10**). Αρχικά από τη μεταφορά του πρώτου ηλεκτρονίου σχηματίζονται ιόντα υπεροξειδίου ( $O_2^{\bullet-}$ ), που στις συνθήκες pH του κρασιού βρίσκονται ως ρίζες υπεροξειδίου ( $\bullet OOH$ ). Για να φτάσει αυτό το στάδιο εις πέρας χρειάζεται καταλύτης κάποιου μετάλλου πιθανόν, όπως ο δισθενής σίδηρος ή ο χαλκός. Ακολούθως, θα πραγματοποιηθεί η μεταφορά δεύτερου ηλεκτρονίου και θα δημιουργηθεί με αυτόν τον τρόπο υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) (Waterhouse & Laurie, 2006) και μέσω της αντίδρασης του υπεροξειδίου του υδρογόνου και των ιόντων σιδήρου (αντίδραση Fenton) έχουμε μείωση ενός ηλεκτρονίου. Δημιουργείται λοιπόν ένας ισχυρότερος οξειδωτικός παράγοντας που είναι η ρίζα υδροξυλίου ( $\bullet OH$ ) (Green and Hill, 1984; Boulton, 2003; Danilewicz, 2003; Waterhouse & Laurie, 2006).



**Εικόνα 10:** Αντιδράσεις αναγωγής του οξυγόνου (Waterhouse & Laurie, 2006; Vlahou et al., 2022)

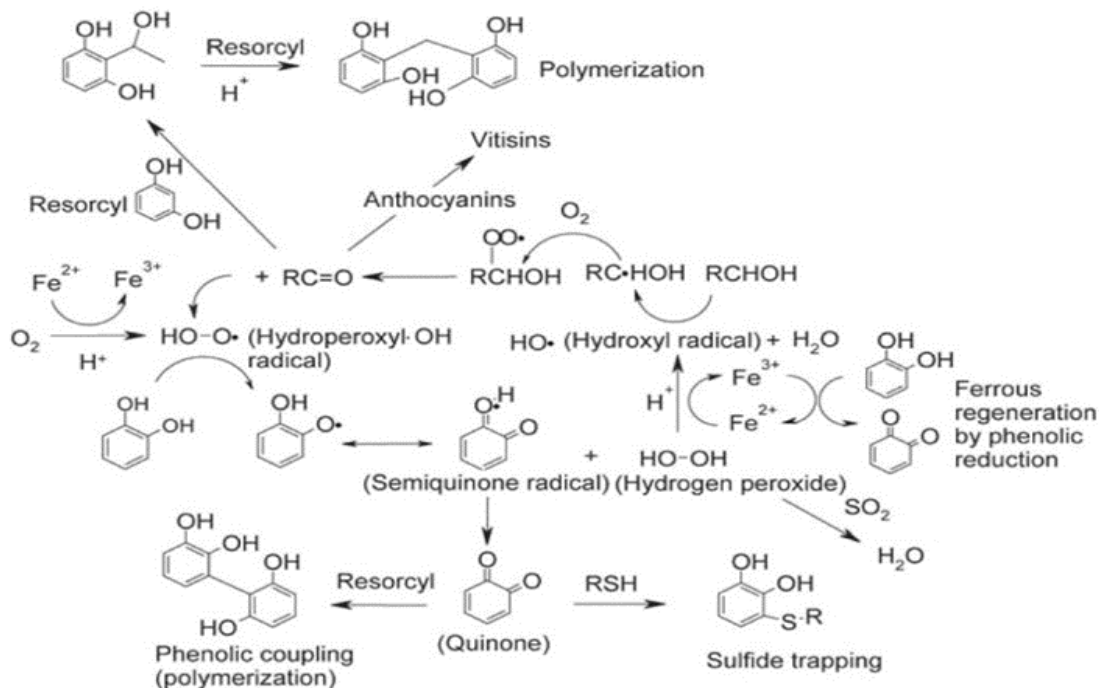
Αυτές οι ρίζες αντλούν πρωτόνια ( $H^+$ ) από διάφορες ενώσεις του οίνου που λειτουργούν ως υποστρώματα. Στην αρχή, πραγματοποιείται οξείδωση των φαινολικών και αρχίζει μια αλληλουχία από οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις. Τα προϊόντα των αντιδράσεων της οξείδωσης πολυφαινολών, που είναι οι ο-κινόνες, μέσω πολυμερισμού σχηματίζουν ενώσεις κίτρινου-καστανού χρώματος στους οίνους (browning) (Waterhouse & Laurie, 2006; Vlahou et al., 2022).



Μια κατεργασία που μπορεί να συμβάλει στην αντιμετώπιση και των δύο τύπων καφετιάσματος είναι η χρήση PVPP ή άλλων διαυγαστικών μέσων όπως ο ενεργός άνθρακας, ή η χιτοζάνη στο τέλος της αλκοολικής ζύμωσης που απομακρύνει τις πολυφαινόλες (Karbowiak et al., 2009). Επίσης τα κυτταρικά τοιχώματα των ζυμών απορροφούν τις οξειδωμένες ενώσεις ενώ έχει βρεθεί πως η παραμονή του κρασιού με τις λάσπες βοηθά στην κατανάλωση του οξυγόνου και δρα προστευτικά για τα ευοξειδωτα συστατικά του οίνου (Karbowiak et al., 2009; Merida et al., 2005).

#### **2.4) Χημική Οξείδωση και προϊόντα**

Τα περιεχόμενα φαινολικά συστατικά του κρασιού, αντιδρούν με τη ρίζα του υδροξυλίου όπου η τελευταία, αφαιρεί ένα πρωτόνιο από τα φαινολικά. Οι φαινολικές ενώσεις οι οποίες είναι πιο εύκολο να οξειδωθούν στις συνθήκες του οίνου είναι το καφεϊκό οξύ, η επικατεχίνη, η κατεχίνη, ο γαλλικός εστέρας της επικατεχίνης, οι προανθοκυανιδίνες, το γαλλικό οξύ, η κερκετίνη και οι υδρολυόμενες ταννίνες. Οι ημι-κινονικές ρίζες που δημιουργούνται μέσω των αντιδράσεων οξείδωσης σταθεροποιούνται με ένα επιπλέον άτομο οξυγόνου (Waterhouse & Laurie, 2006α, Vlahou et.al., 2022). Αντίθετα, οι μονοφαινόλες δεν μπορούν να οξειδωθούν εύκολα (Waterhouse & Laurie, 2006). Είναι αλήθεια ότι τα πολυμερή και ολιγομερή φαινολικά (συμπυκνωμένες ταννίνες, προκυανιδίνες), αντιδρούν με παραπλήσιο τρόπο με τις ρίζες υδροξυλίου, συγκριτικά με τα μονομερή συστατικά φαινολικής προέλευσης (Lotito et al., 2000). Σύμφωνα με τους Waterhouse και Laurie (2006), στο κρασί η ομάδα της κατεχόλης των φαινολών φαίνεται ότι αντιδρά καταρχήν με τη ρίζα υδροξυλίου, παράγοντας μια ρίζα ημικινόνης και υπεροξειδίου του υδρογόνου. Η ρίζα της ημικινόνης θα μετατραπεί σε κινόνη ακολούθως και το υπεροξειδίου του υδρογόνου αντιδρά με το δισθενή σίδηρο ελευθερώνοντας μια ρίζα υδροξυλίου (Εικόνα 11). Συμπερασματικά το οξυγόνο στους οίνους ελαττώνεται συνεχώς κάθε φορά που συμβαίνει αντίδραση οξείδωσης. Οι ρίζες υδροξυλίου που παράγονται είναι πολύ δραστικές και μη εκλεκτικά μόρια, αφού μπορούν να οξειδώσουν σχεδόν όλα τα συστατικά οργανικής φύσης του κρασιού (Waterhouse & Laurie, 2006; Vlahou et al., 2022).



**Εικόνα 11:** Πορεία φαινολικής οξειδωσης και οξειδωση με τη ρίζα υδροξυλιού κυριότερων ενώσεων του οίνου (Waterhouse & Laurie, 2006b)

## 2.5) Ενζυμική Οξείδωση

Μόλις κοπεί το σταφύλι από το κάθε πρέμνο και κυρίως μετά το σπάσιμο μέχρι και την έναρξη της ζύμωσης, πραγματοποιούνται βιοχημικές αντιδράσεις εξαιτίας των ενζύμων που ελευθερώνονται. Τα τελευταία τροποποιούν τις οργανοληπτικές ιδιότητες αλλά και τη χημική σύσταση του παραγόμενου οίνου. Γενικά ο ρόλος των ενζύμων είναι η επιτάχυνση των αντιδράσεων (δρουν σαν καταλύτες) και πιο ειδικά οι οξειδάσες ή οξυγονο-τρανσφεράσες καταλύουν τη μεταφορά του οξυγόνου σε κάποιο υπόστρωμα όπως οι φαινόλες που βρίσκονται στο γλεύκος (Τσακίρης Αργύρης, 2009 σελ.279-280). Οι ενζυμικές αντιδράσεις οξείδωσης εμφανίζονται παρουσία του ενζύμου της πολυφαινολοξειδάσης που επιδρά σε υγιή σταφύλια ή παρουσία λακκάσης η οποία επιδρά σε σταφύλια που έχουν μολυνθεί από *botrytis cinerea*. Σύμφωνα με την Vlahou et al. (2022) για το ενζυμικό καφέτιασμα των γλευκών και δευτερευόντως των νεαρών οίνων, υπεύθυνα ένζυμα είναι τα εξής: οι τυροσινάσες, κρεζολάση και κατεχολάση (ο-διφαινολοξειδάσες) και η λακκάση. Οι βασικοί παράγοντες για τη δημιουργία του ενζυμικού καφετιάσματος είναι η συγκέντρωση της ενεργούς πολυφαινολοξειδάσης και των φαινολικών ενώσεων που δρουν ως υποστρώματα, η τιμή του pH, η θερμοκρασία και η διαθεσιμότητα οξυγόνου (Karbowiak et al., 2009; Martinez et al., 1995). Σύμφωνα με τους Vlahou et. al. (2022) παρουσία οξυγόνου οι πολυφαινολοξειδάσες (PDO) μετατρέπουν τα απλά φαινολικά συστατικά του γλεύκους,

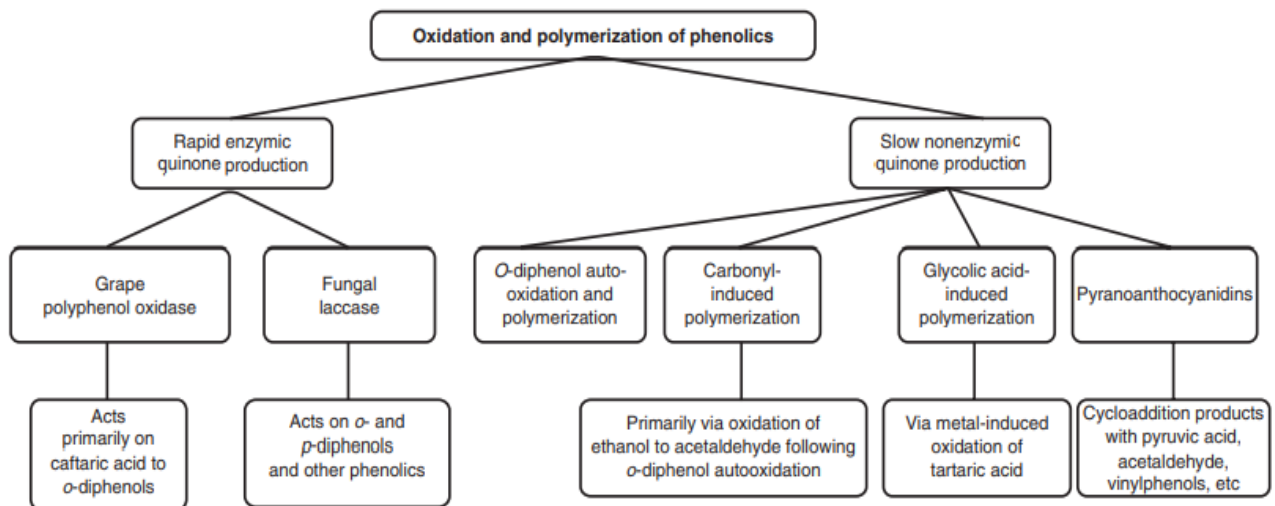
εστέρες του τρυγικού οξέος, μονομερή των φλαβαν-3-ολών, κουταρικό και trans- καφταρικό οξύ σε κινόνες (Singleton, 1987; Hornsey, 2007; Vlahou et. al. ,2022). Αυτές με τη σειρά τους είναι ικανές να αντιδράσουν με σουλφυδρυλομάδες, αμινομάδες, αμινοξέα/πρωτεΐνες, το θειώδη ανυδρίτη, τη γλουταθειόνη όπως και φλαβονοειδή και να πολυμεριστούν (Cheynier et al., 1990). Ο ολοένα και μεγαλύτερος αριθμός τέτοιων προϊόντων συμπύκνωσης (πολυμερών) οδηγεί στη δημιουργία καστανών ενώσεων στο μέσο του γλεύκους (Singleton, 1987; Vlahou et. al. ,2022). Ο πολυμερισμός όπως και η πρόωμη καθίζηση των οξειδωμένων φαινολών κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, σηματοδοτείται από τον ακόλουθο μηχανισμό (Jackson, 2008; Vlahou et. al.,2022). Οι ο-δικινόνες είναι ασταθή μόρια οι οποίες είναι ικανές να αναχθούν και να επανασυνθέσουν διφαινόλες όσο ταυτόχρονα οξειδώνονται άλλες χημικές ενώσεις όπως το ασκορβικό οξύ, οι κατεχίνες και οι προκυανιδίνες. Να σημειωθεί ότι ο σχηματισμός κινονών, μέσω οξειδωσης είναι ενζυμικής φύσης ενώ άλλες αντιδράσεις που οδηγούν σε οξειδωτικό καφέτιασμα δεν είναι (Oliveira et al., 2011; Vlahou et. al. 2022).

Ξεκινώντας με τον πρώτο υπαίτιο παράγοντα για το καφέτιασμα, η τιμή του pH είναι κρίσιμης σημασίας και σε ορισμένη μόνο τιμή του, τα ένζυμα παρουσιάζουν τη βέλτιστη δράση (η τυροσινάση έχει μέγιστη δράση στο pH=7 ενώ η λακκάση απενεργοποιείται σε pH μεγαλύτερο του 7). Η θερμοκρασία παίζει σημαντικότερο ρόλο στη δραστηριότητα του ενζύμου και συγκεκριμένα η τυροσινάση απενεργοποιείται σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 70°C ενώ η λακκάση καταστρέφεται στο pH του κρασιού με θέρμανση στους 45°C για 10 λεπτά (Τσακίρης Αργύρης, 2009). Επίσης το ενζυμικό καφέτιασμα σχετίζεται με την κατάσταση υγιεινής των σταφυλιών, την προσθήκη θειώδη ανυδρίτη ο οποίος δρα παρεμποδιστικά στη δράση της πολυφαινολοξειδάσης, όχι όμως και της λακκάσης, την κατεργασία που έχουν υποστεί τα σταφύλια (για παράδειγμα εκχύλιση) και την αρχική συγκέντρωση των υδροξυκιναμμωμικών οξέων. Τα τελευταία εστεροποιούνται με τρυγικό οξύ για να παραχθεί καφταρικό οξύ που είναι ευοξειδωτο (Cheynier et al., 1989). Τα καφταρικά οξέα από άχρωμη μορφή που έχουν σε υδατικό διάλυμα αποκτούν κιτρινωπό χρώμα όταν οξειδωθούν (Ribereau-Gayon et al., 2004; Karbowiak et al., 2009).

Ένας τρόπος προστασίας έναντι του ενζυμικού καφετιάσματος εκτός από τον περιορισμό των παραγόντων που ευθύνονται γι' αυτό είναι η ψύξη των λευκών κρασιών (0°C) όπως και η θέρμανση του μούστου στους 45-65 °C συνδυαστικά με εφαρμογή υψηλής πίεσης. Ένας ακόμα τρόπος προστασίας είναι η χρήση μετονίτη για τη διαύγαση. Εμποδίζει τη δράση των ενζύμων όμως όχι τόσο αποτελεσματικά όσο ο θειώδης ανυδρίτης αν προστεθεί αμέσως μετά την πίεση κατά την οινοποιητική διαδικασία (White et al., 1973; Karbowiak et al., 2009).

Παράλληλα με τη χρήση του θειώδη ανυδρίτη μπορούν να χρησιμοποιηθούν αδρανή αέρια όπως  $N_2$  ή  $CO_2$  και αντλίες για την αποφυγή της επαφής του μούστου με το οξυγόνο. Επίσης, υπάρχει η τεχνική της υπεροξυγόνωσης που συμβάλει στην ελάττωση του φαινολικού περιεχομένου στο γλεύκος άρα εμμέσως και του ποσοστού του καφετιάσματος. Αποτελεί μια τεχνική πρόληψης καφετιάσματος καθώς περιορίζει τη διαθεσιμότητα των ενώσεων που οξειδώνονται (Spat-Muller 1990; Schneider, 1998; Karbowiak et al., 2009), καθώς προστίθενται σε μικρές ποσότητες οξυγόνο πριν τη προσθήκη του θειώδη ανυδρίτη για να πραγματοποιηθεί η ενζυμική οξείδωση πριν την αλκοολική ζύμωση. Έτσι προστετεύεται το τελικό προϊόν και πολλοί επιστήμονες θεωρούν ότι το παραγόμενο κρασί με αυτό τον τρόπο γίνεται πιο ανθεκτικό στην οξείδωση κατά την παλαίωση (Nagel et al., 1988; Schneider, 1998; Karbowiak et al., 2009). Βέβαια η υπεροξυγόνωση οδηγεί σε μείωση της αρωματικής έντασης κάτι που μπορεί να αντιμετωπιστεί με την προσθήκη γλουταθειόνης (Vaimakis, 1996; Vlahou et al., 2022). Ένα φυσικό εμπόδιο του καφετιάσματος που οφείλεται στην ενζυμική οξείδωση είναι το παραγόμενο αλκοόλ κατά την αλκοολική ζύμωση.

Ως προς το μη ενζυμικό καφέτιασμα, είναι το πιο επιβλαβές και επικίνδυνο για την εμπορικότητα των κρασιών, ειδικά για την ελληνική βιομηχανία που παράγει κατά 66% της ετήσιας παραγωγής λευκό κρασί σύμφωνα με έρευνα του Υπουργείου Γεωργίας. Διεξάγονται συνεχώς έρευνες για να εντοπιστούν επακριβώς οι παράγοντες στους οποίους οφείλεται και οι μηχανισμοί που συμβαίνουν (Nenadis & Paraskevopoulou, 2016). Έως τώρα οι τρόποι προστασίας από το μη ενζυμικό καφέτιασμα που οφείλεται στο οξυγόνο είναι ο περιορισμός της επαφής του κρασιού με αυτό. Γι' αυτό το λόγο κατά την οινοποίηση αποφεύγεται όσο είναι δυνατόν κάθε επαφή με το οξυγόνο διότι έχει αρνητικές επιπτώσεις εκτός από το χρώμα (browning), την ποιότητα και τελικά την εμπορικότητα των οίνων (Rossi et al, 1996).



**Εικόνα 12:**Οξείδωση φαινολών και πολυμερισμός στον οίνο (Ronald S. Jackson, 2008)

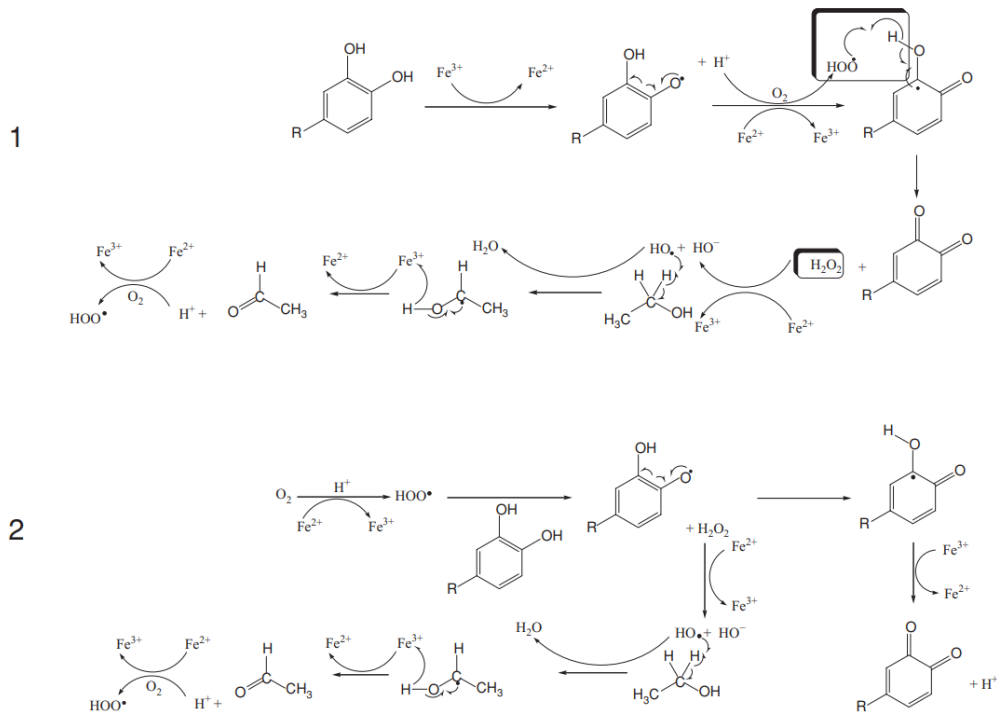
## 2.6) Αλληλεπίδραση φαινολικών συστατικών οίνου με οξυγόνο

Καταρχήν να γίνει σαφές ότι υπάρχει μια ισορροπία ανάμεσα στις φαινολικές ενώσεις και του αντίστοιχου φαινολικού ιόντος στις συνθήκες οξείδωσης του οίνου και εξαρτάται από την τιμή του pH. Στο περιβάλλον του οίνου δεν κυριαρχεί η ιοντική μορφή της φαινολικής ένωσης ( pH 3-4) ενώ σε υψηλότερες τιμές pH υπερισχύει η μορφή του φαινολικού ανιόντος και η οξείδωση συμβαίνει πολύ πιο εύκολα (pKa=9-10 φαινολικών ενώσεων). Είναι εύκολο δηλαδή να αφαιρεθεί ένα ηλεκτρόνιο και να σχηματιστεί ημι-κινόνη, καθώς το ιόν αυτό διαθέτει ασθενώς όξινες ιδιότητες. Στις συνθήκες του pH στο κρασί, τα περισσότερα φαινολικά συστατικά με τη μορφή ιόντος είναι τόσο λίγα που η άμεση οξείδωσή τους σταματάει, δεν παύει όμως να υπάρχει ποσοστό τους που να οξειδώνεται το οποίο όμως δεν είναι υπεύθυνο για το καφέτιασμά τους (Danilewicz, 2003; Waterhouse et al., 2006; Karbowiak et al., 2009, Vlahou et. al., 2022).

Τα κύρια αντιοξειδωτικά που συνεισφέρουν υδρογόνο είναι οι μονοϋδροξυ- και οι πολυϋδροξυ- φαινολικές ενώσεις με πολλούς και ποικίλους υποκαταστάτες (Minet al., 2002; Karbowiak et al., 2009). Η επακόλουθη οξείδωση αυτών των ενώσεων, είτε μέσω αυτοκατάλυσης (Singleton, 1987; Waterhouse et al., 2006) είτε με τη συμμετοχή μετάλλων που δρουν ως καταλύτες (Danilewicz, 2003; Karbowiak et al., 2009), οδηγεί στον σχηματισμό αρχικά ημι-κινονών και τελικά κινονών. Οι οίνοι με χαμηλό pH αντιστέκονται περισσότερο στην οξείδωση σε σχέση με τους υπόλοιπους.

## 2.7) Ο ρόλος των Μετάλλων στην οξείδωση του οίνου

Ο βασικότερος ρόλος των μετάλλων στην οξείδωση είναι η καταλυτική τους δράση και ειδικότερα η ενεργοποίηση του οξυγόνου, συνεργαζόμενο με τις ελεύθερες ρίζες (Waterhouse & Laurie, 2006; Vlahou et al., 2022).



**Εικόνα 13:** Οξείδωση των φαινολικών ενώσεων μέσω αναγωγής του οξυγόνου και της οξείδωσης της αιθανόλης (Waterhouse & Laurie, 2006)

Η πρώτη αντίδραση βασίζεται για παράδειγμα στον άμεσο ρόλο του σιδήρου στο οξειδοαναγωγικό ζεύγος οξυγόνου/αιθανόλης. Στη δεύτερη δημιουργείται το δραστικό είδος του οξυγόνου, μέσω της συμμετοχής του σιδήρου και στη συνέχεια συμβαίνει η οξείδωση της φαινόλης (Karbowiak et al., 2009). Ο καταλυτικός ρόλος των μετάλλων επιβεβαιώθηκε από τους Laurie και Waterhouse (2006), από τους Ribereau-Gayon (1933) που μελέτησαν την επίδραση αλάτων σιδήρου και χαλκού στην οξείδωση όπως και οι Berg και Akiyoshi (1956). Σε μια ακόμη μελέτη, αυτή των Cacho et al. (1995) σχετικά με την επίδραση μετάλλων όπως ο σίδηρος, ο χαλκός και το άλας του θειϊκού μαγνησίου στην οξείδωση φαινολικών ενώσεων του οίνου, διαπιστώθηκε ότι η συγκέντρωση των μετάλλων παίζει σημαντικό ρόλο. Οι Benitez et al. (2002) απέδειξαν ότι οι μεγάλες περιεκτικότητες σε δισθενή σίδηρο ενός λευκού οίνου συνδέεται με το οξειδωτικό καφέτιασμα, κάτι που συμφωνεί με τα ευρήματα των (Oszmianski et al., 1996) οι οποίοι έδειξαν τη σχέση των κατιόντων σιδήρου  $Fe^{2+}$  με την αύξηση των επιπέδων κατεχίνης σε model wine.

Τέλος η ποσότητα των μετάλλων δεν παραμένει σταθερή κατά τη διάρκεια της οξείδωσης του οίνου καθώς σχηματίζονται δεσμοί με πρωτεΐνες κι άλλα φαινολικά συστατικά (τα ιόντα σιδήρου) και με ταννίνες (Vlahou et al., 2022).

## **2.8) Οξείδωση στους λευκούς οίνους**

Γενικά το καφέτιασμα των οίνων είναι ένα φυσικό αποτέλεσμα που εμφανίζεται κατά τη διάρκεια της οινοποίησης, της παλαίωσης και της αποθήκευσής τους. Ενώ αυτό το φαινόμενο είναι ανεπιθύμητο στους επιτραπέζιους οίνους (ειδικά στους νεαρούς), στους αφρώδεις και τους ερυθρούς οίνους παλαίωσης, είναι επιθυμητό στους γλυκούς (Salacha et al., 2008). Κατά τη διεργασία αυτή αυξάνεται η χρωματική ένταση, μειώνεται η φωτεινότητα και αυξάνεται ο δείκτης του καφετιάσματος όπου οφείλεται σε μια σειρά αντιδράσεων οξείδωσης (Singleton&Kramling,1976;Gonzales Cartagena et al., 1994). Αυτές οι αντιδράσεις όπως προαναφέρθηκε είναι ενζυμικές (Nagler &Grabber,1988) ή μη ενζυμικές (Cilliers &Singleton, 1990). Οι ενζυμικές και μη αντιδράσεις έχουν κοινό το κύριο υπόστρωμα οξείδωσης που είναι οι φαινολικές ενώσεις (Nenadis & Paraskevopoulou, 2016). Οι μη ενζυμικές αντιδράσεις εμφανίζονται όταν απουσιάζει η πολυφαινολοξειδάση.

Το καφέτιασμα λοιπόν είναι ένα πρόβλημα κυρίως όσο αναφορά την ποιότητα των λευκών οίνων με βασική αιτία το ότι είναι περισσότερο ορατό σε αυτούς και σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με την πολυφαινολική σύσταση του οίνου (Singleton, V.L. et al,1976). Οι πολυφαινόλες οξειδώνονται, ένα γεγονός που συνδέεται εκτός από το βαθμό καφετιάσματος και με αλλαγές στην αντιοξειδωτική ικανότητα του οίνου (Oszmianski et al., 1996).

Ο οίνος περιέχει εκ φύσεως ενώσεις που διαθέτουν αντιοξειδωτική δράση ,όπως τα φλαβονοειδή τα οποία λειτουργούν ως τερματιστές ελεύθερων ριζών και είναι υπεύθυνα για τη δημιουργία χηλικών συμπλόκων με τη συμμετοχή μετάλλων (Kotseridis et al., n.d.). Γι' αυτό πολλοί ερευνητές θεωρούν ότι όσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων, τόσο πιο προστατευμένος θα είναι ο οίνος σχετικά με την οξείδωση (Karbowiak et al., 2009; Gomez-Miguez et al., 2007, Villano et al., 2006; Singleton, 1987). Άρα σε αυτή την περίπτωση η υψηλές πιέσεις και η μακρές εκχυλίσεις φλοιούς είναι επιθυμητές για την παραλαβή μεγαλύτερης ποσότητας φλαβονοειδών που έχουν αντιοξειδωτική δράση.

Τα πολυφαινολικά συστατικά των λευκών οίνων σε μεγαλύτερη συγκέντρωση και με την πιο ενεργή συμμετοχή σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής είναι τα υδροξυκιναμωμικά οξέα και οι φλαβανόλες. Το καφέτιασμα φαίνεται να ενισχύεται απο τα προϊόντα οξείδωσης των

ενώσεων όπως το καφεϊκό οξύ, η κατεχίνη, η επικατεχίνη και άλλα (Ozmianski et al., 1996) σε πολυμερή των ortho-κινονών (Kotseridis et al., 2013).

## **2.9) Οξείδωση και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά οίνου**

Η οξείδωση, όπως και το καφέτιασμα κυρίως των λευκών κρασιών κατά τη διάρκεια της οينوποίησης όπως και της αποθήκευσής τους έχει σημαντικό αντίκτυπο στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και στην ποιότητά τους. Αυτές οι δύο αλληλένδετες διαδικασίες είναι δυνατόν να υποβαθμίσουν σημαντικά την ποιότητα των τελικών προϊόντων.

### **2.9.1) Επίδραση στο χρώμα**

Το χρώμα του οίνου οφείλεται στην συνδυαστική απορρόφηση μηκών κύματος της ορατής περιοχής του φωτός. Βέβαια για τον προσδιορισμό του βαθμού καφετιάσματος και των συνεπειών του, η απορρόφηση στα 420 nm παρουσιάζει ενδιαφέρον. Κάθε οίνος έχει συγκεκριμένα φασματικά χαρακτηριστικά και για αυτό το λόγο η απορρόφηση στα 420 nm δε μπορεί να χρησιμοποιηθεί για σκοπούς σύγκρισης με άλλους οίνους. Όσο πιο οξειδωμένος όμως είναι ένας οίνος, τόσο μεγαλύτερη τιμή έχει η απορρόφηση στα 420 nm ( $A_{420\text{ nm}}$ ) (Γ. Κοτσερίδης et al., 2017), όπως και συμβαίνει στο πείραμα της επιταχυνόμενης οξείδωσης όπου πραγματοποιείται σημαντική αύξηση τιμών (Kallithraka et al., 2009).

Όσο αναφορά τους λευκούς οίνους συγκριτικά με τους ερυθρούς, είναι γνωστές λίγες πληροφορίες σχετικά με τη χημική προέλευση και τη δημιουργία χρώματος. Οφείλεται κυρίως στα υδροξυκινναμωμικά οξέα όπως είναι το καφταρικό οξύ και τα παράγωγά του. Οι κιτρινωπές χρωστικές που εμφανίζονται στα νεαρά κρασιά, προέρχονται από εκχύλιση ή οξείδωση των φλαβονολών (quercetin, kaempferol).

Τα μη φλαβανοειδή και οι λιγνίνες εκχυλίζονται από το ξύλο της δρυός στην περίπτωση που έχει χρησιμοποιηθεί βαρέλι και μάλιστα προσδίδει σκούρο χρώμα ως προς τους λευκούς οίνους. Όσο πιο βαθύ χρυσαφί με κίτρινο χρώμα αποκτά ο λευκός οίνος, πιθανόν προέρχεται από οξειδώσεις των φαινολών και του γαλακτουρονικού οξέος. Το τελευταίο προέρχεται από την διάσπαση πηκτινών και ειδικότερα από τα κυτταρικά τους τοιχώματα. Οι σκιές χρυσού χρώματος που είναι πιθανόν να δημιουργηθούν, ακολουθούν το σχηματισμό έγχρωμων ενώσεων σύμφωνα με τους Belitz et al., των μελανοϊδινών, που προέρχονται από τις αντιδράσεις Maillard ή την καραμελοποίηση σακχάρων. Στα ενισχυμένα κρασιά για παράδειγμα, το μεγαλύτερο μέρος του χρώματος οφείλεται στην οξείδωση των φαινολικών ενώσεων τους κρασιού ή από τις μελανοϊδίνες που σχηματίστηκαν κατά τη διάρκεια της συμπίκνωσης του γλεύκους (που πραγματοποιήθηκε για την ενίσχυση της γλυκιάς γεύσης).



Τα νεαρά ξηρά λευκά κρασιά όμως γενικότερα, ποικίλουν χρωματικά από άχρωμα έως υποκίτρινα/χλωμά. Η εμφάνιση του κίτρινου χρώματος είναι ανησυχητική, εκτός αν έχει παραμείνει σε επαφή για μεγάλο χρονικό διάστημα με τους φλοιούς ή σε δρύινο βαρέλι. Η φυσιολογική χρωματική πορεία του οίνου είναι να αποκτά πιο σκούρες αποχρώσεις καθώς παλαιώνει. Αν όμως οι πιο σκούροι χρωματισμοί οφείλονται σε οξείδωση, δεν είναι αποδεκτοί.

Να σημειωθεί ότι οι επιδόρπιοι οίνοι έχουν πιο έντονο χρώμα, κίτρινο-χρυσό κι αυτό συνήθως οφείλεται στα οξειδωμένα σταφύλια από τα οποία προέρχονται, που συνήθως είναι υπερώριμα (Heymann, 2004).

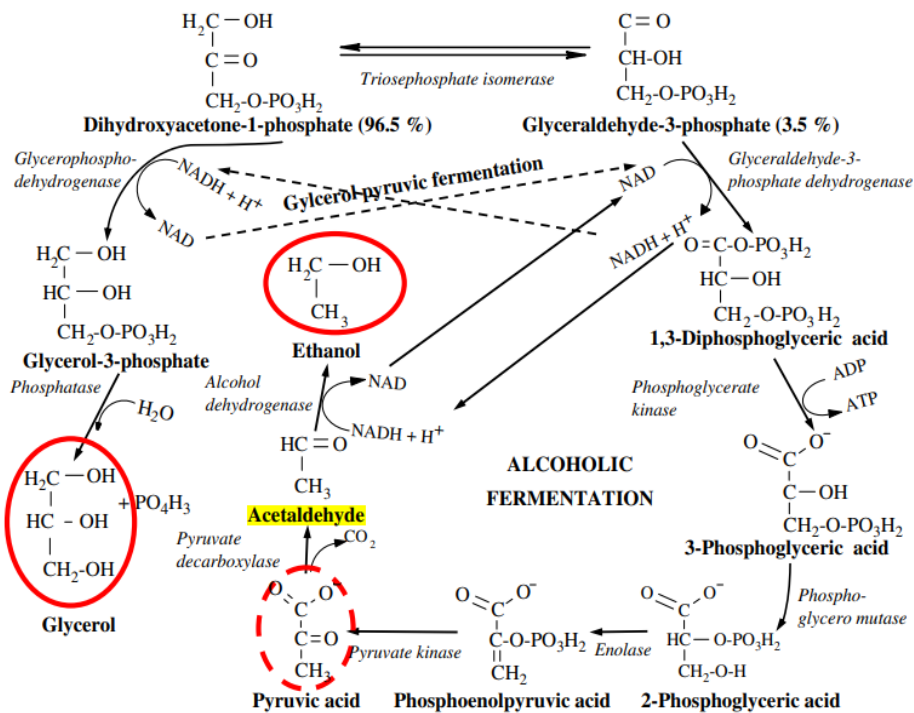
### **2.9.2) Επίδραση στο άρωμα**

Ο οίνος είναι ένα προϊόν που έχει παραχθεί με την δράση των ζυμών στο σταφύλι και αποτελεί ένα προϊόν με τεράστιο οικονομικό ενδιαφέρον. Το προϊόν αυτό είναι άρρηκτα συνδεδεμένο με τη φύση του, όπως για παράδειγμα με την ποικιλία των σταφυλιών από την οποία έχει παραχθεί, τη γεωγραφική θέση του αμπελώνα όπως και από τα διάφορα σημεία του ίδιου του αμπελώνα από τον οποίο προέρχονται τα σταφύλια. Οι αμπελουργικές και οινολογικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται, επηρεάζουν επίσης τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του κρασιού γι' αυτό υπάρχει και ποικιλομορφία σε αυτά. Ο κυριότερος παράγοντας που επηρεάζεται και έχει αντίκτυπο στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του κρασιού, είναι οι πτητικές ενώσεις, οπότε κατανοώντας τη φύση και προέλευση αυτών των ενώσεων μπορεί να κατευθυνθεί η οινοποίηση και η φροντίδα του αμπελώνα με τέτοιο τρόπο ώστε να παραχθούν τελικά κρασιά με συγκεκριμένα αρωματικά και γευστικά χαρακτηριστικά. Τα χαρακτηριστικά αυτά βέβαια, είναι επιθυμητά από συγκεκριμένες ομάδες καταναλωτών (Dennis et al., 2012).

Η οξείδωση όμως επιδρά στα περιεχόμενα αρώματα του οίνου και συνδέεται με την ελάττωση του ποικιλιακού αρώματος. Συμβαίνει δηλαδή μια απώλεια ενώσεων των θειολών, δηλαδή αυτών που περιέχουν το στοιχείο του θείου. Ειδικότερα το διμεθυλοσουλφίδιο, ενισχύει το φρουτώδες άρωμα και η 3-μερκαπτοεξανόλη προσδίδει άρωμα γκρέιπφρουτ, χαρακτηριστικό άρωμα της ποικιλίας Sauvignon Blanc (Roland et al., 2011; Vlahou et al., 2022). Οι θειόλες που είναι πτητικές ενώσεις αντιδρούν με τις ο-κινόνες που έχουν παραχθεί μέσω της κατεχόλης (Vlahou et al., 2022; Nikolantonaki et al., 2012) και παράγουν προϊόντα που δεν είναι πτητικά αλλά είναι υπεύθυνα για την ελάττωση του αρώματος. Στο σημείο αυτό να αναφερθεί ότι σημαντικό ρόλο παίζει η ισχύς της πυρηνόφιλης θειόλης, των ηλεκτρονιόφιλων κινονών όπως και ο ρυθμός οξείδωσης της ένωσης της κατεχόλης (Charles-

Bernard et al., 2005; Nikolantonaki et al., 2010; Nikolantonaki, M. et al., 2012; Vlahou et al., 2022). Επίσης δημιουργούνται δισουλφιδικές ενώσεις που προκύπτουν μέσω της άμεσης οξείδωσης των μερκαπτανών ή θειολών (Rauhut et al., 1996; Mestres et al., 2000).

Παράλληλα με τη μείωση των επιπέδων θειολών λόγω της οξείδωσης εμφανίζεται ένα νέο άρωμα οξείδωσης σύμφωνα με τους Chinnici et al., (2013), που οφείλεται κατά κύριο λόγο στην ακεταλδεΐδη. Από βιοχημική σκοπιά η ακεταλδεΐδη σχηματίζεται από το πυροσταφυλικό οξύ με τη βοήθεια της πυρουβικής αποκαρβοξυλάσης. Δηλαδή κατά την αλκοολική ζύμωση παράγεται το πυροσταφυλικό οξύ από τη γλυκόζη, η οποία παραγωγή του συνεχίζεται και κατά τη διάρκεια της αναπνοής. Στις συνθήκες αλκοολικής ζύμωσης μετατρέπεται το πυροσταφυλικό σε ακεταλδεΐδη και τελικά σε αιθανόλη. Η τελική συγκέντρωση σε ακεταλδεΐδη όπως θα αναλύσουμε στη συνέχεια, εξαρτάται από τις συνθήκες ζύμωσης όπως και τα επίπεδα θειώδη ανυδρίτη (να μην υπερβαίνει τα 100 mg/l).



**Εικόνα 14:** Αλκοολική και γλυκερο-πυροσταφυλική ζύμωση - σύνδεση με γλυκόλυση. Όπου ADP αδενική διφωσφατάση και ATP αδενική τριφωσφατάση (σελ. 164)(Moreno J. & Peinado R., 2012)

Ειδικότερα σε αερόβιες συνθήκες, το πυροσταφυλικό οξύ οξειδώνεται μέσω του κύκλου του Krebs σε διοξείδιο του άνθρακα. Τα συνένζυμα NADH που παράγονται μέσω της γλυκόλυσης, οξειδώνονται ξανά σε NAD<sup>+</sup>, μια διαδικασία που συμβαίνει στα μιτοχόνδρια. Το οξυγόνο παίζει το ρόλο του αποδέκτη πρωτονίων και η ακεταλδεΐδη ανάγεται σε αιθανόλη. Στην αρχή της ζύμωσης η συγκέντρωση της αποκαρβοξυλάσης είναι μικρή καθώς

δεν υπάρχει ακεταλδεύδη στο περιβάλλον, όταν όμως σχηματιστεί ακεταδεύδη δε μπορεί να αναχθεί σε αιθανόλη γιατί ενώνεται με τον θειώδη ανυδρίτη. Έτσι τα συνένζυμα NADH επανοξειδώνονται μέσω της (παραγωγής γλυκερόλης και πυροσταφυλικού οξέος) γλυκεροπυροσταφυλικής ζύμωσης.

Αντιθέτως σε αναερόβιες συνθήκες ο αποδέκτης των πρωτονίων είναι το πυροσταφυλικό οξύ. Γι' αυτό ανάγεται σε γαλακτικό οξύ και αποκαρβοξυλιώνεται στη συνέχεια παράγοντας αιθανόλη. Μάλιστα η τελευταία αντίδραση συμβαίνει αφού έχει παραχθεί το  $\text{NAD}^+$  κατά την οξείδωση των γλυκεραλδεϋδ-3 φωσφατάση και 3-φωσφογλυκερίδιο (Phosphoglycerate). Οι αντιδράσεις λοιπόν αυτές συνδέονται διότι είναι μέρη ενός οξειδοαναγωγικού συστήματος. Γι' αυτό το NADH είναι απαραίτητο να οξειδωθεί ξανά μέσω της γλυκόλυσης σε  $\text{NAD}^+$ , για να μην αναχθεί (Moreno J. & Peinado R., 2012 σελ.160-176).

Επιπροσθέτως, στους οίνους τους οποίους ωριμάζουν σε βαρέλια, δημιουργείται το οξειδωτικό μπουκέτο ενώ σε αυτούς τους οποίους παλαιώνουν στο μπουκάλι, δημιουργείται το αναγωγικό μπουκέτο. Η βασική ένωση που πρωταγωνιστεί στο οξειδωτικό μπουκέτο είναι αυτή της ακεταλδεϋδης, όμως περιλαμβάνει κι άλλες αλδεϋδες προερχόμενες από την οξείδωση των ανώτερων αλκοολών που έχουν μικρό κατώφλι αντίληψης.

Ως προς τους λευκούς οίνους, η μη ελεγχόμενη οξείδωση τροποποιεί το αρωματικό τους περιεχόμενο, συνήθως μέσω απώλειάς του. Σύμφωνα με την πειραματική μελέτη των Silva Ferreira et al. (2002), η οποία πραγματοποιήθηκε την επιταχυνόμενη οξείδωση λευκών οίνων όπου είχαν κορεσθεί με οξυγόνο και αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία 45°C για τη διάρκεια 3 μηνών, μειώθηκαν οι αρωματικές ενώσεις των νορισοπρενοειδών και των τερπενίων. Αντιθέτως αυξήθηκαν οι φαινυλ-ακεταλδεϋδες, η μεθιονάλη και το 1,1,6-τριμεθυλο-1,2-διυδροναφθαλένιο (TDN), ενώσεις υπεύθυνες για τα αρώματα μελιού, ζωοτροφής και κηροζίνης αντίστοιχα. Σύμφωνα με τον Blanchard, όσον αφορά την κινόννη, η οποία ουσιαστικά προέρχεται από την οξείδωση της κατεχίνης κι αυτή συμμετέχει στην αντίδραση με τη 3-μερκαπτοεξανόλη. Η κύρια συνέπεια αυτής της αντίδρασης είναι η απώλεια του φρουτώδους αρώματος από τις ποικιλίες Merlot, Cabernet Franc και Cabernet Sauvignon. Μια ακόμη ενδιαφέρουσα πειραματική μελέτη που διεξήχθη από τους Roussis και Patrianakou (2013) αφορά την ποικιλία Chardonnay και ειδικότερα την οξείδωση του οίνου που προέρχεται από αυτή. Δηλαδή μελετήθηκε η σχέση της οξείδωσης και των εστέρων που συνεισφέρουν στο ποικιλιακό άρωμα. Πιο ειδικά τα κρασιά εμφανίστηκαν παρουσία του οξυγόνου και για το χρονικό διάστημα των εννέα μηνών παρατηρήθηκε ο δείκτης αμαύρωσης ο οποίος ήταν υψηλότερος και οι εστέρες (οξικός αιθυλεστέρας, εξανοϊκός αιθυλεστέρας, οξικός ισοαμυλεστέρας, οκτανοϊκός και δεκανοϊκός αιθυλεστέρας)

ελαττώθηκαν. Επομένως η φρεσκάδα των οίνων και το φρουτώδες άρωμα, ελαττώθηκαν αρκετά, μια παρατήρηση που επιβεβαιώνουν οι Roussis et al., (2005). Να σημειωθεί ότι εκτός από την απώλεια των αρωματικών εστέρων έχει παρατηρηθεί και απώλεια των τερπενίων σύμφωνα με τους Papadopoulou και Roussis (2008).

Από χημική σκοπιά, οι εστέρες που περιέχονται στον οίνο κατά τη διάρκεια της παλαίωσης και της αποθήκευσης του μεταβάλλονται μέσω αντιδράσεων υδρόλυσης (δίνοντας οξέα και αλκοόλες) και εστεροποίησης (Vlahou et al., 2022).

## **2.10) Αντιοξειδωτική δράση φαινολικών συστατικών**

Αρχικά για την επεξήγηση της αντιοξειδωτικής δράσης, χρειάζεται να οριστεί η έννοια της ελεύθερης ρίζας. Η ρίζα ή ελεύθερη ρίζα αποτελεί ένα είδος χημικής φύσης το οποίο διαθέτει ασύζευκτα ηλεκτρόνια ή περιττό αριθμό ηλεκτρονίων σθένους (ηλεκτρόνια εξωτερικής στοιβάδας) σε κάποιο από τα τροχιακά της (John McMurry, 2012).

Οι φαινολικές ενώσεις είναι φυσικά αντιοξειδωτικά στο κρασί, καθώς συμμετέχουν σε αντιδράσεις οξείδωσης μέσω συνεισφοράς ενός ατόμου υδρογόνου στις ελεύθερες ρίζες. Όσο πιο εύκολα μπορεί να αποσπαστεί το υδρογόνο, τόσο μεγαλύτερη η αντιοξειδωτική δράση της φαινολικής ένωσης και παραγωγή αυτών των σταθερών προϊόντων δρα προστατευτικά στις υπόλοιπες ενώσεις που είναι ικανές να οξειδωθούν. Επίσης, τα φαινολικά ιόντα μετά την απομάκρυνση του ηλεκτρονίου, αντιδρούν με άλλες ελεύθερες ρίζες που συνεχίζουν να υπάρχουν, βάζοντας τέλος στον σχηματισμό νέων.

Να σημειωθεί ότι σύμφωνα με τους Shahidi et al. (1992) η καθαρή φαινόλη, έχει μη ενεργή αντιοξειδωτική δράση, όμως οι διφαινολικές ενώσεις στις θέσεις -όρθο και -πάρα έχουν αντιοξειδωτική δράση που αυξάνεται με την υποκατάσταση από αυθυλ- και βουτυλ- ομάδες. Ακόμα ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση διαθέτουν τα φλαβονοειδή τα οποία σύμφωνα με τη μελέτη των Ratty και Das (1988) διαθέτουν κάποια συγκεκριμένα στοιχεία στη δομή τους. Αυτά είναι οι πολυυδροξυλιωμένοι υποκαταστάτες στο δακτύλιο A και B, ελεύθερος 3-υδροξύ υποκαταστάτης συνοδευόμενος από την ύπαρξη μιας 4-κετονομάδας κι έναν 2,3 διπλό δεσμό ο οποίος βρίσκεται σε συζυγία με την ομάδα κετόνης του δακτυλίου C (Vlahou et al., 2022).

## **2.11) Αντιοξειδωτικές ουσίες οίνων**

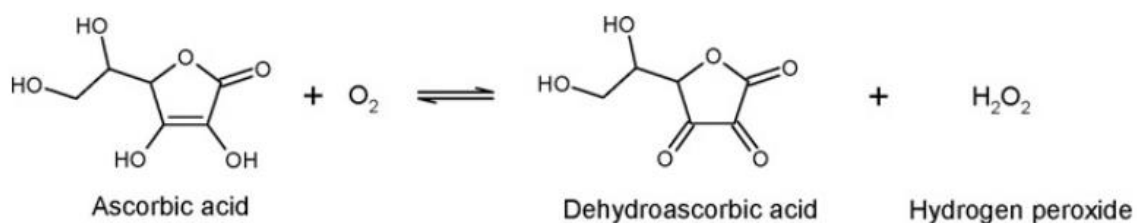
### **2.11.1) Ασκορβικό οξύ (Ascorbic Acid)**

Το ασκορβικό οξύ ή L-ασκορβικό οξύ ή Βιταμίνη C, αποτελείται από έναν πενταμελή δακτύλιο όπου οι θέσεις 4 και 5 (χειρικά κέντρα) ορίζουν τα τέσσερα στερεοϊσομερή που

διαθέτει. Μπορεί να βρεθεί σε φυτικούς και ζωϊκούς οργανισμούς, σε λαχανικά και φρούτα, σε ζύμες, προκαρυώτες, όχι όμως σε κυανοβακτήρια. Αποτελεί μια αντιοξειδωτική ουσία που «σκανάρει» τα δραστικά είδη οξυγόνου και αζώτου όπως για παράδειγμα τις ρίζες υπεροξειδίου και σουπεροξειδίου, υπεροξεινιτρικές, όζοντος, αζώτου, διοξειδίου του άνθρακα και άλλες ρίζες. Είναι σταθερό σε οργανικά και ανόργανα διαλύματα, η αντίστοιχη ρίζα του όμως όχι, καθώς μετατρέπεται γρήγορα σε ασκορβικό ή δεϋδρασκορβικό οξύ. Βέβαια, το ασκορβικό οξύ παρουσιάζει αστάθεια σε υδατικά διαλύματα που βρίσκονται σε θερμοκρασία δωματίου. Η αποικοδόμησή του στα υδατικά διαλύματα αυτά σχετίζεται με πολλούς παράγοντες όπως η θερμοκρασία, το pH, η παρουσία οξυγόνου και μετάλλων.

Η πιο σημαντική χημική ιδιότητα του ασκορβικού οξέος είναι η αντιστρεπτή οξείδωσή του σε δεϋδρασκορβικό οξύ με καταλύτη σίδηρο ή χαλκό, μια ιδιότητα που επηρεάζει όλες τις λειτουργίες. Δηλαδή έχει οξειδοαναγωγικό χαρακτήρα και η οξειδωμένη του μορφή (το δεϋδρασκορβικό οξύ) είναι ασταθής (Makaga-Kabinda-Massard & Maujean, 1994; Evers et al., 2021) και αποσυντίθεται σε ένα ευρύ φάσμα ενώσεων όπως στη ξυλοσόνη μια πρόδρομη χρωστική παρουσία των φλαβαν-3-ολών (Clark, A.C et. Al. 2009; Barril, C. et. al., 2009; Barril et al., 2012). Η οξείδωση του ασκορβικού σε δεϋδρασκορβικό οξύ έχει ευεργετικό ρόλο καθώς απομακρύνει το υπολειπόμενο οξυγόνο που βρίσκεται στον οίνο και δεν έχει ελαττωθεί μετά τη χρήση άλλων αντιοξειδωτικών (όπως θειώδη ανυδρίτη και γλουταθειόνη). Όμως όταν το οξυγόνο υπάρχει σε μεγαλύτερη ποσότητα τότε όπως στην περίπτωση των κατεχολών, παράγεται υπεροξειδίου του υδρογόνου (Vlahou et al., 2022). Σύμφωνα με τους (du Toit et al., 2006; Oliveira et al., 2011, Waterhouse & Laurie, 2006) ο σχηματισμός αυτός επηρεάζει τις ιδιότητες του οίνου.

Τα ηλεκτρόνια που απελευθερώνονται κατά την οξείδωση του δεϋδρασκορβικού συμμετέχουν στην αναγωγή άλλων συστατικών του οίνου όπως το κατιόν του σιδήρου (Ribéreau-Gayon et al., 2006).



**Εικόνα 15:** Οξείδωση ασκορβικού οξέος σε δεϋδρασκορβικό οξύ (Barril et al., 2012)

Ενδιαφέρον παρουσιάζει ο προστατευτικός ρόλος του ασκορβικού οξέος ως προς την ενζυμική οξειδωση από τη λακκάση ή την τυροσινάση (Dubernet et al., 1977). Επίσης, παίζει σπουδαίο ρόλο παρουσία κινονών καθώς αυτές μπορούν να αναχθούν στις φαινολικές ενώσεις από τις οποίες προέρχονται ενώ το ίδιο το ασκορβικό οξειδώνεται επηρεάζοντας τη σύσταση και το άρωμα του οίνου (Cheynier & da Silva, 1991). Βέβαια, σύμφωνα με τους (Makhotkina & Kilmartin, 2009) με τη χρήση κυκλικών βολταμογραμμάτων (CV) για την παρακολούθηση των πολυφαινολών του οίνου δε φαίνεται να αλληλεπιδρούν οι ο-κινόνες με το ασκορβικό οξύ, αποδεικνύοντας ότι το ασκορβικό οξύ δεν είναι ισχυρό αναγωγικό μέσο.

Το πρωτόνιο του άνθρακα 3 του ασκορβικού οξέος είναι όξινο ( $pK=4,17$ ) και είναι υπεύθυνο για τις όξινες ιδιότητες της βιταμίνης. Το δεϋδρασκορβικό οξύ διαθέτει κάποιες κοινές ιδιότητες με τη βιταμίνη C και μπορεί να βρεθεί σε μορφή διμερούς ή ενυδατωμένης ημιακετάλης. Οι συγκεντρώσεις του ασκορβικού οξέος στο γλεύκος είναι της τάξης των 30 με 572 mg/l, οι οποίες ελαττώνονται λόγω ενζυμικής οξειδωσης έως το τέλος της ζύμωσης (Ournac, 1966), αγγίζοντας τις τιμές 1 με 30 mg/l (Genevois & Ribéreau-Gayon, 1947; Moreno & Peinado, 2012; Ournac, 1966). Σύμφωνα με τους (Moreno & Peinado, 2012) οι παραγόμενοι οίνοι δε διαφέρουν σημαντικά στο χρώμα τους βάσει του περιεχόμενου ασκορβικού οξέος και να σημειωθεί ότι κατά την παλαίωση η τιμή της συγκέντρωσής του συνεχώς μειώνεται (Ournac, 1966; Evers et al., 2021).

Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά φαίνεται να μη συνδέονται με την ύπαρξη του ασκορβικού οξέος στην περίπτωση των παλαιωμένων οίνων χρονικού διαστήματος τριών ετών για τα κρασιά των ποικιλιών Riesling και Chardonnay. Φάνηκε ότι τα αρώματα είτε δεν έχουν επηρεαστεί από την προσθήκη αυτή είτε έχουν σχηματιστεί άλλα λόγω οξειδωσης χωρίς να έχουν χαθεί τα φρουτώδη (Skouroumounis et al., 2005; Vlahou et al., 2022). Επίσης οίνοι που περιέχουν δαμασκηνόνη φαίνεται να έχουν παρόμοια ή και λιγότερα γευστικά χαρακτηριστικά όπως φρουτώδη, ανθικά, αρώματα ξύλου, μελιού, μήλου κι άλλα όταν χρησιμοποιείται το ασκορβικό (Kováts, 1987; Kotseridis et al., 1998; Kotseridis & Baumes, 2000; Ferreira et al., 2002; Aznar et al., 2001; Evers et al., 2021).

Το ασκορβικό οξύ προστίθεται στην οινοποίηση πολλές φορές πριν την έκθλιψη των σταφυλιών για να προστατεύσει τα αρωματικά συστατικά του οίνου από την οξειδωσή τους και για την προστασία του οίνου από σιδηρικά θολώματα. Επίσης οι (Bradshaw et al., 2011) υποστηρίζουν ότι η προσθήκη του ασκορβικού πριν την εμφιάλωση βοηθά στην άμεση δέσμευση του μοριακού οξυγόνου προστατεύοντας από οξειδώσεις (Vlahou et al., 2022). Είναι αναγκαίο να σημειωθεί ότι προτείνεται η χρήση διοξειδίου του θείου όταν προστίθεται το ασκορβικό οξύ σε λευκά κρασιά, καθώς το ασκορβικό δεν έχει αντιμικροβιακές ιδιότητες

και επίσης το διοξείδιο του θείου δεσμεύει το παραγόμενο υπεροξείδιο του υδρογόνου από την οξείδωση του ασκορβικού οξέος (Barril et al., 2012, McArdle & Hoffmann, 1983).

Ενδιαφέρουσα είναι η μελέτη των Marks & Morris, (1993) οι οποίοι πρόσθεσαν ασκορβικό και θειώδη ανυδρίτη σε αφρώδεις οίνους και τα παρακολούθησαν για έντεκα μήνες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο θειώδης ανυδρίτης ανταποκρίθηκε αποτελεσματικότερα στην προστασία του καφετιάσματος σε σχέση με το ασκορβικό οξύ. Όπως αναφέρουν και οι Bradshaw et al. (2001) και οι (Kilmartin, 2010) το ασκορβικό οξύ σταματά να έχει αντιοξειδωτική δράση από κάποιο σημείο και μετά, μάλιστα φαίνεται να συμβάλλει στην επιτάχυνση του καφετιάσματος. Φαίνεται δηλαδή να λειτουργεί βοηθητικά στην αντιμετώπιση της οξείδωσης στην αρχή του οξειδωτικού καφετιάσματος (45°C) ενώ κάποια στιγμή η κατεχίνη οξειδώνεται ταχύτατα (Vlahou et al., 2022).

Τέλος, η διαδικασία απομόνωσής του χρειάζεται να μη λαμβάνει χώρα υπό παρουσία έντονου φωτός και να είναι αδρανής η ατμόσφαιρα έτσι ώστε να αποφευχθεί μια πιθανή διάσπασή του (Rucker et al., 2001).

### **2.11.2) Γλουταθειόνη (Glutathione)**

Η γλουταθειόνη αποτελεί ένα τριπεπτιδίο που αποτελείται από τα αμινοξέα γλυκίνη, κυστεΐνη και γλουταμίνη (Waterhouse et al., 2016). Αποτελεί φυσική αντιοξειδωτική ουσία που βρίσκεται στο σταφύλι και τον οίνο. Η παρουσία στον οίνο οφείλεται είτε στην επίδραση των ζυμομυκήτων είτε στην προσθήκη της από τους οινοποιούς για προστασία από αλλοιώσεις (Binati et al., 2021). Παράγεται λοιπόν από ένα ευρύ φάσμα μικροοργανισμών και οργανισμών, όπως φυτικών ή ζωϊκών (Waterhouse et al., 2016). Στα κύτταρα απαντάται κατά μεγάλο ποσοστό (περίπου 90%) στην ανηγμένη της μορφή (GSH), υπάρχει όμως και στην οξειδωμένη της μορφή (GSSG). Οι διαφορές αυτών των δύο μορφών είναι σημαντικές καθώς μόνο η ανηγμένη μορφή (GSH) διαθέτει την ομάδα (-RSH) που είναι υπεύθυνη για την πραγματοποίηση των βιοχημικών διεργασιών (Kritzinger et al., 2013; Xu et al., 2019). Τέτοιες διεργασίες είναι για παράδειγμα ο μεταβολισμός τοξικών ενώσεων, του θείου και του αζώτου των κυττάρων, στον οποίο συμμετέχει (Wegmann-Herr et al., 2016). Εκτός από την παραγωγή της γλουταθειόνης από τις ζύμες, ταυτοχρόνως χρησιμοποιείται από αυτές ως πηγή αζώτου κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης. Να σημειωθεί ότι δε θεωρείται σημαντική πηγή αζώτου.

Επίσης, είναι γνωστή για τις αντιοξειδωτικές της ιδιότητες, καθώς κατέχει σημαντικό ρόλο ως νουκλεόφιλο κατά την αντίδραση με ο-κινόνες εμποδίζοντας την πραγματοποίηση των αντιδράσεων οξείδωσης (κεφάλαια 13, 24) (Waterhouse et al., 2016). Οι ο-κινόνες

προέρχονται από την οξείδωση των φαινολικών συστατικών του οίνου και η αντίδρασή της γλουταθειόνης με αυτές περιορίζει τη δημιουργία καφετιάσματος. Έτσι, συμβάλλει στην παραγωγή 2-S- γλουταθειονυλο-καφταρικού οξέος γνωστό κι ως GRP (Grape Reaction Product) (Rodríguez-Bencomo et al., 2016; Xu et al., 2019). Όταν συμβαίνει μέσω ενζυμικής οξείδωσης το ένζυμο της πολυφαινολοξειδάσης (PPO) είναι υπεύθυνο για τη μετατροπή του κουταρικού οξέος (εστέρας τρυγικού οξέος) σε trans- καφταρικό οξύ, το οποίο παγιδεύεται εύκολα από τη γλουταθειόνη. Η γλουταθειόνη συμβάλλει στην εκτενέστερη οξείδωση του τελευταίου και τον σχηματισμό του προϊόντος GRP. Το προϊόν GRP που είναι άχρωμο, εμποδίζει το περεταίρω καφέτιασμα μια ιδιότητα που το καθιστά κατάλληλο για τους λευκούς οίνους (Rossi J.A.& Singleton, 1966, Vlahou et al., 2022).

Σύμφωνα με τους ( Rosa & Maglitto, 1972; Singleton et al., 1985, Cheynier et al., 1986), η γλουταθειόνη δρα ταυτόχρονα ως αναγωγικός παράγοντας. Γι' αυτό σύμφωνα με την έρευνα των Vaimakis & Roussis, (1996) είναι πιθανό να αυξηθεί το φαιολικό περιεχόμενο στον οίνο και τον καθιστά πιο ευαίσθητο στο καφέτιασμα, καθώς μέρος των κινονών ανάγονται σε φαιολικές ενώσεις (du Toit et al., 2006; Vlahou et al., 2022).

Όσον αφορά την παρουσία της στο σταφύλι, σύμφωνα με τους Kritzinger et al. 2013a συμμετέχει στη βιοσύνθεση μη πτητικών πρόδρομων αρωματικών ενώσεων όπως των πρόδρομων ενώσεων θειόλης (υπεύθυνης για το ποικιλιακό άρωμα του Sauvignon Blanc). (Kritzinger et al., 2013; Gabrielli et al., 2017). Ο σχηματισμός των δυσάρεστων πτητικών αρωματικών ενώσεων περιορίζεται από τη γλουταθειόνη καθώς η παραγωγή τους συνδέεται με τον ήδη περιορισμένο πολυμερισμό των φαινολικών ενώσεων (καφέτιασμα). Εμποδίζει επίσης την ελάττωση των επιθυμητών αρωματικών ενώσεων και προστατεύει από την οξείδωσή τους (Binati et al., 2021).

Κατά τη διάρκεια της σύνθλιψης των σταφυλιών, η ποσότητα γλουταθειόνης στο γλεύκος ελαττώνεται εξαιτίας οξειδοαναγωγικών και ενζυμικών αντιδράσεων (Adams & Liyanage, 1993). Σύμφωνα με άλλη μελέτη αυτή η μείωση εμφανίζεται και στο στάδιο των πιέσεων (Maggu et al., 2007) ενώ οι (Patel et al., 2010) υποστηρίζουν ότι υπό τη δράση υψηλών πιέσεων συμβαίνει αύξηση του προϊόντος GRP (Vlahou et al., 2022). Τέλος, η γλουταθειόνη μειώνεται και κατά την αλκοολική ζύμωση παρόλο που η οξείδωση που λαμβάνει χώρα είναι πολύ περιορισμένη, ένα φαινόμενο που σχετίζεται με την ικανότητα μεταβολισμού της από τις ζύμες (du Toit et al., 2017; Vlahou et al., 2022)

Στο πείραμα των Vaimakis, (1996) που χρησιμοποιήθηκε δείγμα οίνου της ποικιλίας Ντεμπίνα το οποίο υποβλήθηκε υπεροξυγόνωση σε συνδυασμό προσθήκης γλουταθειόνης σε διάφορες συγκεντρώσεις. Αυτό που παρατηρήθηκε βάσει οργανοληπτικών αλλαγών ήταν ότι



η γλουταθειόνη συνέβαλε στη διατήρηση ή και επαναφορά του φρουτώδους και ποικιλιακού αρώματος εξαφανίζοντας τη χαρακτηριστική γεύση του οξειδωμένου οίνου (Doubourdieu, D. & Darriet, P., 1993, Vaimakis, 1996b; Vlahou et al., 2022). Οι Papadopoulou και Roussis (2001) με βάση τα αποτελέσματα της έρευνάς τους συμπληρώνουν ότι με προσθήκη γλουταθειόνης συγκέντρωσης 20 mg/l αναστάλθηκε η ελάττωση των αρωμάτων ατερπινεόλης και τερπενίων της λιναλοόλης σε δείγματα τριών ημερών ανοιγμένων οίνων, για την ποικιλία του Μοσχάτου (Vlahou et al., 2022).

Τρόποι αύξησης τη συγκέντρωσης γλουταθειόνης στον οίνο αποτελούν η άμεση προσθήκη της στο μέσο, ο εμβολιασμός με επιλεγμένους ζυμομύκητες ή η χρήση ανενεργών ζυμών πλούσιων σε γλουταθειόνη. Σύμφωνα με τον De Vero et al. (2017) η πρώτη επιλογή κοστίζει αρκετά, ενώ η δεύτερη είναι η πιο συνήθης εξαιτίας των επιθυμητών αποτελεσμάτων της. Στην πραγματικότητα η επιλογή μίγματος στελεχών ζυμομυκήτων και μάλιστα non *Saccharomyces*, απέδωσε τα υψηλότερα επίπεδα γλουταθειόνης, καλύτερες συνθήκες ζύμωσης και μεγαλύτερη πολυπλοκότητα (Gamero-Sandemtrio et al. 2018, Câmara et al. 2019; Roudil et al. 2020, Binati et al., 2021). Σύμφωνα με μελέτη των Binati et al., (2021), όπου πραγματοποιήθηκε συνεμβολιασμός των γηγενών ζυμών *L. thermo tolerans*, *S. Bacillaris*, *Metschnikowia* spp με *S. Cerevisiae* σε γλεύκος από σταφύλια της ποικιλίας Pinot Grigio, αξιολογήθηκε η ποσότητα της παραγόμενης γλουταθειόνης. Αποδείχθηκε ότι ο συνεμβολιασμός με στελέχη *Metschnikowia* spp και *S. cerevisiae* παρήγαγαν τα υψηλότερα επίπεδα γλουταθειόνης (περίπου 25 mg/l), στη συνέχεια με *L. Thermotolerans* strains με *S. cerevisiae* και τα χαμηλότερα με *S. Bacillaris* και *S. Cerevisiae* (6,3 mg/L). Στην περίπτωση εμβολιασμού μόνο με *S. cerevisiae* τα επίπεδα είχαν ενδιάμεσες τιμές (15,7 mg/L) (Binati et al., 2021).

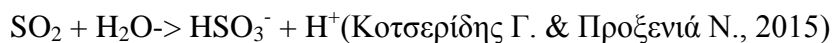
### **2.11.3) Θειώδης ανυδρίτης**

Σύμφωνα με τον κο Τσακίρη, ο θειώδης ανυδρίτης ( $\text{SO}_2$ ) χρησιμοποιείται για την προφύλαξη από την επίδραση του οξυγόνου και για την παρεμπόδιση της ανάπτυξης των ανεπιθύμητων μικροοργανισμών. Τα οφέλη που προσφέρει όμως είναι επίσης η αντοξειδασική του ιδιότητα, να καταστρέφει δηλαδή τις οξειδάσες (υπεύθυνα ένζυμα για την οξείδωση του γλεύκους). Στην οινοποίηση χρησιμοποιείται το μεταδιθειώδες κάλιο, σε μορφή σκόνης με την οποία δημιουργείται υδατικό διάλυμα και απελευθερώνεται  $\text{SO}_2$  μετά την αντίδραση που λαμβάνει χώρα με το τρυγικό οξύ του γλεύκους (Πολύζος Γ., 2008)

Οι μορφές του θειώδη ανυδρίτη που απαντώνται στο κρασί είναι δύο, αυτή του ελεύθερου και αυτή του δεσμευμένου (Τσακίρης Αργύρης, 2009). Ο θειώδης ανυδρίτης χρησιμοποιείται στην οινοποίηση εδώ και πολλά χρόνια όπου όμως πλέον είναι απαραίτητη η μεταχείρισή του με την αναγκαία ποσότητα που χρειάζεται. Η ποσότητα που προστίθεται ποικίλει ανάλογα το στάδιο της οινοποίησης και είναι καλό να υπάρχει γνώση σχετικά με τις μορφές που απαντάται στο γλεύκος και τον οίνο, όπως και με τους παράγοντες που επηρεάζουν τη δράση του. Το διοξείδιο του θείου χρησιμοποιείται ευρέως στην οινοποίηση ως αναγωγικός (δηλαδή προστασία από την οξειδωση) παράγοντας κι επειδή μπορεί να συνδύσει διάφορες πολύτιμες ιδιότητες όπως προαναφέρθηκε. Η αντίδραση με το οξυγόνο που γίνεται με αργό ρυθμό, αποτυπώνεται ως εξής:

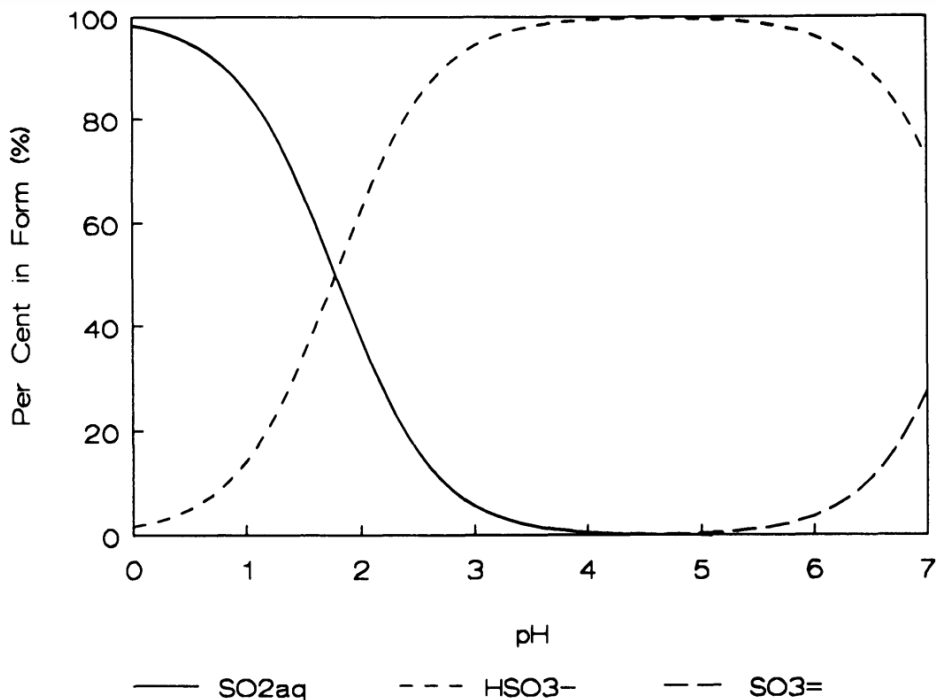


ενώ όταν βρεθεί στις συνθήκες pH γλεύκους και οίνου (3-4) συμβαίνει η ακόλουθη αντίδραση:



Στο γλεύκος το οποίο είναι αρκετά ευοξειδωτο, η προστασία γίνεται άμεσα μέσω θείωσης καθώς ο  $\text{SO}_2$  ενώνεται με το οξυγόνο και δεν είναι πλέον διαθέσιμο για την οξειδωσή των συστατικών του γλεύκους (όπως των φαινόλων). Η θείωση αυτή είναι καλό να γίνει πριν την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης διότι αν γίνει μετά θα ενωθεί με την αιθανάλη (προκύπτει από την οξειδωση της αιθανόλης) που έχει παραχθεί από τις ζύμες (Ribéreau-Gayon et al., 2005). Υπάρχουν διάφορες χημικές μορφές του (μοριακή, ιοντικές) όμως υπάρχουν κι άλλες που προέρχονται φυσιολογικά από το σταφύλι και πιο ειδικά από την ένωση του υδρόθειου. Οι βασικές μορφές του στις οποίες εντάσσονται η μοριακή και η ιοντική, είναι αυτή του ελεύθερου, του δεσμευμένου και του ολικού. Ο ελεύθερος θειώδης ανυδρίτης περιλαμβάνει τα:  $\text{SO}_2$  (μοριακός),  $\text{H}_2\text{SO}_3$ ,  $\text{HSO}_3^-$  και  $\text{SO}_3^{2-}$  (Sarudi & Kelemen, 1998). Ο μοριακός θειώδης ανυδρίτης παρέχει 500 φορές περισσότερο αντιμικροβιακή δράση από τα θειώδη ανιόντα. Μάλιστα σύμφωνα με τον κο Rehm, το επίπεδο του  $\text{SO}_2$  που αρκεί για την ανασχεση της ανάπτυξης ζυμών είναι περίπου 0,8 mg/l για τον *S. cerevisiae* και χαμηλότερα για τις υπόλοιπες ζύμες ή βακτήρια (Stott, 1994). Σύμφωνα τον κο Κοτσερίδη το ανιόν  $\text{HSO}_3^-$  αποτελεί την πιο δραστική μορφή ( $\text{HSO}_3^- > \text{SO}_2$ ) και το μεγαλύτερο μέρος του ολικού, καθώς έχει ως κύριο πλεονεκτήμα την παρεμπόδιση του καφετιάσματος. Αυτό συμβαίνει γιατί πρόκειται για την εξουδετερωμένη μορφή του θειώδους ανυδρίτη που προφυλάσσει τελικά τις φαινόλικές ενώσεις από την οξειδωσή τους (ενζυμικές οξειδώσεις στο γλεύκος ή χημικές στον οίνο). Σύμφωνα με τον κο Τσακίρη δραστικότερο κι από το ανιόν κατά 100

φορές είναι το  $\text{H}_2\text{SO}_3$ , που τροποποιεί τις οργανοληπτικές ιδιότητες του κρασιού και σχηματίζει σταθερές ενώσεις (ακεταλδεΰδη, σάκχαρα, κετονικά οξέα και άλλα). Επίσης, η έρευνα των Sayavedra – Soto και Montgomery έδειξε ότι αυτή η μορφή είναι υπεύθυνη για τη μη αναστρέψιμη απενεργοποίηση του ενζύμου φαινολοξειδάση. Απο την άλλη το ανιόν  $\text{SO}_3^{2-}$  βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις στο pH του κρασιού, γι'αυτό και διαθέτει χαμηλή ικανότητα κατανάλωσης του δεσμευμένου οξυγόνου (Boulton et al., 1999).

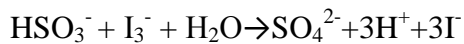


**Εικόνα 16:** Διάγραμμα διάστασης του διοξειδίου του θείου σε 14% αιθανόλη (v/v), ιοντική ισχύ 80mM σε διάφορες τιμές pH (Boulton R., 1999)

Ο δεσμευμένος θειώδης ανυδρίτης πρόκειται για μια δομή που βρίσκεται ενωμένος με αλδεΰδες ή κετόνες και οι δεσμοί σπάζουν μέσω υδρόλυσης (Sarudi & Kelemen, 1998). Οι χημικές ενώσεις που δημιουργούνται, όπως αυτές μετά την ένωση του θειώδη ανυδρίτη με σάκχαρα είναι ασταθείς, σχηματίζονται όμως κι άλλες σταθερές. (Κοτσερίδης Γ. & Προξενιά Ν., 2015). Ο ολικός είναι το άθροισμα του ελεύθερου και του δεσμευμένου θειώδους ανυδρίτη και αποτελεί μαζί με τον ελεύθερο τα δύο σημαντικότερα είδη για τον ποιοτικό έλεγχο του οίνου. Στο κρασί υπάρχει ισορροπία, ανάμεσα στον ελεύθερο και τον δεσμευμένο θειώδη ανυδρίτη κι έτσι όταν μειώνεται ο ελεύθερος λόγω οξείδωσης, ο δεσμευμένος θα αυξάνεται αναπληρώνοντας τα επίπεδα αυτά (Sarudi & Kelemen, 1998).

Ο προσδιορισμός του ελεύθερου θειώδη ανυδρίτη γίνεται καταρχήν με την κλασική μέθοδο της ογκομέτρησης χρησιμοποιώντας πρότυπο διάλυμα ιωδίου. Η ογκομέτρηση αυτή

βασίζεται στην οξειδοαναγωγική αντίδραση μεταξύ του  $\text{HSO}_3^-$  και του ιωδίου και η αντίδραση φαίνεται παρακάτω:



Ο στόχος είναι να γίνει η οξείδωση σε ισχυρά όξινο περιβάλλον για να μην αντιδράσει το ιώδιο με άλλες ενώσεις, όπως αλδεΐδες, σάκχαρα και πολυφαινόλες (Κοτσερίδης Γ. & Προξενιά Ν., 2015). Παρουσιάζει βέβαια σημαντικά μειονεκτήματα κατά κύριο λόγο στους ερυθρούς οίνους, εξαιτίας αναγωγών και έγχρωμων ενώσεων που παρεμποδίζουν τον προσδιορισμό αυτών. Άλλες τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό του θειώδους ανυδρίτη είναι βολταμετρικές, ηλεκτροχημικές, ποτεσνιομετρικές, κουλομετρικές, χρωματογραφίας GC ή HPLC και τα τελευταία χρόνια αυτοματοποιημένες όπως ποτεσνιομετρικές, φασματοφωτομετρικές και τεχνικές χημειοφωταύγειας (Sarudi & Kelemen, 1998).

#### **2.11.4) Chips Δρυός**

Οι οίνοι που ωριμάζουν σε δρύινα βαρέλια επηρεάζονται θετικά διότι πραγματοποιείται ο εμπλουτισμός τους με ενώσεις του ξύλου, λαμβάνουν χώρα αντιδράσεις παρουσία του οξυγόνου που εισέρχεται από τους πόρους του βαρελιού όπως και χημικές αντιδράσεις που απαιτούν χρόνο (για παράδειγμα η εστεροποίηση). Ακόμη και σε οίνους που προστίθενται chips δρυός κατά τη ζύμωση έχουν ως κοινό ευεργετικό αποτέλεσμα τον εμπλουτισμό των ενώσεων από το ξύλο. Το ξύλο που χρησιμοποιείται για την κατασκευή δρύινων βαρελιών τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως στην οινοποίηση είναι από την αμερικάνικη δρυ ( ποικιλία *Quercus alba*) και τη γαλλική δρυ (ποικιλία *Quercus petraea*) (Pérez-Coello et al., 2000). Χρησιμοποιούνται κι άλλα όπως βαρέλια ακακίας, καστανιάς και κερασιάς για τη μεγαλύτερη πολυπλοκότητα των οίνων (κυρίως ερυθρών) με κυρίαρχα αυτά της δρυός (Kanakaki et al., 2015). Οι διαφορές μεταξύ γαλλικής κι αμερικάνικης δρυός έχουν μελετηθεί εκτεταμένα και δε βρίσκονται τόσο στη χημική σύστασή τους όσο στην ποσότητα των συστατικών τους (Singleton, 1995). Οι δυο βασικές ενώσεις που μπορεί να βρεθούν σε οίνο που έχει έλθει σε επαφή με το ξύλο δρυός και απελευθερώνονται από αυτό είναι οι cis-β-μεθυλ-γ-οκταλακτόνη και η trans-β-μεθυλ-γ-οκταλακτόνη (Muller et al., 1973; Günter & Mosandl, 1987; Waterhouse & Towey, 1994; Masson et al., 1995; Piggott et al., 1995). Αυτές οι ενώσεις προσδίδουν τον χαρακτήρα του ξύλου στον οίνο (Chatonnet, Boidron, & Pons, 1990), είναι πιθανό όμως να εντοπιστούν κι άλλες (φουρφουράλη, ευγενόλη, βανιλίνη και η συριγκαλδεΐδη) (Pérez-Coello et al., 2000).

Το κάψιμο του ξύλου (συνήθως για τη δημιουργία των βαρελιών) εμπλουτίζει το αρωματικό προφίλ των οίνων (Fan et al., 2006; Michel et al., 2013; Chira & Teissedre, 2013) και εξαιτίας της θερμικής αποικοδόμησης των πολυμερών της λιγνίνης και της σελουλόζης παράγονται ενώσεις που προσδίδουν γεύση μελιού/καραμέλας (φουρφουράλη), καπνού (ευγενόλη, γουαϊακόλη), βανίλια(βανιλίνη,συριγκαλδεϋδη). Επίσης, με την εκτεταμένη θέρμανση των μη πτητικών συστατικών όπως οι ελλαγιτανίνες που έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες(García-Muñoz & Vaillant, 2014), καταστρέφονται (Kanakaki et al., 2015). Αποδείχθηκε στη μελέτη των (Kanakaki et al., 2015) ότι ο βαθμός τους καψίματος του ξύλου της δρυός σχετίζεται με την τελική αντιοξειδωτική ικανότητα. Αυτό συμβαίνει διότι το ξύλο που δεν είχε υποστεί κάψιμο περιείχε μεγαλύτερα ποσοστά ελλαγιτανινών και επακόλουθα μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα (Alañón et al., 2011).

Η μελέτη των Pérez-Coello et al., (2000) έγινε σε λευκό κρασί της ποικιλίας Airén όπου είχαν προστεθεί τα chips δρυός σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (4,7 και 12g/l) έδειξε ότι ο χαρακτήρας του ξύλου ήταν απειροελάχιστος στη συγκέντρωση 4 g/l, δυσάρεστα έντονος στη συγκέντρωση 12 g/l και αισθητός στη συγκέντρωση 7 g/l. Συμπέραναν λοιπόν ότι η προσθήκη chips δρυός σε λευκούς οίνους, επιτρέπει την διατήρηση κάποιων φρουτωδών αρωμάτων, ενώ στην ωρίμανση με δρυίνα βαρέλια συνήθως καταστρέφονται τα πτητικά αρώματα (λόγω οξειδώσεων, εξάτμισης). Σύμφωνα με αυτούς τα chips δρυός ενδείκνυνται για την χρήση τους σε λευκή οινοποίηση γιατί δεν είναι επιθυμητή η μείωση των φρουτωδών αρωμάτων ούτε η αλλαγή χρώματος λόγω οξείδωσης (Wilker & Gallander, 1988; Pérez-Coello et al., 2000). Οι (Gutierrez Afonso, 2002) υποστηρίζουν ότι η ποικιλία δρυός των chips παίζει σημαντικότερο ρόλο από ότι στο βαρέλι.

Σύμφωνα με τους (Rankine et. al.1989) τα chips δρυός είναι δυνατόν να προστεθούν στο γλεύκος κατά το σπάσιμο των ραγών και μέσα στον σπαστήρα, κατά την πίεση των σταφυλιών μέσα στο πιεστήριο, σε ανοξειδωτες δεξαμενές με τον οίνο ή και σε παλιά βαρέλια για την τόνωση του χαρακτήρα του βαρελιού (Gutierrez Afonso, 2002). Τα οφέλη που προφέρουν τα chips δρυός αποτελούν το ότι είναι εύκολα στη χρήση(Kanakaki et al., 2015), ωριμάζουν γρηγορότερα, έχουν πιο σκούρο χρώμα και διακρίνονται πτητικά αρώματα του ξύλου (Arapitsas, Antonopoulos, Stefanou, & Dourtoglou, 2004; Del Alamo-Sanza, Nevares-Dominguez, Carcel-Carcel & Navas-Gracia, 2004) όπως και των φρέσκων, φρουτωδών αρωμάτων (Sánchez-Palomo et al., 2017).

Σε μια ακόμη μελέτη, αυτή των αποδείχθηκε ότι τα ολικά φαινολικά και το ελλαγικό οξύ αυξήθηκαν μετά το κάψιμο του ξύλου, ενώ τα chips απο την ποικιλία δρυός *Quercus petraea* είχαν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Επίσης το μέγεθος των chips φάνηκε να

συσχετίζεται με τη συγκέντρωση των ελλαγιταννινών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας των κρασιών που ωριμάζουν παρουσία τους (Jordão et al., 2012).

#### **2.11.5) Ταννίνες γιγάρτων (seed tannin)**

Τα γίγαρτα των σταφυλιών περιέχουν συμπυκνωμένες ταννίνες ή προανθοκυανιδίνες ή προκυανιδίνες γιγάρτων οι οποίες συνεισφέρουν στη σταθερότητα του χρώματος (κυρίως στους ερυθρούς οίνους) και βελτιώνουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους. Η χρωματική σταθερότητα που προσφέρουν οφείλεται στην καθίζηση των πολυμερών των χρωστικών ουσιών (VenuGopal et al., 2018). Επηρεάζουν μαζί με τις ταννίνες των φλοιών την αίσθηση της στυφάδας και τη γεύση του πικρού (Kallithraka et al. 1997, Peleg et al. 1999, Chira et al. 2012, Casassa et al. 2013, Kyraleou et al. 2016b). Σύμφωνα με τον Jackson ,(2009) οι ταννίνες των γιγάρτων χαρακτηρίζονται «σκληρές» ενώ των φλοιών «μαλακές».

Σύμφωνα με τους (Vidal et al., 2010; VenuGopal et al., 2018) οι ταννίνες γιγάρτων έχουν χαμηλό βαθμό πολυμερισμού (mDP) και μαζί με τις ταννίνες των φλοιών συνεισφέρουν στην αίσθηση της στυπτικότητας και της γεύσης του πικρού στον οίνο (He; Oliveira et al., 2014;VenuGopal et al., 2018). Οι ταννίνες των γιγάρτων εκτός από μικρότερο βαθμό πολυμερισμού (mDp), έχουν και μεγαλύτερη συγκέντρωση σε σχέση με αυτές των φλοιών (Haslam, E. J. Et. al., 1996 ;Cos, P. et. al.,2000). Επίσης οι προανθοκυανιδίνες των γιγάρτων διαθέτουν μεγαλύτερο ποσοστό γαλοϋλιωμένων προκυανιδινών (galloylated procyanidins), ενώ οι προανθοκυανιδίνες των φλοιών μεγαλύτερο ποσοστό προδελφινιδινών (Câmara et al., 2019; Marks & Morris, 1993; Nagel & Graber, 1988). Όσον αφορά την εκχυλισματικότητα των ταννινών, οι προανθοκυανιδίνες των φλοιών απελευθερώνονται κατά την περίοδο που παραμένουν τα στέμφυλα στο γλεύκος (ερυθρή οινοποίηση). Βρίσκονται στο χυμοτόπιο των κυττάρων των φλοιών και αφού σπάσουν τα κυτταρικά τοιχώματα, μεταφέρονται στο γλεύκος (Scalbert, A.,2000). Αντιθέτως οι ταννίνες των γιγάρτων απελευθερώνονται μετά από μεγαλύτερη εκχύλιση και συμβαίνει όταν υπάρχει αλκοόλη στο μέσο (Hammerstone, J.F et. al. 2000; Cos et al., 2004). Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την εκχυλισματικότητα αυτών των δύο ειδών ταννινών είναι η ποικιλία του σταφυλιού, η φαινολική ωρίμανση και η χρήση διαυγαστικών μέσων (Cerpa-Calderón and Kennedy 2008, Hanlin et al. 2011, Casassa et al. 2013,Kyraleou et al., 2019).

Έχει αποδειχθεί ότι τα διμερή, τριμερή, ολιγομερή και πολυμερή προανθοκυανιδινών διαθέτουν τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα στην περίπτωση των ταννινών γιγάρτων (Yilmaz and Toledo,2004) σε σχέση με τις ταννίνες φλοιών. Αυτή η διαφορά οφείλεται στις

διαφορετικές συγκεντρώσεις μονομερών και ολιγομερών φλαβαν-3-ολών, όπου οι τελευταίες βρίσκονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στις προανθοκυανιδίνες γιγάρτων ( Kyraleou et al. 2017; Kyraleou et al., 2019). Οι προκυανιδίνες τύπου B βρίσκονται στον οίνο και το σταφύλι και οι B<sub>1</sub> έως B<sub>4</sub> χαρακτηρίζονται από το δεσμό C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub> και οι C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub> ( B<sub>5</sub> έως B<sub>8</sub>) ενώνοντας φλαβονοειδή (Ribereau-gayon et al., 2020). Για παράδειγμα η προκυανιδίνη B<sub>1</sub> βρίσκεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στους ερυθρούς οίνους όμως είναι πιθανό να βρεθεί και σε λευκούς οίνους διότι εκχυλίζεται από τους φλοιούς των σταφυλιών κατά την οινοποιητική διαδικασία (Gu L., 2003). Πιο σπάνια εμφανίζεται η δημιουργία δεσμών μεταξύ C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub> και η ένωση C<sub>4</sub> με C<sub>6</sub> με την εμφάνιση διαφορετικών δεσμών στις πρωταρχικές ή τερματικές μονάδες, που δημιουργεί τις τύπου A προκυανιδίνες (Ronald S. Jackson, 2008). Σε έρευνα που διεξήχθη για τη μελέτη των πέντε ερυθρών ελληνικών ποικιλιών Αγιωργίτικο, Μαυροτράγανο, Μανδηλαριά, Ξινόμαυρο και Κοτσιφάλι φάνηκε ότι αμφότερες προανθοκυανιδίνες έχουν αντιοξειδωτική ικανότητα, όμως σημαντικά υψηλότερη διαθέτουν οι ταννίνες γιγάρτων. Σύμφωνα με (Kyraleou et al., 2019) οι τιμές για την αντιοξειδωτική ικανότητα των ταννινών φλοιών είναι της τάξης m 0.14 to 0.24 mmol Trolox·g<sup>-1</sup> f.w. και των γιγάρτων από 0,04 έως 0,08 mmol Trolox·g<sup>-1</sup> f.w. αντίστοιχα. Αυτή η διαφορά τιμών έγκειται στην παρουσία των γαλοϋλιωμένων προϊόντων που έχουν εντοπιστεί στα εκχυλίσματα γιγάρτων (Kyraleou et al. 2017).

Είναι γνωστή η αντιμικροβιακή (σχετικά με βακτήρια και μύκητες) δράση τους εδώ και πολύ καιρό .Μάλιστα ο Scalbert (1991) ανέφερε ότι οι ταννίνες στο σύνολο τους παρεμποδίζουν την ανάπτυξη αυτών των μικροοργανισμών με τρεις μηχανισμούς. Αυτοί είναι η ανασχεση της δράσης των εξωκυτταρικών ενζύμων λόγω της στυπτικότητάς τους, η παρέμβαση στον μεταβολισμό τους και τρίτον η συμμετοχή τους στη δημιουργία συμπλεγμάτων μεταλλικών ιόντων που είναι απαραίτητα για την επιβίωση των μικροοργανισμών αυτών.

Εξαιτίας των φαρμακευτικών και βιολογικών ιδιοτήτων που κάποιες διαθέτουν όπως αντιφλεγμονώδεις, αντικαρκινικές και αντιμικροβιακές, θα φανούν χρήσιμο εργαλείο στο μέλλον για τη θεραπεία ασθενειών (Cos et al., 2004).

#### **2.11.6 Σελήνιο (Se)**

Το σελήνιο είναι ένα ιχνοστοιχείο απαραίτητο για τον άνθρωπο (Barbulescu, 2011) το οποίο μπορεί να βρεθεί στο έδαφος, το νερό και τρόφιμα (Fontanella et al., 2017). Συμμετέχει σε διάφορες λειτουργίες του ανοσοποιητικού συστήματος, προλαμβάνει τον καρκίνο, προστατεύει από την πορεία της γήρανσης και από καρδιαγγειακές παθήσεις (Flores-Mateo et al., 2006; Pérez-Corona et al., 2011, Fontanella et al., 2017). Παρουσιάζει τοξικότητα σε

επίπεδα πάνω από συγκεκριμένα όρια (Barbulescu, 2011) και η έλλειψή του οδηγεί σε καρδιακές, μυϊκές διαταραχές όπως και σε προβλήματα με τα οστά ή το ανοσοποιητικό σύστημα.

Η μορφή του σεληνίου με τη βιολογική δράση οφείλεται στην ύπαρξη του σεληνιοκυστεϊνικού αμινοξέος στις πρωτεΐνες (Kielczykowska et al., 2018). Η ημερίσια πρόσληψη σεληνίου σύμφωνα με το ινστιτούτο Ιατρικής είναι τα 50 mg ανά ενήλικα ενώ 80 mg στις Ηνωμένες Πολιτείες (Burk, 2002). Η ποσότητα του σεληνίου που περιέχεται στο κρασί φυσιολογικά είναι μικρή, όμως οι Frias et al. (2003) αναφέρουν ότι οι συγκεντρώσεις του σεληνίου που περιέχεται σε επιδόρπιους και ξηρούς επιτραπέζιους οίνους από την Ισπανία ποικίλουν από 2,6 έως 4,9 mg/L (Q. Liu, 2010). Σύμφωνα με τη μελέτη που παρουσιάζει ο Q. Liu, (2010), προσδιορίστηκε το περιεχόμενο ολικό σελήνιο και οι ανόργανες μορφές του σε δείγματα οίνου από το Beijing. Αποδείχθηκε πως όλα τους περιείχαν σελήνιο. Συγκεκριμένα βρέθηκε συγκέντρωση 7,0 με 94,0 ng /mL ολικού σεληνίου και από τις ανόργανες μορφές του, το Se (IV) συγκέντρωση 1,7 με 8,5 ng/ mL και το Se (VI), 1,8 με 14,7 ng /mL.

Η βιοενίσχυση των αγροτικών προϊόντων με σελήνιο, με σκοπό την παραγωγή εμπλουτισμένων τροφίμων σε αυτό λόγω της αντιοξειδωτικής του ικανότητας και της ανεπάρκειας σε σελήνιο της μεγάλης μερίδας του πληθυσμού. Σύμφωνα με τη μελέτη των Fontanella et al., (2017), τοποθετήθηκε διαφυλλικά σε αμπέλια της ποικιλίας Sangiovese σεληνιώδες νατριο κατά την προανθική περίοδο σε συγκέντρωση 100 mg Se L<sup>-1</sup>. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο οίνος που παράχθηκε από τα αμπέλια που εμπλουτίστηκαν με σελήνιο είχε διπλάσιο ποσοστό (47,5%) από αυτά που δεν εμπλουτίστηκαν (26%). Η κυρίαρχη μορφή του σεληνίου ήταν αυτή του Se(IV) εξαιτίας της διαφυλλικής εφαρμογής του στα αμπέλια

Σύμφωνα με μια άλλη μελέτη, αυτή των Barbulescu et. al, (2011) περιγράφεται μια φυσική ζύμωση για την οποία χρησιμοποιούνται βιοδραστικά προϊόντα (κονιορτοποιημένες ταννίνες γιγάρτων και φλοιών) από ιταλικά σταφύλια, εμπλουτισμένα με σελήνιο. Αυτό το προϊόν διαθέτει δηλαδή υψηλό ποσοστό ταννινών με υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα κάτι που επαληθεύτηκε (περισσότερο από 90% αντιοξειδωτική ικανότητα). Όπως κι ο εμπλουτισμένος με υψηλή συγκέντρωση σεληνίου οίνος με 94% αντιστοίχως. Αποδείχθηκε επίσης ότι ο ζυμομύκητας *Saccharomyces cerevisiae* έχει την ικανότητα να απορροφά σελήνιο (1,2 με 1,4 mg/g) όταν είναι διαθέσιμο στο περιβάλλον του (30mg/ml) κατά τη φάση ανάπτυξης. Το σελήνιο ενσωματώνεται από μια πρωτεΐνη που διαθέτει ο ζυμομύκητας και τον διαμορφώνει σε μια πηγή θρέψης (Barbulescu et. al, 2011). Επίσης οι ερευνητές Schrauzer, G. N. (2000)



αναφέρουν ότι όταν προστίθεται το σεληνιώδες νάτριο στην εκθετική φάση ανάπτυξης του ζυμομύκητα, αυξάνεται η περιεκτικότητα των πολυφαινολών στο προϊόν που παράγεται. Οι ίδιοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι υπάρχει συσχέτιση με τις ολικές ανθοκυάνες και του σεληνιώδους νατρίου (Barbulescu, I. et al., 2012, Vlahou et al., 2022).

Τέλος, σύμφωνα με τους Battin, E. E. και Brumaghim, J. L. (2009) ο πρωταρχικός αντιοξειδωτικός μηχανισμός του σεληνίου για να μην υποστούν τα κύτταρα οξειδωτική βλάβη είναι η σάρωση και η απομάκρυνση των ελεύθερων ριζών (ROS). Άλλοι δύο εξίσου σημαντικοί μηχανισμοί είναι η ένωση του σεληνίου με μέταλλα για αποφυγή της χημικής οξείδωσης και η παραγωγή της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx) που διασπά τις ελεύθερες ρίζες για τις οποίες υπεύθυνο είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου (Vlahou et al., 2022).

## **2.12) Αντιμετώπιση της οξείδωσης των οίνων**

Η πιο γνωστή αντιοξειδωτική ουσία που χρησιμοποιείται για τη συντήρηση του οίνου είναι ο θειώδης ανυδρίτης ο οποίος μάλιστα χρησιμοποιείται από αρχαιοτάτους χρόνους. Από τις αρχές του εικοστού αιώνα αποτελεί αναντικατάστατο εργαλείο των οινολόγων κατά την οινοποιητική διεργασία, κυρίως ως προστατευτικό από την οξείδωση. Είναι τόσο διαδεδομένο γιατί συνδυάζει την αντιοξειδωτική, με την αντιμικροβιακή και αντιοξειδασική δράση (Capece et al., 2020), προσδίδοντας μια σταθερότητα στο τελικό προϊόν (Ribéreau-Gayon et al., 2005). Χρειάζεται προσοχή στη χρήση του όμως, γιατί σε μεγάλες συγκεντρώσεις προσδίδει διαπεραστική οσμή και δυσάρεστη γεύση στον τελικό οίνο (Ribéreau-Gayon et al., 2005). Υπάρχει μια μεγάλη τάση για τη μείωση ή και αντικατάστασής του με σκοπό την καλύτερη υγεία των καταναλωτών (Raineau et al., 2023) γι' αυτό γίνονται προσπάθειες συνδυαστικής χρήσης άλλων ουσιών ή και μεθόδων.

Κάποια από τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση της οξείδωσης είναι η χρήση περιβάλλοντος διοξειδίου του άνθρακα, όπου το γλεύκος κατεργάζεται με αυτό το αέριο αμέσως μετά την έκθλιψη των σταφυλιών για να απομακρυνθεί ο ατμοσφαιρικός αέρας. Αυξάνεται όμως ο ελεύθερος θειώδης ανυδρίτης και η ευαισθησία του οίνου στο οξυγόνο.

Επίσης η χρήση της ουσίας PVPP (πολυβινυλ-πολύ-πυρολιδίνης) απορροφά τις πολυφαινόλες μικρού μοριακού βάρους και οδηγεί σε μια χρωματική σταθερότητα, χωρίς να επηρεάζει τα αρωματικά συστατικά του οίνου.

Η υπεροξυγόνωση του γλεύκους, δηλαδή η προσθήκη καθαρού οξυγόνου σε αυτό, έχει ως στόχο την οξείδωση των φαινολικών ουσιών (πολύ ευοξειδωτες) που δημιουργούν πολυμερή με καστανό χρώμα. Τα τελευταία καθιζάνουν και απομακρύνονται προτού ξεκινήσει η

αλκοολική ζύμωση, μια διαδικασία που δεν προτείνεται όταν δεν είναι επιθυμητό να χαθεί το αρωματικό δυναμικό.

Τέλος, υπάρχουν δύο ακόμη διεργασίες για την αντιμετώπιση της οξείδωσης, η ψύξη και η θέρμανση του γλεύκους. Η ψύξη συμβάλλει στην ελάττωση της κατανάλωσης του οξυγόνου και της ενζυμικής δράσης, όταν μάλιστα συμβαίνει γρήγορα χρειάζεται μικρότερη ποσότητα θειώδους ανυδρίτη. Η θέρμανση άνω των 35°C με 40°C βοηθά κυρίως στην αντιμετώπιση των οξειδασών, όπου ελαττώνεται η δράση τους, και στην σταθεροποίηση του χρώματος. Καταστρέφονται όμως οι γηγενείς ζύμες και τα πηκτινολυτικά ένζυμα (δυσκολία στη διαύγαση) (Τσακίρης Αργύρης, 2009).

Άλλες αντιοξειδωτικές ουσίες που χρησιμοποιούνται για κάποια από τις δράσεις του θειώδη ανυδρίτη είναι για παράδειγμα το ασκορβικό οξύ, η γλουταθειόνη, η λυσοζύμη, η χιτοζάνη, το σορβικό οξύ κι άλλες. Η λυσοζύμη και η χιτοζάνη έχουν αντιμικροβιακή δράση σε επιλεγμένους μικροοργανισμούς, η πρώτη δρά κυρίως κατά των βακτηρίων ενώ η δεύτερη κατά των βακτηρίων και μυκήτων. Το σορβικό κάλιο προστίθεται στα προϊόντα με χαμηλό δείκτη αλκοόλ και δρά ενάντια στους μύκητες, ενώ δεν αντιμετωπίζει τα γαλακτικά βακτήρια που το μεταβολίζουν και παράγουν δυσάρεστη οσμή.

Το ασκορβικό οξύ χρησιμοποιείται ευρέως στην οινοποίηση γιατί κι αυτό δεσμεύει το μοριακό οξυγόνο προστατεύοντας τα φαινολικά συστατικά και συνήθως χρησιμοποιείται με τον θειώδη ανυδρίτη. Τέλος, η γλουταθειόνη είναι ένα αντιοξειδωτικό που χρησιμοποιείται συνήθως στη λευκή οινοποίηση διότι στην ερυθρή προκαλεί αποσταθεροποίηση του χρώματος παρουσία οξυγόνου.

Επειδή οι καταναλωτές δείχνουν αυτό το όλο και εντονότερο ενδιαφέρον για κρασιά που δεν επιβαρύνουν την υγεία και με χαμηλές παρεμβάσεις, ο κόσμος του κρασιού δεν μένει ανεπηρέαστος. Για παράδειγμα, ήδη γίνονται προσπάθειες για παραγωγή οίνων χωρίς ή με ελάχιστα θειώδη αντιμετωπίζοντας την οξείδωση εναλλακτικά, τα λεγόμενα «φυσικά» κρασιά (Δρούζας Δημήτρης & Μπερής Ευάγγελος (PhD), 2021).

### 3) Υλικά και μέθοδοι

#### 3.1) Υλικά

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τις πειραματικές μεθόδους ήταν μεθανόλη (Scharlau, 99,90%), DPPH (διφαινυλ-1-πικρυλυδραζυλ), γαλλικό οξύ (Merck, >98%), ανθρακικό νάτριο (Honeywell Fluka, >99,8%), αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (Merck), αντιδραστήριο Trolox (Sigma, 97%), αιθανόλη (Merck, >99,5%), καυστικό νάτριο (Merck, >99%),θειικό οξύ (Honeywell,95-97%). Επίσης, προστέθηκαν ως αντιοξειδωτικές ουσίες το ασκορβικό οξύ(L-Ascorbic acid), η γλουταθειόνη (GSH), το μεταδιθειώδες κάλιο (Sodium metabisulfite), chips δρυός, ταννίνες γιγάρτων και το σελήνιο (Se).

#### 3.2) Όργανα

##### 3.2.1) Φασματοφωτόμετρο

Σύμφωνα με τον κ.Χατζηγιάννου, η φασματοφωτομετρία υπεριώδους- ορατού (200-800 nm) χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό ουσιών κατά κύριο λόγο, συσχετίζοντας το ποσοστό απορρόφησης της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας και της συγκέντρωσης της ουσίας που είναι υπεύθυνη για την απορρόφηση.

Σύμφωνα με τον νόμο του Beer, όταν μια μονοχρωματική ακτινοβολία διέλθει από το διάλυμα το οποίο περιέχει την ουσία X, η ισχύς της ακτινοβολίας ελαττώνεται προοδευτικά λόγω απορρόφησης από την ουσία X. Η ελάττωση αυτή της ισχύος συσχετίζεται με τη συγκέντρωση της ουσίας X και την απόσταση που έχει διανύσει η δέσμη μέσα στο διάλυμα. Αυτή η σχέση εκφράζεται μέσω του νόμου των Lambert-Beer, όπου έχει επικρατήσει η ονομασία νόμος του Beer.

Ο νόμος του Beer διατυπώνεται παρακάτω:

$$A = \log \frac{P}{P_0} = -\log T = \log \left( \frac{100}{\%T} \right) = abc_{g/l} = \epsilon bc_{mol/l}$$

Όπου A=απορρόφηση

P=ισχύς εξερχόμενης ακτινοβολίας

P<sub>0</sub>= ισχύς προσπίπτουσας ακτινοβολίας

T=διαπερατότητα (ίση με  $\frac{P}{P_0}$ )

a=σταθερά αναλογίας, όταν η c εκφράζεται σε g/l καλείται απορροφητικότητα κι έχει μονάδες μέτρησης g<sup>-1</sup>Lcm<sup>-1</sup>

b=εσωτερικό πάχος κυψελίδας, δηλαδή το μήκος διαδρομής που διανύθηκε μέσα στο διάλυμα και εκφράζεται σε cm

ε=σταθερά αναλογίας όταν η c εκφράζεται σε mol/L, όπου καλείται μοριακή απορροφητικότητα. Έχει μονάδες mol<sup>-1</sup>Lcm<sup>-1</sup> ή M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>.

Η απορροφητικότητα  $a$  χρησιμοποιείται όταν είναι άγνωστη η φύση της ουσίας  $X$  που απορροφά, δηλαδή και το μοριακό της βάρος και η μοριακή απορροφητικότητα  $\epsilon$ , στις περιπτώσεις όπου θέλουμε να συγκρίνουμε ποσοτικά με την απορρόφηση διαφόρων ουσιών γνωστού μοριακού βάρους.

Επειδή όμως είναι αδύνατον να γίνει μέτρηση των  $P$  και  $P_0$  για τον προσδιορισμό της απορρόφησης πρακτικά συγκρίνεται η ισχύς της ακτινοβολίας του δείγματος με την ισχύ της ακτινοβολίας του τυφλού. Οπότε ο νόμος του Beer εκφράζεται ως εξής:

$$A = \epsilon bc = \log \frac{P}{P_0} = \log \frac{P_{\text{τυφλό}}}{P_{\text{δείγμα}}}$$

Στην πράξη χρησιμοποιούμε καμπύλη αναφοράς διότι η τιμή  $\epsilon$  διαφέρει ανάλογα με το φασματοφωτόμετρο. Η καμπύλη αναφοράς κατασκευάζεται με βάση μια σειρά πρότυπων διαλυμάτων (με γνωστές συγκεντρώσεις), όπου στον άξονα  $y$  βρίσκονται οι τιμές της απορρόφησης  $A$  και στον άξονα  $x$  η συγκέντρωση ( $c$ ).

Το φασματοφωτόμετρο Helios Omega, UV-VIS που χρησιμοποιήθηκε ήταν μονής δέσμης, της εταιρίας Thermo Scientific.

### **3.2.2) Αυτόματος τιτλοδότης Oeno-20**

Ο ακριβής προσδιορισμός του ελεύθερου και ολικού θειώδη ανυδρίτη πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του αυτόματου τιτλοδότη Oeno 20 (Προϊόν της Oeno Bio SARL). (Oeno Bio, Borde Neuve, 11170 Saint Martin le Vieil, France).

### **3.2.3) Σύστημα υγρής χρωματογραφίας (HPLC)**

Οι φαινολικές ενώσεις που περιέχονται στα δείγματα διαχωρίστηκαν και ανιχνεύθηκαν με τη βοήθεια του υγρού χρωματογράφου HPLC και συγκεκριμένα του μοντέλου Waters 2695 HPLC Separations Module (Waters Corporation, 34 Maple Street Milford, MA 01757, U.S.A (Vlachou et al., 2022).

## **4) Πειραματική πορεία**

### **4.1) Δείγματα προς ανάλυση**

Τα δείγματα που μελετήθηκαν ήταν:

α) Μάρτυρας (control)

β) Το δείγμα με τη μικρότερη συγκέντρωση Γλουταθειόνης (GSH) 10 mg/l και με τη μέγιστη 20 mg/l

γ) Το δείγμα με τη μικρότερη συγκέντρωση Ασκορβικού οξέος (ascorbic acid) 100mg/l και με τη μέγιστη 200 mg/l

δ) Το δείγμα με τη μικρότερη συγκέντρωση Metabisulfite 20 mg/l και με τη μέγιστη 40 mg/l

ε) Το δείγμα με τη μικρότερη συγκέντρωση Chips δρυός 2,5 g/l και με τη μέγιστη 5g/l

στ) Το δείγμα με τη μικρότερη συγκέντρωση ταννίνες γιγάρτων (GST) 1 g/l και με τη μέγιστη 2 g/l

ι) Το δείγμα με τη μικρότερη συγκέντρωση σεληνίου 1,25mg/l (Se) (δηλαδή 25 μg/20ml MeOH  $\geq$  99,8%) και με τη μέγιστη 2,5 mg/l (δηλαδή 50 μg/20 ml MeOH  $\geq$  99,8%)

### **4.2) Θερμοκρασία πειράματος της οξειδωσης**

Το πείραμα της επιταχυνόμενης οξειδωσης εφαρμόστηκε στη θερμοκρασία των 55°C στην οποία ρυθμίστηκε φούρνος.

### **4.3) Προετοιμασία δειγμάτων**

Αρχικά να σημειωθεί ότι η ποσότητα για τον προσδιορισμό του θειώδη ανυδρίτη όλων των δειγμάτων αποθηκεύτηκε ξεχωριστά σε κωνικές φιάλες των 50 ml με πάμα. Η ποσότητα για όλες τις υπόλοιπες μετρήσεις τοποθετήθηκε σε γυάλινους σωλήνες με πάμα των 7 ml, ένα για την κάθε μέρα δειγματοληψίας.

### **4.4) Δειγματοληψίες**

Κατά τη διάρκεια του πειράματος της επιταχυνόμενης οξειδωσης μετρήθηκε η απορρόφηση στα 420 nm, τα επίπεδα του θειώδη ανυδρίτη (ελεύθερου και ολικού), η αντιοξειδωτική ικανότητα και προσδιορίστηκε το σύνολο των φαινολικών ενώσεων. Συγκεκριμένα οι μετρήσεις για την απορρόφηση στα 420 nm, την αντιοξειδωτική ικανότητα (με τη μέθοδο DPPH) και το σύνολο των φαινολικών ενώσεων(με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu) πραγματοποιήθηκαν από την ημέρα 0 έως και 12 για κάθε πείραμα επιταχυνόμενης οξειδωσης. Ο προσδιορισμός του θειώδη ανυδρίτη, ελεύθερου και ολικού, έγινε τις μέρες 0,1,4,8 και 12. Επίσης δείγματα από 0<sup>η</sup> και την 12<sup>η</sup> μέρα αναλύθηκαν μέσω της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης HPLC για τον προσδιορισμό των φαινολικών ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους.

## 5) Μέθοδοι

### 5.1) Απορρόφηση στα 420 nm

Η πειραματική πορεία της επιταχυνόμενης οξείδωσης για την αξιολόγηση του βαθμού καφετιάσματος πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το μοντέλο που υποδεικνύεται στις εργαστηριακές ασκήσεις της Οινολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (Γ. Κοτσερίδης et al., 2017). Σκοπός του μοντέλου αυτού που χρησιμοποιήθηκε και σε αυτή την περίπτωση, είναι να παρθούν σε σύντομο χρονικό διάστημα συγκρίσιμα αποτελέσματα με αυτά των πραγματικών συνθηκών αποθήκευσης του οίνου (Nenadis & Paraskevopoulou, 2016). Δείγματα οίνου της ποικιλίας Ρομπόλα μετά την προσθήκη των αντιοξειδωτικών ουσιών, αποθηκεύτηκαν σε 12 vials των 7 ml (δηλαδή συμπληρωμένα κατά τα 2/3) και παρέμειναν σε θερμοκρασία 55°C σε επωαστικό κλίβανο για 12 ημέρες. Οι μετρήσεις ξεκίνησαν την ημέρα 0 όπου προστέθηκαν οι αντιοξειδωτικές ουσίες στον οίνο και στη συνέχεια κάθε 24 ώρες γινόταν μέτρηση της απορρόφησης στο φασματοφωτόμετρο (στα 420 nm) χρησιμοποιώντας κυψελίδα χαλαζία 1cm. Για τον μηδενισμό του οργάνου χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο νερό. Μετά το πέρας των 12 ημερών κατασκευάστηκε γραφική παράσταση για την απεικόνιση της πορείας του καφετιάσματος. Χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο εξίσωσης μηδενικής τάξης για τις τιμές που λήφθηκαν από το φασματοφωτόμετρο στα 420 nm. Η εξίσωση που περιγράφει τα αποτελέσματα είναι δηλαδή της μορφής:

$$A_{420} = A(0)_{420} + kt$$

Όπου  $A_{420}$ : η τιμή που σχετίζεται με τη συγκέντρωση των προϊόντων του καφετιάσματος

$A(0)_{420}$ : η τιμή που σχετίζεται με την αρχική συγκέντρωση των προϊόντων αυτών

k: ο ρυθμός της αντίδρασης που υπολογίστηκε από την κλίση της ευθείας που σχηματίζεται όπου οι τιμές του άξονα x αναπαριστούν το χρόνο και όπου οι τιμές του άξονα y η τιμές τις απορρόφησης στα 420nm

t :ο χρόνος (μέρες)

Όσο χαμηλότερες είναι οι τιμές του k δημιουργείται το καφέ χρώμα με αργό ρυθμό (Kotseridis et al., n.d.).

Επίσης μια ακόμα παράμετρος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η  $\% \Delta A_{420nm}$  για την αξιολόγηση του βαθμού καφετιάσματος. Αυτή υπολογίστηκε ως εξής:

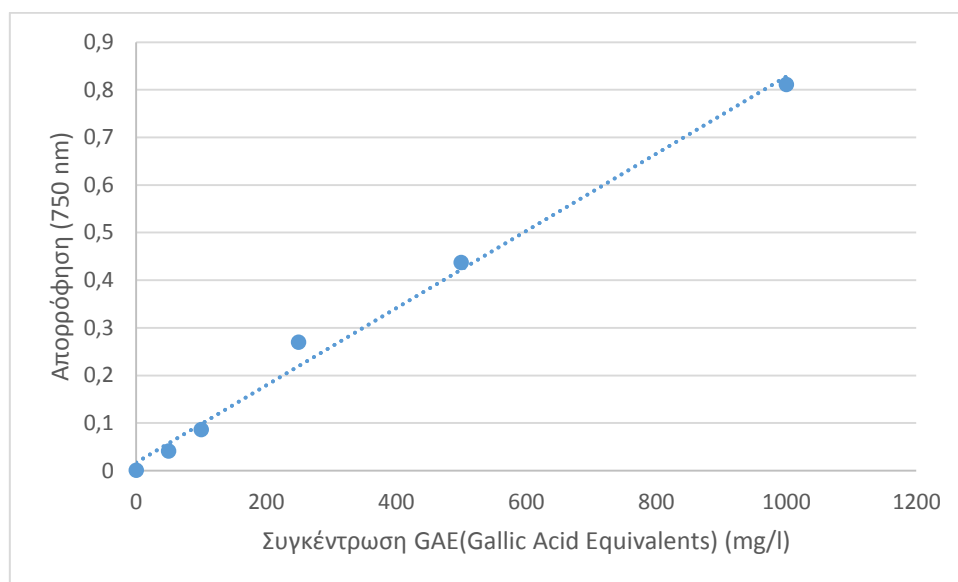
$$\% \Delta A_{420nm} = 100 * [(A_{420d12} - A_{420d0}) / A_{420d0}]$$

Όπου  $A_{420d0}$  η απορρόφηση στα 420 nm την ημέρα 0

και  $A_{420d12}$  η απορρόφηση την ημέρα 12 (Κοτσερίδης Γ. & Προξενιά Ν., 2015)

## 5.2) Μέθοδος Folin-Ciocalteu (Προσδιορισμός των ολικών φαινολικών ενώσεων)

Ο δείκτης Folin-Ciocalteu προσδιορίζει το σύνολο των φαινολικών ουσιών που περιέχονται σε δείγμα οίνου με τη χρήση φωτόμετρου και στηρίζεται στην οξείδωση των ενώσεων αυτών από το αντιδραστήριο Folin. Πρόκειται για τη μέτρηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου χωρίς την ικανότητα για τη διάκριση των συστατικών περεταίρω όπως μονομερή ή διμερή φαινολικά συστατικά. Ως προς το βασικό αντιδραστήριο της μεθόδου, το Folin-Ciocalteu, αυτό περιέχει σύνθετα πολυμερή ιόντα που σχηματίζονται από φωσφομολυβδαινικά ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) και φωσφοβολφραμικά ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) ετεροπολυμερή οξέα. Τα φαινολικά ιόντα οξειδώνονται με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων. Πιο συγκεκριμένα, κατά την οξείδωση των φαινολών, ανάγεται το αντιδραστήριο Folin προς μείγμα οξειδίων του βολφραμίου ( $W_8O_{23}$ ) κυανού χρώματος και του μολυβδαινίου ( $Mo_8O_{23}$ ). Ανάλογα με τη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων, παρουσιάζεται μέγιστη απορρόφηση στα 750 nm από το σχηματιζόμενο κυανό χρώμα. Για τη ρύθμιση της αλκαλικότητας, χρησιμοποιείται διάλυμα  $Na_2CO_3$  και οι φαινολικές ουσίες που προσδιορίζονται, εκφράζονται συχνά σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (Κοτσερίδης Γ. & Προξενιά Ν., 2015). Η πρότυπη καμπύλη που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του ολικού φαινολικού περιεχομένου είναι η ακόλουθη. Η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών που περιέχονται σε κάθε δείγμα οίνου είναι εκφρασμένη με τη μορφή χιολιογραμμαρίων γαλλικού οξέος GAE ανά λίτρο.



**Διάγραμμα 1:** Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος

$$y = 0,0008x + 0,0171$$

$$R^2=0,9924$$

### 5.3) Μέθοδος DPPH-Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας

Για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των οίνων, δηλαδή της ικανότητας εξουδετέρωσης των ελεύθερων ριζών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της σταθερής ρίζας DPPH (2,2-διφαινυλο-1-πικρυλοϋδραζύλιο). Σύμφωνα με τον Blois (1958), για πρώτη φορά χρησιμοποιήθηκε η ελεύθερη ρίζα του DPPH ( $C_{18}H_{12}N_5O_6$ ) για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης καθώς διαθέτει την ικανότητα σάρωσης αντιοξειδωτικών ουσιών (Kedare & Singh, 2011). Οι αντιοξειδωτικές ενώσεις παρέχουν άτομα υδρογόνου στο άτομο αζώτου της ελεύθερης ρίζας (Vlahou et al., 2022).

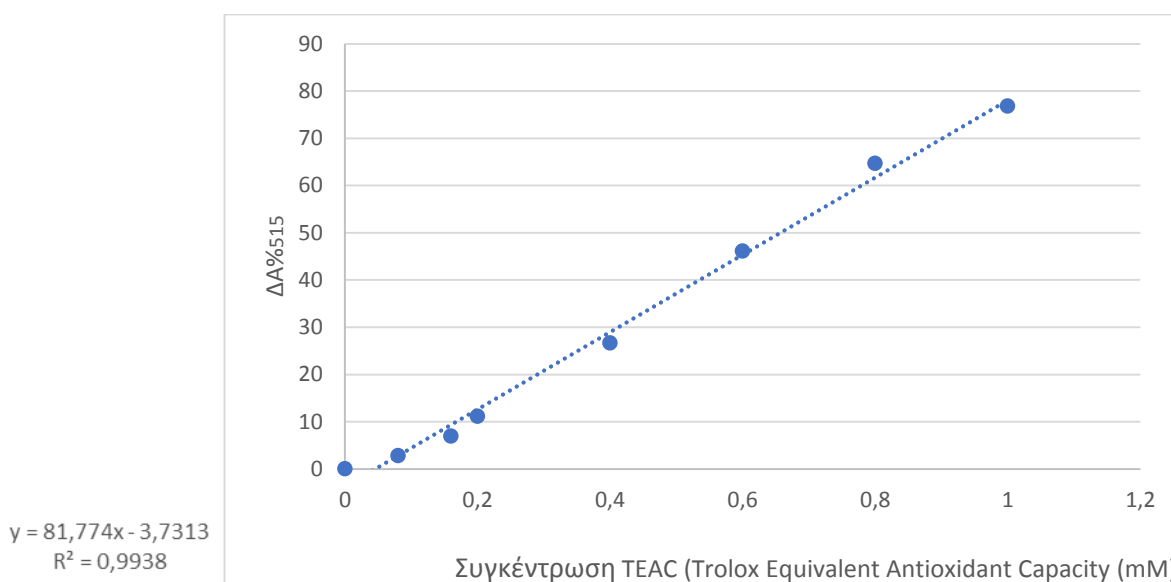
Ο υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Arpous et al. (2001) για τη μέθοδο. Κατά την πειραματική πορεία τα δείγματα κρασιού αραιώθηκαν 1:1 και στη συνέχεια προστέθηκε μεθανολικό διάλυμα DPPH. Για το κάθε δείγμα λήφθηκαν δύο μετρήσεις στο φασματοφωτόμετρο (515 nm), μία τη χρονική στιγμή  $t=0$  και μία τη χρονική στιγμή  $t=30$  min. Με το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος υπολογίστηκε το  $\Delta A\%$  με βάση τον επακόλουθο μαθηματικό τύπο:

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

Όπου  $A_{515(t=0)}$  αντιστοιχεί στη χρονική στιγμή  $t=0$  min

$A_{515(t=30)}$  αντιστοιχεί στη χρονική στιγμή  $t=30$  min

Παρατίθεται η πρότυπη καμπύλη βάσει της οποίας υπολογίστηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα κάθε δείγματος εκφρασμένη σε ισοδύναμα Trolox TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) σε mM.

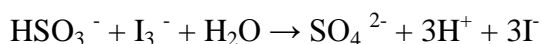


**Διάγραμμα 2:** Πρότυπη καμπύλη Trolox



#### **5.4) Προσδιορισμός θειώδη ανυδρίτη**

Ταυτόχρονα με την επιταχυνόμενη οξειδωση ελέγχονταν τα επίπεδα του ελεύθερου και ολικού θειώδη ανυδρίτη κατά τη διάρκεια του δωδεκαημέρου, ανά τακτά χρονικά διαστήματα μέσω τιτλοδότησης. Η τιτλοδότηση αυτή πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του αυτόματου οργάνου OENO 20. Ο προσδιορισμός βασίστηκε σύμφωνα με την Vlahou E. (2022) στην οξειδοαναγωγική αντίδραση του διοξειδίου του θείου με ιώδιο σε όξινες συνθήκες. Αυτό συμβαίνει για να μην αντιδράσει το ιώδιο με πολυφαινόλες, αλδεϋδες, σάκχαρα και άλλους αναγωγικούς παράγοντες.



Η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

##### **5.4.1) Μέτρηση Ελεύθερου**

Για τον προσδιορισμό του ελεύθερου θειώδη ανυδρίτη χρησιμοποιήθηκαν 20 ml δείγματος κρασιού και 2ml θειϊκού οξέος αραιωμένο κατά 1:3, με πρότυπο διάλυμα ιωδίου (N/50). Αρχικά σε ποτήρι ζέσεως των 50 ml τοποθετούνται η ποσότητα του δείγματος και το θειϊκό οξύ, στη συνέχεια αναδεύονται και αμέσως μετά ξεκινά η ογκομέτρηση. Στο τελικό σημείο της ογκομέτρησης όπου ακούγεται χαρακτηριστικός ήχος, αναγράφονται τα ml που έχουν χρησιμοποιηθεί στην προχοΐδα και αυτά ισοδυναμούν με τη συγκέντρωση του ελεύθερου θειώδους ανυδρίτη εκφρασμένη σε mg/l.

##### **5.4.2) Μέτρηση Ολικού**

Για τον προσδιορισμό του ολικού θειώδη ανυδρίτη χρησιμοποιήθηκαν 20 ml δείγματος κρασιού και 4 ml θειϊκού οξέος αραιωμένο κατά 1:3, 2 ml διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου 5N με πρότυπο διάλυμα ιωδίου(N/50). Αρχικά τοποθετούνται η ποσότητα του δείγματος κρασιού και το υδροξείδιο του νατρίου σε ένα ποτήρι ζέσεως των 50 ml και στη συνέχεια, αφού έχει μείνει το διάλυμα σε ηρεμία για 10 λεπτά, προστίθεται η ποσότητα του θειϊκού οξέος. Μόλις προστεθεί και το θειϊκό οξύ ξεκινά η ανάδευση και αμέσως μετά η ογκομέτρηση. Στο τελικό σημείο της ογκομέτρησης όπου ακούγεται χαρακτηριστικός ήχος, αναγράφονται τα ml που έχουν χρησιμοποιηθεί στην προχοΐδα και αυτά ισοδυναμούν με τη συγκέντρωση του ολικού θειώδους ανυδρίτη εκφρασμένη σε mg/l.

#### **5.5) Προσδιορισμός φαινολικών ενώσεων μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC)**

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC) αποτελεί μια από τις γνωστότερες τεχνικές διαχωρισμού της αναλυτικής χημείας καθώς είναι μια τεχνική με μεγάλη ευαισθησία, ικανή να προσδιορίσει ποσοτικά και να διαχωρίσει διάφορα είδη ουσιών (για παράδειγμα μη πτητικές ή θερμικά ευαίσθητες ουσίες). Βάσει πολικότητας της στατικής και της κινητής

φάσης οι χρωματογραφήες κατανομής διακρίνονται σε κανονικής (πολική στατική φάση, μη πολική κινητή φάση) και αντίστροφης φάσης (μη πολική στατική φάση, πολική κινητή φάση). Στη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (reversed phase chromatography) η στατική φάση είναι συνήθως υδρογονάνθρακας (μέρος της ορανοπυριτικής ένωσης του σιλοξανίου) και η κινητή φάση ένας πολικός διαλύτης όπως μεθανόλη, ακετονιτρίλιο και τετραϋδροφουράνιο. Η ομάδα R του σιλοξανίου είναι μια αλυσίδα C18(n-δεκαοκτύλιο) ή C8(n-οκτύλιο). Το πιο πολικό συστατικό εκλύεται πρώτα και όσο περισσότερο πολική είναι η κινητή φάση τόσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος έκλουσης. Η HPLC αντίστροφης φάσης χρησιμοποιείται κατά 75 % για το διαχωρισμό ουσιών διότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως κινητή φάση το νερό (φθηνός, μη τοξικός διαλύτης), η μάζα μεταφέρεται γρήγορα στις μη πολικές στατικές φάσεις όπως και η ισορροπία του διαλύτη επιτυγχάνεται γρήγορα κατά τη βαθμιδωτή έκλυση (Skoog D. A. et al., 2007).

Για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων φαινολικών ενώσεων μικρού μοριακού βάρους των δειγμάτων οίνου από τις ημέρες 0 και 12 του επιταχυνόμενου καφετιάσματος, για την κάθε αντιοξειδωτική ουσία, χρησιμοποιήθηκε υγρός χρωματογράφος υψηλής πίεσης αντίστροφης φάσης (RP-HPLC). Χρησιμοποιήθηκαν δύο διαλύτες A και B, ο A που αποτελείται από 1% ο-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> και ο B από μείγμα κατά 60-40 1% ο-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> και C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>N ακετονιτρίλιο. Η στήλη ξεπλένεται με 60:40 μείγματος μεθανόλης/νερού και η διάρκεια ανάλυσης του κάθε δείγματος είναι 165 λεπτά.

Στη συγκεκριμένη πειραματική πορεία χρησιμοποιήθηκαν δοχεία (vials) των 1,5 ml πλήρωσης των δειγμάτων, που τοποθετήθηκαν στον χρωματογράφο (σύστημα εισαγωγής) για την ανάλυση των χρόνων έκλουσης. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε στα 280nm και 320 nm και με το πέρας της ανάλυσης λήφθηκαν τα χρωματογραφήματα από το σύστημα καταγραφής των αποτελεσμάτων. Με τη χρήση των τελευταίων ποσοτικοποιήθηκαν οι φαινολικές ενώσεις βάσει της αντίστοιχης ταυτότητας της κάθε ένωσης κι αφού έγινε χρήση της αντίστοιχης πρότυπης καμπύλης.

## **6) Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων**

Για κάθε μια μεταχείριση και για όλες τις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν, με δύο επαναλήψεις τη φορά, οι τελικές τιμές των αποτελεσμάτων υπολογίστηκαν βάσει μέσου όρου. Επιπροσθέτως, βρέθηκε η τυπική απόκλιση για την κάθε τελική τιμή ξεχωριστά κι όλοι αυτοί οι υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του προγράμματος Statistica 8.0360.0. Με βάση την ανάλυση one-way ANOVA (ανάλυση διασποράς με έναν παράγοντα), συγκρίθηκαν οι τιμές των δειγμάτων για την κάθε μεταχείριση και μέθοδο αντίστοιχα. Ως προς τις τιμές με σημαντική στατιστική διαφορά, έγινε χρήση της μεθόδου Turkey HSD (honest significant difference) με  $p < 0,05$  και επίπεδο σημαντικότητας 0,05.

## 7) Αποτελέσματα και συζήτηση

### 7.1) Απορρόφηση 420 nm

Η έναρξη της χημικής οξείδωσης των οίνων συμβαίνει όταν δημιουργούνται ρίζες υδροξυλίου (OH) σε ελεύθερη μορφή, παρουσία καταλύτη συνήθως μετάλλου (για παράδειγμα  $Fe^{2+}$ ). Οι φαινολικές ενώσεις που περιέχονται στο κρασί αποτελούν τα δυνητικά υποστρώματα οξείδωσης των ριζών υδροξυλίου κι έτσι δημιουργούνται τα πολυμερή καστανού χρώματος ή προϊόντα του καφετιάσματος/αμαύρωσης. Κατά τη διάρκεια του καφετιάσματος, οι οξειδωμένες μορφές των φαινολών πολυμερίζονται. Σύμφωνα με τον Waterhouse μια πιθανή εξήγηση της συμπύκνωσης των φαινολικών υπό αναερόβιες συνθήκες είναι αυτή που μπορεί να οφείλεται για παράδειγμα στην ακεταλδεΐδη (Kotseridis et al., n.d.; Waterhouse, 2002). Η οξείδωση όλων των δειγμάτων μετά από κάθε μεταχείριση και πιο συγκεκριμένα η αλλαγή του χρώματός τους, εκτιμήθηκε με τη βοήθεια φωτόμετρου. Οι απορροφήσεις των δειγμάτων στα 420 nm αξιολογήθηκαν με τη χρήση του φωτόμετρου κάθε 24 ώρες για το διάστημα των 12 ημερών, όπου η δωδέκατη μέρα ορίστηκε ως το τελικό σημείο των μετρήσεων.

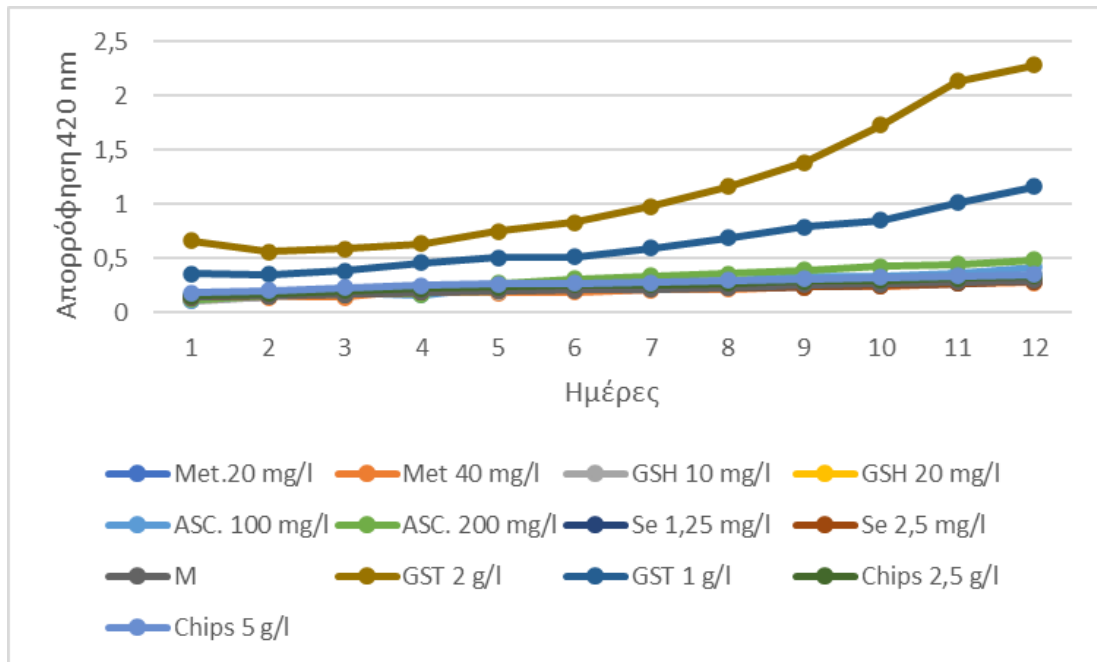
Με βάση το μοντέλο των Sioumis et al. (2004); Vlahou et. al. (2022) που χρησιμοποιήθηκε, αξιολογήθηκε η οξειδωτική ικανότητα των δειγμάτων, το ποσοστό και ο ρυθμός του καφετιάσματος σε κάθε μεταχείριση. Παρατίθενται οι πίνακες με τα αποτελέσματα των απορροφήσεων των δειγμάτων μετά από την κάθε μεταχείριση κατά τη διάρκεια του χρονικού διαστήματος των 12 ημερών σε θερμοκρασία 55°C. Χρειάζεται να επισημανθεί ότι οι τιμές που έχουν διαφορετικό εκθέτη, έχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05.

**Πίνακας 2: Απορρόφηση 420nm**

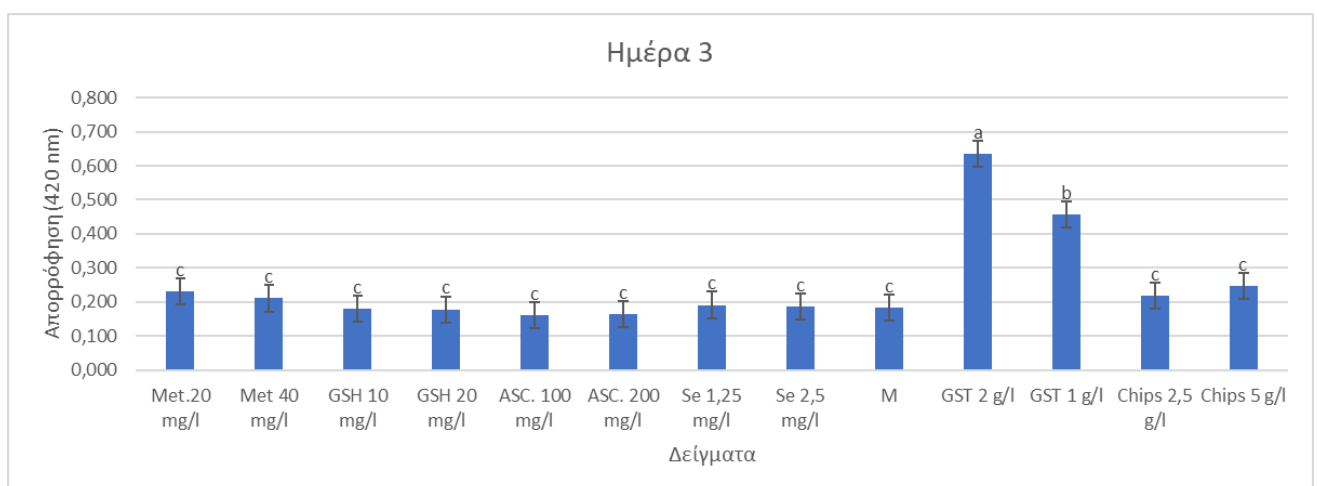
<b>Δείγματα 55°C</b>	<b>Ημέρα 0</b>	<b>Ημέρα 1</b>	<b>Ημέρα 2</b>	<b>Ημέρα 3</b>	<b>Ημέρα 4</b>	<b>Ημέρα 5</b>	<b>Ημέρα 6</b>
<b>Met 20 mg/l</b>	0,118 <sup>ef</sup> ±0,000	0,145 <sup>cd</sup> ±0,007	0,153 <sup>c</sup> ±0,003	0,1605 <sup>c</sup> ±0,011	0,188 <sup>e</sup> ±0,001	0,202 <sup>df</sup> ±0,014	0,216 <sup>de</sup> ±0,007
<b>Met 40 mg/l</b>	0,131 <sup>def</sup> ±0,000	0,135 <sup>d</sup> ±0,002	0,141 <sup>c</sup> ±0,010	0,164 <sup>c</sup> ±0,009	0,178 <sup>e</sup> ±0,006	0,189 <sup>d</sup> ±0,000	0,209 <sup>c</sup> ±0,016
<b>GSH 10 mg/l</b>	0,1065 <sup>f</sup> ±0,003	0,145 <sup>cd</sup> ±0,004	0,166 <sup>c</sup> ±0,007	0,179 <sup>c</sup> ±0,010	0,193 <sup>c</sup> ±0,005	0,207 <sup>def</sup> ±0,003	0,221 <sup>de</sup> ±0,008
<b>GSH 20 mg/l</b>	0,1175 <sup>ef</sup> ±0,011	0,152 <sup>cd</sup> ±0,009	0,167 <sup>c</sup> ±0,009	0,178 <sup>c</sup> ±0,010	0,201 <sup>de</sup> ±0,004	0,220 <sup>def</sup> ±0,001	0,2255 <sup>de</sup> ±0,006
<b>ASC. 100 mg/l</b>	0,113 <sup>ef</sup> ±0,006	0,151 <sup>cd</sup> ±0,000	0,182 <sup>c</sup> ±0,017	0,215 <sup>c</sup> ±0,019	0,234 <sup>cde</sup> ±0,013	0,260 <sup>cef</sup> ±0,019	0,279 <sup>cd</sup> ±0,028
<b>ASC. 200 mg/l</b>	0,118 <sup>ef</sup> ±0,000	0,153 <sup>cd</sup> ±0,003	0,193 <sup>c</sup> ±0,006	0,2105 <sup>c</sup> ±0,028	0,264 <sup>c</sup> ±0,015	0,306 <sup>c</sup> ±0,025	0,333 <sup>c</sup> ±0,000
<b>Se 1,25mg/l</b>	0,149 <sup>d</sup> ±0,009	0,153 <sup>cd</sup> ±0,002	0,164 <sup>c</sup> ±0,002	0,191 <sup>c</sup> ±0,019	0,199 <sup>e</sup> ±0,001	0,000±0,000	0,2175 <sup>de</sup> ±0,002
<b>Se 2,5 mg/l</b>	0,1395 <sup>de</sup> ±0,009	0,150 <sup>cd</sup> ±0,001	0,1695 <sup>c</sup> ±0,006	0,187 <sup>c</sup> ±0,028	0,198 <sup>e</sup> ±0,002	0,207 <sup>def</sup> ±0,003	0,221 <sup>de</sup> ±0,004
<b>M</b>	0,136 <sup>def</sup> ±0,005	0,149 <sup>cd</sup> ±0,006	0,1663 <sup>c</sup> ±0,000	0,184 <sup>c</sup> ±0,005	0,200 <sup>de</sup> ±0,002	0,209 <sup>def</sup> ±0,002	0,216 <sup>de</sup> ±0,001
<b>GST 2 g/l</b>	0,659 <sup>a</sup> ±0,000	0,555 <sup>a</sup> ±0,023	0,588 <sup>a</sup> ±0,051	0,635 <sup>a</sup> ±0,021	0,745 <sup>a</sup> ±0,001	0,826 <sup>a</sup> ±0,004	0,977 <sup>a</sup> ±0,000
<b>GST 1 g/l</b>	0,357 <sup>b</sup> ±0,000	0,346 <sup>b</sup> ±0,018	0,385 <sup>b</sup> ±0,019	0,457 <sup>b</sup> ±0,045	0,505 <sup>b</sup> ±0,029	0,513 <sup>b</sup> ±0,002	0,59 <sup>b</sup> ±0,000
<b>Chips 2,5 g/l</b>	0,153 <sup>cd</sup> ±0,003	0,174 <sup>cd</sup> ±0,013	0,196 <sup>c</sup> ±0,006	0,217 <sup>c</sup> ±0,007	0,232 <sup>cde</sup> ±0,006	0,254 <sup>cef</sup> ±0,012	0,2565 <sup>de</sup> ±0,026
<b>Chips 5 g/l</b>	0,181 <sup>c</sup> ±0,006	0,199 <sup>c</sup> ±0,011	0,223 <sup>c</sup> ±0,002	0,246 <sup>c</sup> ±0,005	0,257 <sup>cd</sup> ±0,007	0,266 <sup>ce</sup> ±0,000	0,272 <sup>cde</sup> ±0,000

<b>Δείγματα 55°C</b>	<b>Ημέρα 7</b>	<b>Ημέρα 8</b>	<b>Ημέρα 9</b>	<b>Ημέρα 10</b>	<b>Ημέρα 11</b>	<b>Ημέρα 12</b>
<b>Met 20 mg/l</b>	0,223 <sup>d</sup> ±0,001	0,236 <sup>d</sup> ±0,004	0,242 <sup>c</sup> ±0,005	0,284 <sup>de</sup> ±0,005	0,296 <sup>c</sup> ±0,007	0,300 <sup>c</sup> ± 0,007
<b>Met 40 mg/l</b>	0,215 <sup>d</sup> ±0,004	0,235 <sup>d</sup> ±0,003	0,237 <sup>c</sup> ±0,011	0,2645 <sup>e</sup> ±0,003	0,277 <sup>c</sup> ±0,005	0,289 <sup>c</sup> ± 0,038
<b>GSH 10 mg/l</b>	0,2335 <sup>d</sup> ±0,008	0,260 <sup>d</sup> ±0,012	0,261 <sup>c</sup> ±0,002	0,281 <sup>de</sup> ±0,003	0,297 <sup>c</sup> ±0,000	0,371 <sup>c</sup> ±0,000
<b>GSH 20 mg/l</b>	0,24 <sup>d</sup> ±0,006	0,257 <sup>d</sup> ±0,007	0,26 <sup>c</sup> ±0,000	0,287 <sup>de</sup> ±0,006	0,306 <sup>c</sup> ±0,009	0,325 <sup>c</sup> ± 0,006
<b>ASC. 100 mg/l</b>	0,296 <sup>cd</sup> ±0,035	0,326 <sup>cd</sup> ±0,045	0,33 <sup>c</sup> ±0,054	0,3605 <sup>cd</sup> ±0,034	0,418 <sup>c</sup> ±0,018	0,437 <sup>c</sup> ±0,010
<b>ASC. 200 mg/l</b>	0,355 <sup>c</sup> ±0,007	0,387 <sup>c</sup> ±0,005	0,425 <sup>c</sup> ±0,000	0,4425 <sup>c</sup> ±0,025	0,484 <sup>bc</sup> ±0,015	0,501 <sup>c</sup> ±0,016
<b>Se 1,25 mg/l</b>	0,2275 <sup>d</sup> ±0,001	0,238 <sup>d</sup> ±0,005	0,255 <sup>c</sup> ±0,003	0,2685 <sup>e</sup> ±0,004	0,287 <sup>c</sup> ±0,004	0,289 <sup>c</sup> ±0,000
<b>Se 2,5 mg/l</b>	0,2245 <sup>d</sup> ±0,002	0,237 <sup>d</sup> ±0,001	0,246 <sup>c</sup> ±0,004	0,2695 <sup>e</sup> ±0,001	0,289 <sup>c</sup> ±0,000	0,305 <sup>c</sup> ± 0,013
<b>M</b>	0,225 <sup>d</sup> ±0,000	0,251 <sup>d</sup> ±0,002	0,259 <sup>c</sup> ±0,000	0,279 <sup>de</sup> ±0,002	0,292 <sup>c</sup> ±0,002	0,346 <sup>c</sup> ±0,000
<b>GST 2 g/l</b>	1,159 <sup>a</sup> ±0,047	1,386 <sup>a</sup> ±0,000	1,728 <sup>a</sup> ±0,180	2,335 <sup>a</sup> ±0,000	2,285 <sup>a</sup> ±0,445	2,4375 <sup>a</sup> ±0,3105
<b>GST 1 g/l</b>	0,684 <sup>b</sup> ±0,031	0,7855 <sup>b</sup> ±0,056	0,852 <sup>b</sup> ±0,103	1,013 <sup>b</sup> ±0,033	1,158 <sup>b</sup> ±0,000	1,489 <sup>b</sup> ±0,054
<b>Chips 2,5 g/l</b>	0,2685 <sup>cd</sup> ±0,008	0,29 <sup>cd</sup> ±0,003	0,294 <sup>c</sup> ±0,009	0,3125 <sup>de</sup> ±0,012	0,332 <sup>c</sup> ±0,016	0,351 <sup>c</sup> ±0,000
<b>Chips 5 g/l</b>	0,295 <sup>cd</sup> ±0,011	0,309 <sup>cd</sup> ±0,008	0,321 <sup>c</sup> ±0,010	0,338 <sup>de</sup> ±0,014	0,348 <sup>c</sup> ±0,005	0,36 <sup>c</sup> ±0,016

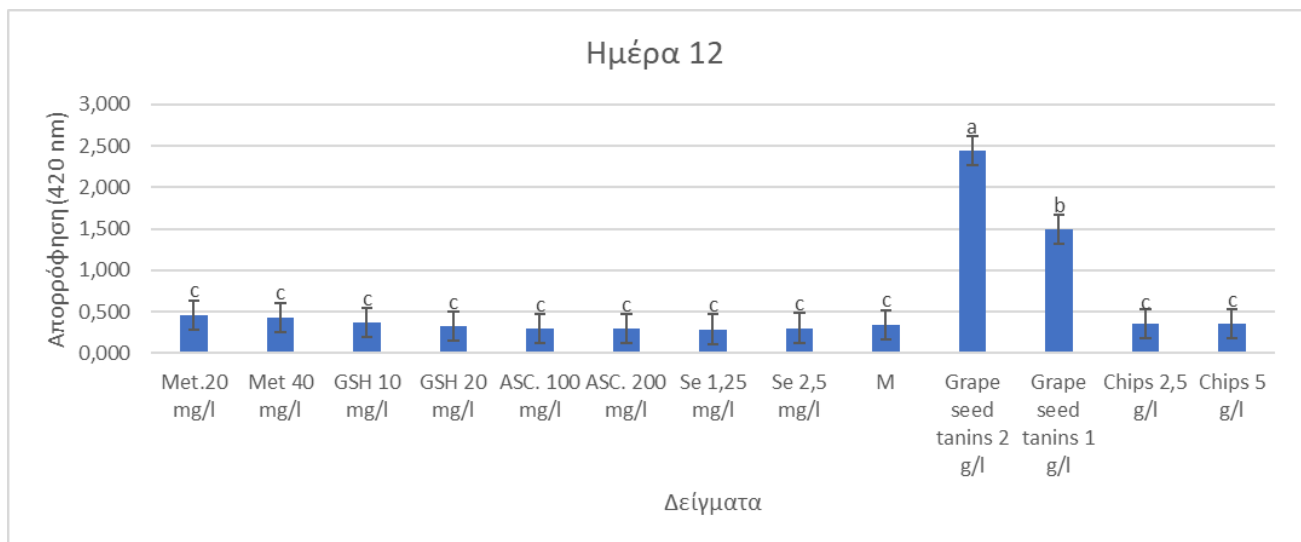
Σύμφωνα με τους Kotseridis et al. (2015) οι τιμές της απορρόφησης ενός λευκού οίνου στο μήκος κύματος 420 nm βοηθούν στην εκτίμηση της οξείδωσής τους. Όσο μεγαλύτερη οξείδωση έχει υποστεί ένας οίνος τόσο μεγαλύτερη θα είναι και η τιμή της απορρόφησης στα 420 nm, γι' αυτό και το πείραμα της επιταχυνόμενης οξείδωσης η άνοδος των τιμών των απορροφήσεων είναι ορατή. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα της μελέτης των Sioumis et al. (2005); Vlahou et. al (2022).



**Διάγραμμα 3:** Μεταβολή των απορροφήσεων από την ημέρα 0 έως τη 12 για το πείραμα της επιταχυνόμενης οξείδωσης (55°C)



**Διάγραμμα 4:** Απορρόφηση στα 420 nm την 3η μέρα για το πείραμα της επιταχυνόμενης οξείδωσης (55°C)



**Διάγραμμα 5:** Απορρόφηση στα 420 nm την 12η μέρα για το πείραμα της επιταχυνόμενης οξείδωσης (55°C)

Βασιζόμενοι στις τιμές του πίνακα 2 στη θερμοκρασία των 55°C παρατηρούμε ότι σε όλα τα δείγματα η τιμή της απορρόφησης στα 420 nm με την πάροδο του χρόνου και συγκεκριμένα κατά τη διάρκεια των 12 ημερών, αυξάνεται. Χρησιμοποιώντας τον Μάρτυρα ως σημείο αναφοράς, ο οποίος από την τρίτη κιόλας ημέρα φαίνεται να έχει ήδη κάποιες ενδείξεις καφετιάσματος (η τιμή του είναι 0,184), συγκρίνουμε τις τιμές των υπόλοιπων δειγμάτων. Μεγαλύτερη αύξηση στην τιμή της απορρόφησης συγκριτικά με τον Μάρτυρα όσο αναφορά την τρίτη μέρα φαίνεται να έχουν τα δείγματα των ταννινών γιγάρτων της συγκέντρωσης 1 g/l και 2 g/l. Επίσης μεγαλύτερη αύξηση παρουσιάζουν οι τιμές από τα δείγματα με τις δύο συγκεντρώσεις του ασκορβικού και αυτά με τις δύο συγκεντρώσεις chips δρυός. Τα υπόλοιπα δείγματα, δηλαδή αυτά που προστέθηκαν οι δύο συγκεντρώσεις metabisulfite, σεληνίου (Se) και γλουταθειόνης (GSH) παρατηρούμε ότι έχουν σε γενικές γραμμές μικρότερες τιμές απορρόφησης σε σχέση με τον Μάρτυρα (Πίνακας 2). Συγκεκριμένα, από την έβδομη μέρα είναι ορατή η μειωμένη απορρόφηση του δείγματος με Se 2,5 mg/ml σε σχέση με τον μάρτυρα ενώ το δείγμα με το Se 1,25 mg/l παρουσιάζει αυτή τη μείωση από τη δέκατη μέρα, χωρίς να υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε καμία από τις δύο περιπτώσεις. Τα δείγματα που παρουσίασαν από την ημέρα 0η έως και τη 12η στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 σε σχέση με τον μάρτυρα και όλα τα υπόλοιπα, ήταν τα δείγματα που περιείχαν ταννίνες γιγάρτων σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 (πίνακας 2). Επίσης, παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των υπολοίπων τα δείγματα που περιέχουν ασκορβικό οξύ σε συγκέντρωση 200mg/l κυρίως από



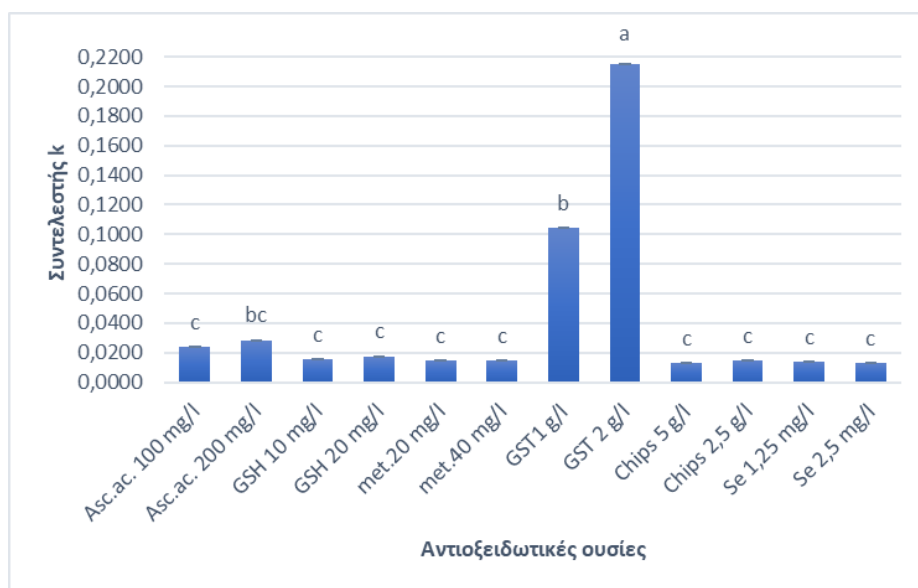
την τέταρτη έως και την όγδοη ημέρα. Όμως στο ίδιο χρονικό διάστημα δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές με τα δείγματα που έχουν εκχυλιστεί με chips δρυός στις δύο συγκεντρώσεις 2,5g/l και 5 g/l αντίστοιχα. Εν κατακλείδι, η αύξηση της θερμοκρασίας επιταχύνει την αμαύρωση όλων των δειγμάτων και περισσότερο των δειγμάτων με τις ταννίνες γιγάρτων, του ασκορβικού οξέος και αυτών που εκχυλίστηκαν με chips δρυός.

Οι τιμές του συντελεστή k χρησιμοποιούνται για να αξιολογηθεί ο βαθμός οξείδωσης του εκάστοτε δείγματος στα 420 nm, με τις υψηλότερες τιμές να υποδεικνύουν την πιο ταχεία οξείδωση. Ταχύτερη οξείδωση συνεπάγεται και εκτενέστερο καφέτιασμα των δειγμάτων. Ως προς τις τιμές  $\Delta A\%_{420}$ , αυτές αποτελούν ένδειξη του ρυθμού μεταβολής του χρώματος στο μήκος κύματος των 420nm.

Παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα και ο σχολιασμός των τιμών k και των τιμών  $\Delta A\%_{420}$  στη συνέχεια.

**Πίνακας 3** :Συντελεστής ρυθμού μεταβολής χρώματος K

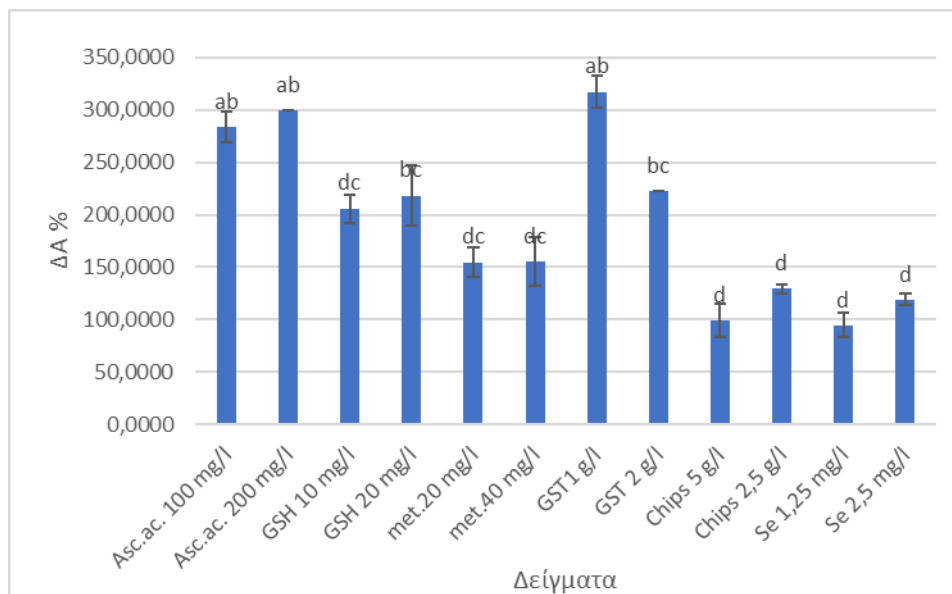
<b>Αντιοξειδωτικές ουσίες</b>	<b>K</b>	
<b>Asc.ac. 100 mg/l</b>	0,027 <sup>c</sup>	±0,002
<b>Asc.ac. 200 mg/l</b>	0,0319 <sup>bc</sup>	±0,003
<b>GSH 10 mg/l</b>	0,0157 <sup>c</sup>	±0,001
<b>GSH 20 mg/l</b>	0,0177 <sup>c</sup>	±0,001
<b>Metabisulfite 20 mg/l</b>	0,015 <sup>c</sup>	±0,001
<b>Metabisulfite 40 mg/l</b>	0,013 <sup>c</sup>	±0,001
<b>GST 1 g/l</b>	0,1045 <sup>b</sup>	±0,002
<b>GST 2 g/l</b>	0,21485 <sup>a</sup>	±0,049
<b>Chips 5 g/l</b>	0,01325 <sup>c</sup>	±0,002
<b>Chips 2,5 g/l</b>	0,01455 <sup>c</sup>	±0,001
<b>Se 1,25 mg/l</b>	0,0141 <sup>c</sup>	±0,0001
<b>Se 2,5 mg/l</b>	0,01275 <sup>c</sup>	±0,000
<b>M</b>	0,0153 <sup>c</sup>	±0,000



**Διάγραμμα 6:** Συντελεστής ρυθμού μεταβολής του χρώματος στο πείραμα ταχείας οξείδωσης στους 55 °C

**Πίνακας 4:** Η επί τοις εκατό μεταβολή του χρώματος ΔΑ% 420nm στους 55°C.

Δείγματα 55°C	ΔΑ% <sub>420nm</sub>	Stand. Error
<b>M</b>	154,4 <sup>f</sup>	±10,025
<b>Asc.ac. 100 g/l</b>	286,7 <sup>abc</sup>	±14,58022
<b>Asc.ac. 200 g/l</b>	324,5 <sup>ab</sup>	±0,0000
<b>GSH 10 mg/l</b>	205,9 <sup>cde</sup>	±13,28511
<b>GSH 20 mg/l</b>	218,3 <sup>bcd</sup>	±28,44261
<b>Met.20 mg/l</b>	154,2 <sup>def</sup>	±13,98305
<b>Met.40 mg/l</b>	120,6 <sup>ef</sup>	±22,80347
<b>GST1 g/l</b>	317,1 <sup>a</sup>	±15,12605
<b>GST 2 g/l</b>	222,8 <sup>abc</sup>	±0,0000
<b>Chips 5 g/l</b>	99,4 <sup>ef</sup>	±15,44996
<b>Chips 2,5 g/l</b>	129,5 <sup>f</sup>	±4,50000
<b>Se 1,25 mg/l</b>	94,7 <sup>f</sup>	±11,75859
<b>Se 2,5 mg/l</b>	119,0 <sup>f</sup>	±5,59628



**Διάγραμμα 7:** Η μεταβολή της  $\Delta A\%$  στα 420 nm στο πείραμα της επιταχυνόμενης οξείδωσης στους 55°C.

Τα αποτελέσματα των Πινάκων 3 και 4 υπολογίστηκαν σύμφωνα με τις εξισώσεις [βλ. Κεφ. Υλικά και Μέθοδοι]. Βάσει του πίνακα 2, δηλαδή των τιμών  $k$ , φαίνεται ότι στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 συγκριτικά με τον μάρτυρα και τα υπόλοιπα δείγματα παρουσιάζουν μόνο τα δείγματα με τις δύο συγκεντρώσεις των ταννινών γιγάρτων. Αντιθέτως τα δείγματα σεληνίου (Se), metabisulfite και chips δρυός ενώ δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές με τον μάρτυρα αντιστοιχούν όμως σε μικρότερες τιμές από την τιμή  $k$  του μάρτυρα και επομένως παρουσιάζουν μικρότερη ταχύτητα αλλαγής του χρώματος λόγω οξείδωσης σε σύγκριση με αυτόν. Τέλος τα δείγματα στις δύο συγκεντρώσεις με γλουταθειόνη (GSH) και ασκορβικό οξύ (Asc. Ac.) δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές με τον μάρτυρα και οι τιμές τους είναι υψηλότερες από τα δείγματα αυτού. Συμπερασματικά, οι υψηλότερες τιμές σταθεράς  $k$  και με σημαντική διαφορά σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα είναι αυτές των δειγμάτων των ταννινών γιγάρτων. Αξιολογώντας μόνο τη σταθερά  $k$ , τα δείγματα που φαίνεται να οξειδώνονται πιο γρήγορα από όλα είναι αυτά των ταννινών γιγάρτων κι αμέσως μετά τα δείγματα της γλουταθειόνης και του ασκορβικού οξέος.

Η μεταβολή του χρώματος  $\Delta A\%_{420\text{ nm}}$  όπως προαναφέρθηκε συσχετίζεται με την εκτίμηση της χρωματικής αλλαγής και συγκεκριμένα οι τιμές άνω του 70 % υποδηλώνουν πιθανό καφέτιασμα εξαιτίας οξείδωσης (Κοτσερίδης et al., 2017; Vlahou et al., 2022). Τα δείγματα που φαίνεται να παρουσιάζουν σημαντικά στατιστικές διαφορές με τα υπόλοιπα κι έχουν τις υψηλότερες τιμές μεταβολής  $\Delta A\%_{420\text{ nm}}$  είναι τα δείγματα των ταννινών γιγάρτων και του

ασκορβικού οξέος στις δύο συγκεντρώσεις, με επόμενες κι αμέσως μικρότερες τιμές αυτές των δειγμάτων της γλουταθειόνης. Αυτά τα αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία με τις τιμές της σταθεράς  $k$  και αποτυπώνουν την πιο εύκολη και γρήγορη οξείδωση πρωτίστως των δειγμάτων των ταννινών γιγάρτων και στη συνέχεια των δειγμάτων ασκορβικού οξέος και γλουταθειόνης στις δύο συγκεντρώσεις. Τα υπόλοιπα δείγματα, δηλαδή αυτά των δύο συγκεντρώσεων metabisulfite, σεληνίου και chips δρυός δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές με τον μάρτυρα, βέβαια καλό θα ήταν να σημειωθεί ότι όλα τα δείγματα έχουν τιμές  $\Delta A\%_{420nm}$  άνω του 70%. Αυτό το γεγονός αποδεικνύει πόσο ευαίσθητα είναι όλα τα δείγματα ως προς το καφέτισμα, επομένως δεν θα ήταν άτοπη η παραδοχή της ευαισθησίας ως προς την οξείδωση, της ποικιλίας σταφυλιών από την οποία έχει παραχθεί το κρασί του πειράματος, δηλαδή της Ρομπόλας.

## **7.2) Θειώδης ανυδρίτης (SO<sub>2</sub>)**

Ο θειώδης ανυδρίτης ως γνωστόν χρησιμοποιείται κατά κόρον στις οινολογικές πρακτικές καθώς πρόκειται για ένα μέσο κατάλληλο κυρίως για την προστασία έναντι των οξειδώσεων (χημικών και ενζυμικών). Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της οξείδωσής του για την προστασία των φαινολικών και άλλων ευαίσθητων στην οξείδωση συστατικών και μέσω της απενεργοποίησης των οξειδασών, υπεύθυνων για την κατάλυση ενζυμικών αντιδράσεων. Επίσης, υποβοηθά την εκχύλιση χρωστικών ουσιών και τη διαύγαση. Η συσχέτισή του με την αμαύρωση του οίνου είναι πολύπλοκη όπως έχει προαναφερθεί (Κοτσερίδης Γ. & Προξενιά Ν., 2015). Ακολούθως βρίσκονται τα αποτελέσματα του προσδιορισμού του ολικού και ελεύθερου θειώδη ανυδρίτη, στις συνθήκες της επιταχυνόμενης οξείδωσης στους 55°C για 12 ημέρες.

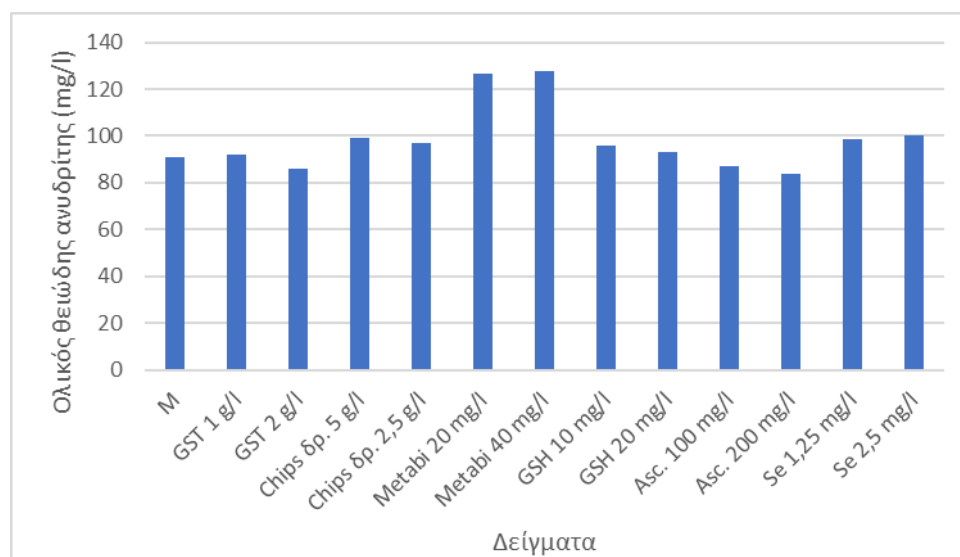
### **7.2.1) Ολικός θειώδης ανυδρίτης**

Ο ολικός θειώδης ανυδρίτης όπως έχει προαναφερθεί, αποτελεί το άθροισμα του ελεύθερου και δεσμευμένου και παρακάτω βρίσκονται τα αποτελέσματα από τη μέτρησή του κατά τη διάρκεια του πειράματος της επιταχυνόμενης οξείδωσης στους 55 °C. Συγκεκριμένα ο προσδιορισμός του έγινε κατά τις ημέρες 0, 1, 4, 8 και 12 στους 55 °C, και τα αποτελέσματα εκφράζονται σε SO<sub>2</sub> mg/l. Όσες τιμές έχουν διαφορετική εκθετική τιμή έχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05.

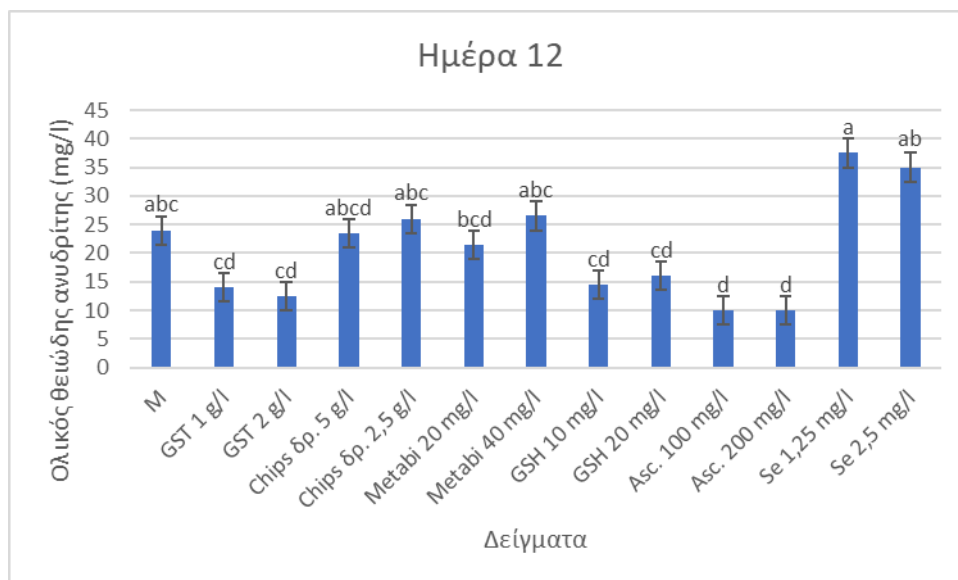
**Πίνακας 5:** Επίπεδα ολικού θειώδη ανυδρίτη κατά τις ημέρες 0,1,4,8,12

Δείγματα 55°C	Ημέρα 0	Ημέρα 1	Ημέρα 4	Ημέρα 8	Ημέρα 12
Met.20 mg/l	130 <sup>bc</sup> ±0,000	126,5 <sup>a</sup> ±0,500	73 <sup>abc</sup> ±7,000	44,5 <sup>bcd</sup> ±1,500	21,5 <sup>bcd</sup> ±1,500
Met 40mg/l	144 <sup>ab</sup> ±0,000	127,5 <sup>a</sup> ±1,500	83,5 <sup>a</sup> ±3,500	49,5 <sup>ba</sup> ±0,500	26,5 <sup>abc</sup> ±3,500
GSH 10mg/l	110 <sup>de</sup> ±0,000	96 <sup>b</sup> ±0,000	63,5 <sup>abc</sup> ±1,500	36 <sup>e</sup> ±0,000	14,5 <sup>cd</sup> ±0,500
GSH 20mg/l	106 <sup>de</sup> ±0,000	93 <sup>b</sup> ±0,000	53,5 <sup>abc</sup> ±20,500	37,5 <sup>de</sup> ±1,500	16 <sup>cd</sup> ±2,000
ASC. 100 mg/l	116 <sup>cd</sup> ±0,000	87 <sup>b</sup> ±0,000	43 <sup>abc</sup> ±2,000	15,5 <sup>f</sup> ±0,500	10 <sup>d</sup> ±2,000
ASC. 200 mg/l	148 <sup>a</sup> ±0,000	84 <sup>b</sup> ±0,000	53 <sup>abc</sup> ±0,000	15 <sup>f</sup> ±0,000	15,00 <sup>d</sup> -0,000
Grape seed tannins 1 g/l	106 <sup>de</sup> ±0,000	92 <sup>b</sup> ±2,000	42 <sup>bc</sup> ±4,000	15 <sup>f</sup> ±2,000	14 <sup>cd</sup> ±2,000
Grape seed tannins 2 g/l	98 <sup>e</sup> ±0,000	86 <sup>b</sup> ±1,000	35 <sup>c</sup> ±5,000	11,5 <sup>f</sup> ±0,500	12,5 <sup>cd</sup> ±0,500
Se 1,25 mg/l	105,5 <sup>de</sup> ±2,500	98,5 <sup>b</sup> ±2,500	77 <sup>ab</sup> ±1,000	46,5 <sup>abcd</sup> ±0,500	37,5 <sup>a</sup> ±1,500
Se 2,5 mg/l	105,5 <sup>d</sup> ±0,500	100 <sup>b</sup> ±2,000	72 <sup>abc</sup> ±5,000	54 <sup>a</sup> ±0,000	35 <sup>ab</sup> ±0,000
Chips 5g/l	107,5 <sup>de</sup> ±2,500	99 <sup>b</sup> ±1,000	67 <sup>abc</sup> ±4,000	41 <sup>bcd</sup> ±0,000	23,5 <sup>abcd</sup> ±4,500
Chips 2,5g/l	108,5 <sup>de</sup> ±1,500	97 <sup>b</sup> ±1,000	70 <sup>abc</sup> ±5,000	40,5 <sup>cde</sup> ±0,500	26 <sup>abc</sup> ±6,000
M	108,5 <sup>de</sup> ±8,333	98 <sup>b</sup> ±9,500	65 <sup>abc</sup> ±8,833	45,5 <sup>abcd</sup> ±4,500	26,5 <sup>abc</sup> ±3,833

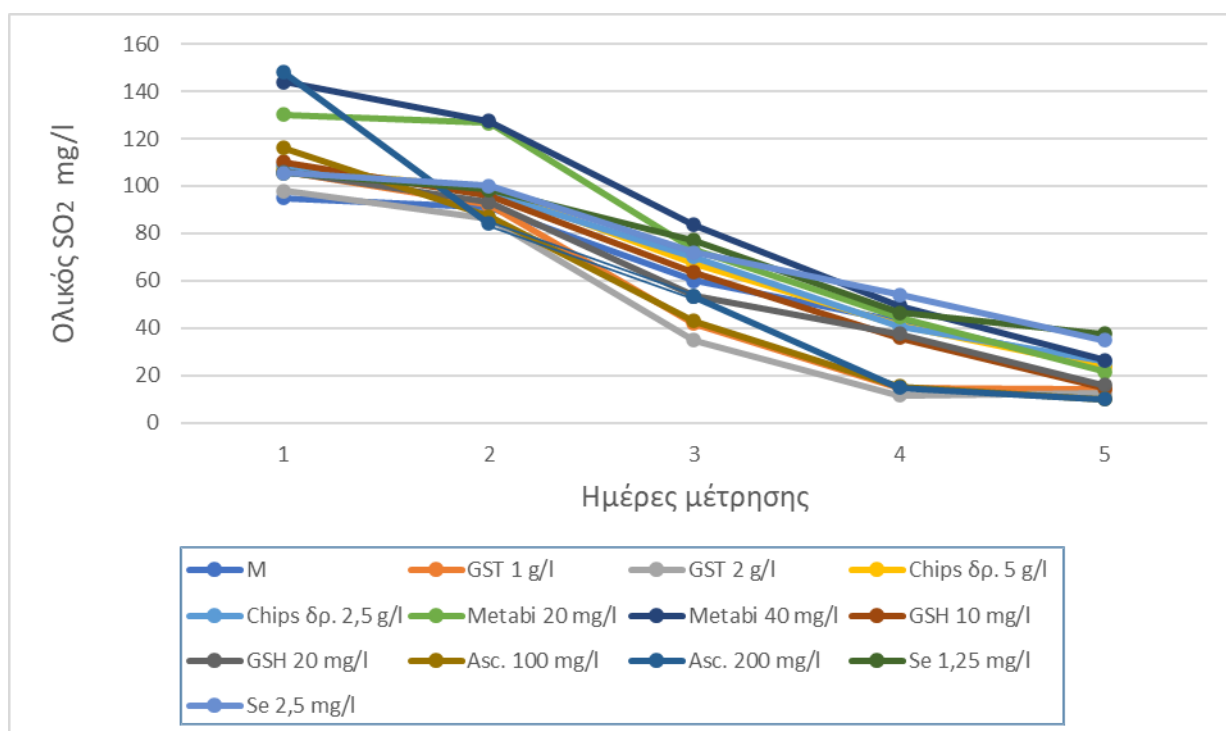
Ο ολικός θειώδης ανυδρίτης όπως έχει προαναφερθεί, αποτελεί το άθροισμα του ελεύθερου και δεσμευμένου και παρακάτω βρίσκονται τα αποτελέσματα από τη μέτρησή του κατά τη διάρκεια του πειράματος της επιταχυνόμενης οξείδωσης στους 55°C. Συγκεκριμένα ο προσδιορισμός του έγινε κατά τις ημέρες 0, 1, 4, 8 και 12 στους 55 °C, και τα αποτελέσματα εκφράζονται σε SO<sub>2</sub> mg/l. Όσες τιμές έχουν διαφορετική εκθετική τιμή έχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05.



**Διάγραμμα 8:** Συγκέντρωση ολικού θειώδη ανυδρίτη (mg/l) ημέρας 1



**Διάγραμμα 9:** Συγκέντρωση ολικού θειώδη ανυδρίτη (mg/l) ημέρα 12



**Διάγραμμα 10:** Συγκέντρωση ολικού θειώδη ανυδρίτη κατά το πείραμα επιταχυνόμενης οξείδωσης.

Είναι αισθητό το γεγονός ότι από τη μέρα 0 ήδη κάποια από τα δείγματα έχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές με τον μάρτυρα και συγκεκριμένα τα δείγματα των δύο συγκεντρώσεων του ασκορβικού οξέος και του metabisulfite, μια εικόνα που δε μένει ίδια στη συνέχεια του δωδεκαημέρου της επιταχυνόμενης οξείδωσης. Κατά τη διάρκεια της

περιόδου από τη μέρα 1 έως και την τελευταία δεν υπάρχει κάποιο δείγμα που να διαθέτει την ίδια συμπεριφορά. Τα μόνο που φαίνεται να μη διαφέρουν στατιστικά σημαντικά από το μάρτυρα κατά τη διάρκεια της επιταχυνόμενης οξείδωσης είναι τα δείγματα με σεληνίου και από τη μέρα 4 και μετά, αυτά με metabisulfite 40 mg/l. Ξεκινώντας από την αρχή, την ημέρα 1 παρουσιάζουν σημαντική στατιστική διαφορά τα δείγματα των δύο συγκεντρώσεων metabisulfite, ένα γεγονός που επαναλαμβάνεται μόνο για τη συγκέντρωση 20 mg/l κατά τη μέρα 8 και 12. Πιο ειδικά την ημέρα 8 παρουσιάζουν στατιστική διαφορά συγκριτικά με τον μάρτυρα τα δείγματα metabisulfite 20 mg/l και τα δείγματα των δύο συγκεντρώσεων των αντιοξειδωτικών ουσιών chips δρυός, ταννινών γιγάρτων, ασκορβικού οξέος και γλουταθειόνης ενώ την ημέρα 12 του metabisulfite 20 mg/l, των chips δρυός με συγκέντρωση 5 g/l, των ταννινών γιγάρτων, ασκορβικού οξέος και της γλουταθειόνης ενώ τις δύο αυτές μέρες δε διαφέρουν το metabisulfite 40 mg/l, chips 2,5 g/l και οι δυο συγκεντρώσεις του σεληνίου.

Ανακεφαλαιώνοντας, τα δείγματα του σεληνίου και στις δύο συγκεντρώσεις του παρουσιάζουν τη μικρότερη μείωση σε ολικό θειώδη ανυδρίτη από όλα τα υπόλοιπα δείγματα, όπως και δε διαφέρουν στατιστικά με τα δείγματα του μάρτυρα. Αντιθέτως, τα δείγματα που συνέβαλαν στην ταχύτερη μείωση των επιπέδων του ολικού θειώδη ανυδρίτη είναι τα δείγματα των δυο συγκεντρώσεων του ασκορβικού και των ταννινών γιγάρτων. Ωστόσο όπως ήταν αναμενόμενο, όλα τα δείγματα στις δεδομένες συνθήκες επιταχυνόμενης οξείδωσης, υπέστη μείωση στα επίπεδα του ολικού θειώδους ανυδρίτη που οφείλονται στην ταχεία οξείδωσή τους σύμφωνα με τους Vlahou et al (2022).

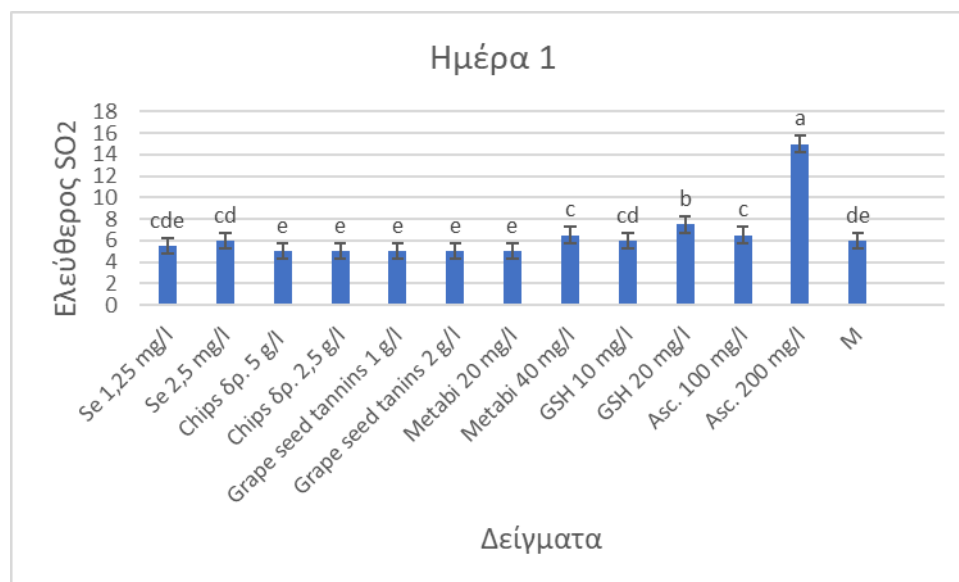
### **7.2.2) Ελεύθερος θειώδης ανυδρίτης**

Ο ελεύθερος θειώδης ανυδρίτης έχει την άμεση αντιοξειδωτική ικανότητα και συγκεκριμένα οι μορφές  $H_2SO_3$  και των ιόντων  $HSO_3^-$  που είναι οι πιο δραστικές.

Στον πίνακα 5 παρατίθενται τα αποτελέσματα προσδιορισμού του ελεύθερου θειώδη ανυδρίτη στο πείραμα της επιταχυνόμενης οξείδωσης, μια μορφή που έχει ως κύριο ρόλο την προστασία του δείγματος από οξείδωση. Εκφράζεται σε mg/l, στις ίδιες συνθήκες με τις οποίες προσδιορίστηκε ο ολικός, δηλαδή 55°C για δώδεκα ημέρες. Οι μετρήσεις έγιναν συγκεκριμένα τις ημέρες 0, 1, 4, 8 και 12 και η διαφορά στους εκθέτες σε οποιαδήποτε από τις τιμές οφείλονται στην στατιστικά σημαντική διαφορά τους με τις τιμές του μάρτυρα σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05.

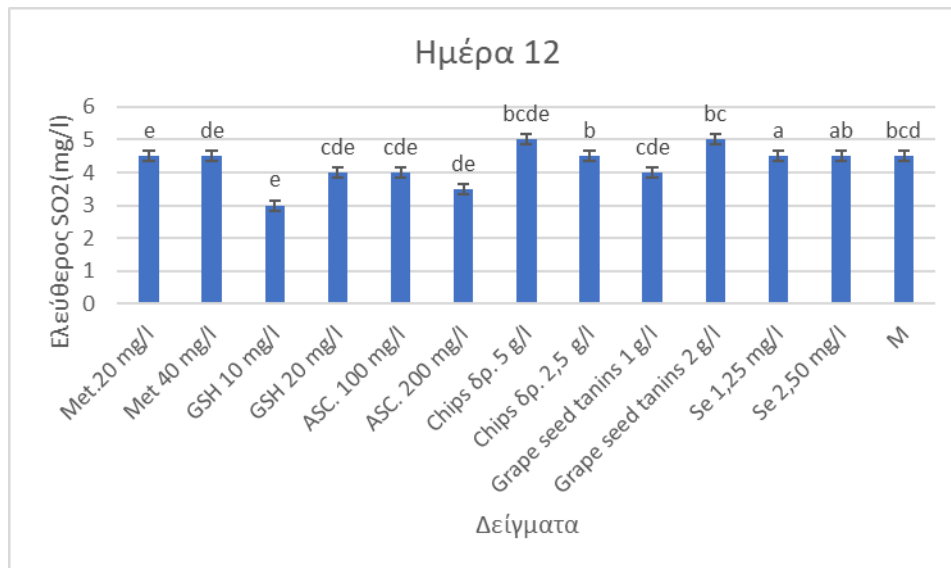
**Πίνακας 6:** Επίπεδα ελεύθερου θειώδη ανυδρίτη κατά τις ημέρες 0,1,4,8 και 12.

Δείγματα 55°C	Ημέρα 0	Ημέρα 1	Ημέρα 4	Ημέρα 8	Ημέρα 12
Met.20 mg/l	8 <sup>c</sup> ±0,000	5 <sup>e</sup> ±0,000	4 <sup>b</sup> ±0,250	5 <sup>a</sup> ±0,500	4,5 <sup>e</sup> ±0,250
Met 40 mg/l	15 <sup>b</sup> ±0,000	6,5 <sup>c</sup> ±0,000	5,5 <sup>b</sup> ±0,000	5 <sup>b</sup> ±0,500	4,5 <sup>de</sup> ±0,500
GSH 10 mg/l	6 <sup>cd</sup> ±0,000	6 <sup>cd</sup> ±0,000	4 <sup>b</sup> ±0,250	3,5 <sup>b</sup> ±0,500	3 <sup>e</sup> ±0,250
GSH 20 mg/l	7,5 <sup>c</sup> ±0,000	7,5 <sup>b</sup> ±0,000	5 <sup>ab</sup> ±0,250	3,5 <sup>b</sup> ±0,500	4 <sup>cde</sup> ±0,250
ASC. 100 mg/l	19 <sup>a</sup> ±0,000	6,5 <sup>c</sup> ±0,000	5 <sup>ab</sup> ±0,250	4 <sup>ab</sup> ±0,250	4 <sup>cde</sup> ±0,500
ASC. 200 mg/l	30 <sup>a</sup> ±0,000	6,5 <sup>a</sup> ±0,000	4 <sup>b</sup> ±0,250	3 <sup>b</sup> ±0,250	3,50 <sup>de</sup> ±0,000
Chips δρ. 5 g/l	4 <sup>d</sup> ±0,000	5 <sup>e</sup> ±0,000	5 <sup>ab</sup> ±0,000	5 <sup>ab</sup> ±0,000	5 <sup>bcd</sup> ±0,000
Chips δρ.2,5 g/l	5,5 <sup>cd</sup> ±0,000	5 <sup>e</sup> ±0,000	5 <sup>b</sup> ±0,000	5 <sup>ab</sup> ±0,000	4,5 <sup>b</sup> ±0,000
Grape seed tanins 1 g/l	7 <sup>cd</sup> ±0,000	6 <sup>e</sup> ±0,250	7 <sup>ab</sup> ±0,250	6 <sup>ab</sup> ±0,000	4 <sup>cde</sup> ±0,000
Grape seed tanins 2 g/l	7,5 <sup>c</sup> ±0,000	6 <sup>e</sup> ±0,250	7 <sup>ab</sup> ±0,125	6 <sup>ab</sup> ±0,500	5 <sup>bc</sup> ±0,000
Se 1,25 mg/l	5 <sup>cd</sup> ±0,250	6 <sup>cde</sup> ±0,333	5 <sup>a</sup> ±0,000	5 <sup>a</sup> ±0,167	4,5 <sup>a</sup> ±0,250
Se 2,5 mg/l	6 <sup>cd</sup> ±0,000	5 <sup>cd</sup> ±0,000	5 <sup>a</sup> ±0,000	4,5 <sup>a</sup> ±0,000	4,5 <sup>ab</sup> ±0,125
M	7 <sup>c</sup> ±2,000	6 <sup>de</sup> ±0,000	4,5 <sup>ab</sup> ±0,000	4,5 <sup>ab</sup> ±0,000	4,5 <sup>bcd</sup> ±0,170



**Διάγραμμα 11:** Συγκέντρωση ελεύθερου θειώδη ανυδρίτη (mg/l) ημέρα 1





**Διάγραμμα 12:** Συγκέντρωση ελεύθερου θειώδη ανυδρίτη ημέρα 12

Από τα αποτελέσματα σχετικά με τα επίπεδα του ελεύθερου θειώδη ανυδρίτη παρατηρούμε ότι την ημέρα 1 τα μόνα δείγματα που δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 με τον μάρτυρα είναι μόνο δύο, αυτά με το ascorbic acid 100mg/l, 200mg/l και με τα chips δρυός 5g/l. Την ημέρα 1 τα δείγματα που διαφέρουν είναι περισσότερα κι αυτά είναι το δείγμα με το σελήνιο 1,25 mg/l, metabisulfite 40 mg/l και των δύο συγκεντρώσεων γλουταθειόνης και ασκορβικού οξέος. Στις ημέρες 4 και 8 παρατηρείται μια σταθερότητα στη συμπεριφορά των δειγμάτων, όπου κανένα δείγμα δεν έχει σημαντική στατιστική διαφορά με τον μάρτυρα. Τέλος, την ημέρα 12 τα μόνα δείγματα που δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 με το δείγμα του μάρτυρα είναι μόνο τα δείγματα των ταννινών γιαγάρτων 2 g/l και των chips 2,5 g/l.

Τη μικρότερη τιμή σε συγκέντρωση ελεύθερου θειώδη ανυδρίτη την ημέρα 1 παρουσίασαν τα δείγματα metabisulfite 20 mg/l, chips 5 g/l και 2,5 g/l, Se 1,25 mg/l ενώ τη μεγαλύτερη τα δείγματα γλουταθειόνης 20 mg/l, metabisulfite 40 mg/l και αυτά των δύο συγκεντρώσεων ασκορβικού 100mg/l και 200 mg/l. Αντίστοιχα την ημέρα 12 τα δείγματα που είχαν τη μικρότερη συγκέντρωση θειώδους ανυδρίτη ήταν αυτά με γλουταθειόνη 10 mg/l και ασκορβικού οξέος 200 mg/l. Αυτά ήταν και τα δείγματα στα οποία οξειδώθηκε η μεγαλύτερη ποσότητα θειώδους ανυδρίτη, επομένως και χωρίς προστασία από οξειδώσεις. Αντίθετα τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις παρουσίασαν τα δείγματα chips δρυός 5 g/l και ταννινών γιαγάρτων 2 g/l. Ακολουθούν οι συγκεντρώσεις με metabisulfite 20 mg/l και 40 mg/l, Se 1,25 mg/l και 2,5 mg/l, chips 2,5 g/l.

Η μικρότερη μείωση της τιμής του ελεύθερου θειώδη ανυδρίτη (μεγαλύτερες συγκεντρώσεις), επομένως και της καλύτερης προστασίας έναντι της οξείδωσης, παρουσιάστηκε στα δείγματα

των δύο συγκεντρώσεων chips 2,5 g/l και 5 g/l, το Se 2,5mg/l και metabisulfite 20 mg/l. Ακολουθούν τα δείγματα των δύο συγκεντρώσεων ταννινών γιγάρτων 1g/l και 2 g/l , το Se 1,25 mg/l και το metabisulfite 40 mg/l. Αντιθέτως, η μεγαλύτερη μείωση του ελεύθερου θειώδους ανυδρίτη εντοπίζεται στα δείγματα με τις δύο συγκεντρώσεις ασκορβικού οξέος 100mg/l και 200mg/l όπως και της γλουταθειόνης (GSH) 10mg/l και 20mg/l.

Όπως φαίνεται από τη αναμενόμενη μείωση των τιμών των περισσότερων δειγμάτων, τα δείγματα ανεξαρτήτως προστιθέμενης αντιοξειδωτικής ουσίας δεν προστατεύονται από την οξείδωση στις δεδομένες συνθήκες καθώς τα επίπεδα του ελεύθερου θειώδους έχουν μειωθεί σημαντικά. Είναι αξιοπερίεργο το ότι στα δείγματα των metabisulfite 20 mg/l και των δειγμάτων ταννινών γιγάρτων 1g/l και 2 g/l, οι τιμές του ελεύθερου θειώδους ανυδρίτη παρουσίασαν αύξηση τιμών την ημέρα 8 και 4 αντίστοιχα, πριν ελαττωθούν τελικά. Η αύξηση αυτή είναι πιθανό να σχετίζεται με τη δημιουργία των ασταθών ενώσεων που δημιουργεί ο θειώδης ανυδρίτης με αλδεΰδες (Κοτσερίδης Γ. & Προξενιά Ν., 2015), κετόνες ή σάκχαρα, που όμως οι νέοι δεσμοί σπάζουν με υδρόλυση (Sarudi & Kelemen, 1998).

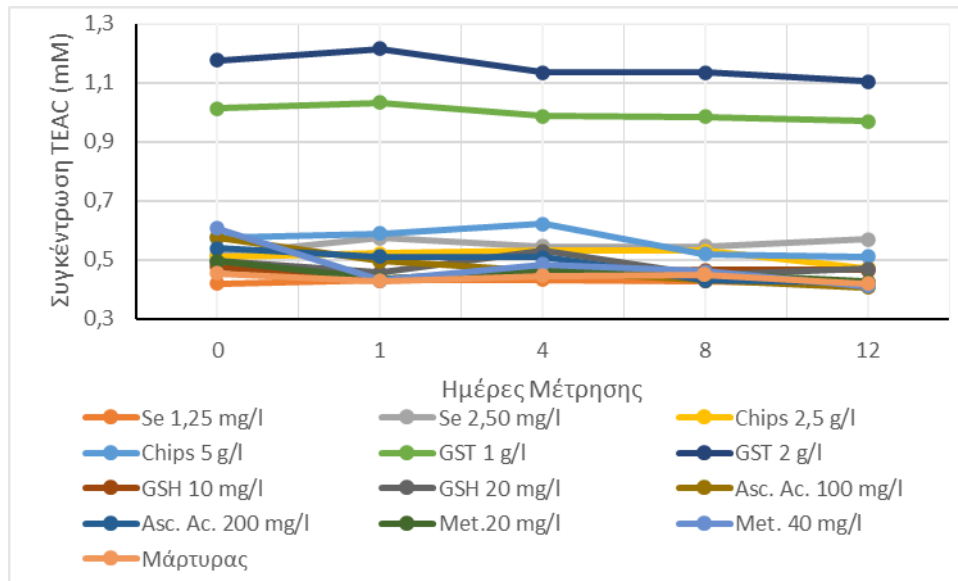
### **7.3) Αντιοξειδωτική ικανότητα -μέθοδος DPPH**

Η αντιοξειδωτική ικανότητα προσδιορίστηκε με βάση τη μέθοδο του DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) που στηρίχθηκε στο πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη των Arnous et al. (2001) όπως αναφέρει η Vlachou (2021). Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε σε όλα τα δείγματα με τις αντιοξειδωτικές ουσίες που προστέθηκαν σε αυτά. Τα αποτελέσματα της αντιοξειδωτικής ικανότητας του συγκεκριμένου πειράματος βρίσκονται στον πίνακα 7 και τα διαγράμματα 13 με 14. Εκφράζονται σε millimoles ισοδυνάμων Trolox (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) και όσες τιμές παρουσιάζουν διαφορά στην εκθετική τιμή έχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 ( $p < 0,05$ ). Αισθητές είναι οι αλλαγές που συμβαίνουν στην αντιοξειδωτική ικανότητα των κρασιών, κατά τη διάρκεια του καφετιάσματος (οξείδωση κρασιού). Η οξείδωση των πολυφαινολικών και φαινολικών ενώσεων οδηγεί σε κρασιά με χαμηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα, παρόλα αυτά οι αντιδράσεις μεταξύ των οξειδωμένων προϊόντων μπορεί να οδηγήσουν σε νέες ενώσεις με αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Άρα τελικά είναι πιθανό να αυξάνεται η αντιοξειδωτική ικανότητα, σίγουρα όμως δεν είναι προβλέψιμη η αντιοξειδωτική συμπεριφορά (Kotseridis et al., n.d.).

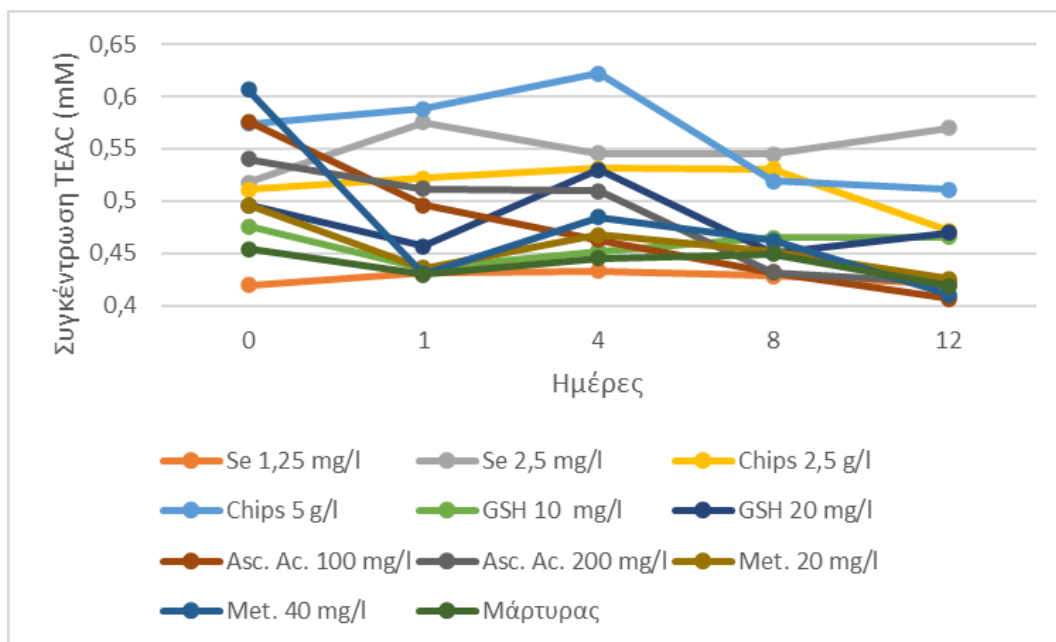
**Πίνακας 7:** Αντιοξειδωτική Ικανότητα δειγμάτων τις ημέρες 0 έως 12

<b>Αντιοξειδωτική Ικανότητα</b>	<b>Ημέρα 0</b>	<b>Ημέρα 1</b>	<b>Ημέρα 2</b>	<b>Ημέρα 3</b>	<b>Ημέρα 4</b>	<b>Ημέρα 5</b>	<b>Ημέρα 6</b>
<b>GSH 10 mg/l</b>	0,476 <sup>b</sup> ±0,06	0,436 <sup>b</sup> ±0,05	0,395 <sup>b</sup> ±0,00	0,457 <sup>b</sup> ±0,03	0,452 <sup>b</sup> ±0,04	0,458 <sup>a</sup> ±0,00	0,461 <sup>b</sup> ±0,02
<b>GSH 20 mg/l</b>	0,496 <sup>b</sup> ±0,04	0,456 <sup>b</sup> ±0,02	0,473 <sup>b</sup> ±0,02	0,502 <sup>b</sup> ±0,03	0,529 <sup>b</sup> ±0,02	0,618 <sup>abc</sup> ±0,1	0,492 <sup>b</sup> ±0,01
<b>Asc. Ac. 100 mg/l</b>	0,476 <sup>b</sup> ±0,06	0,496 <sup>b</sup> ±0,01	0,457 <sup>b</sup> ±0,03	0,473 <sup>b</sup> ±0,02	0,462 <sup>b</sup> ±0,03	0,675 <sup>abc</sup> ±0,2	0,442 <sup>b</sup> ±0,05
<b>Asc. Ac. 200 mg/l</b>	0,496 <sup>b</sup> ±0,04	0,511 <sup>b</sup> ±0,04	0,502 <sup>b</sup> ±0,03	0,395 <sup>b</sup> ±0,00	0,509 <sup>b</sup> ±0,01	0,364 <sup>a</sup> ±0,08	0,446 <sup>b</sup> ±0,04
<b>Met. 20 mg/l</b>	0,495 <sup>a</sup> ±0,11	0,436 <sup>b</sup> ±0,04	0,460 <sup>b</sup> ±0,07	0,428 <sup>b</sup> ±0,05	0,468 <sup>b</sup> ±0,08	0,576 <sup>bc</sup> ±0,08	0,436 <sup>b</sup> ±0,06
<b>Met. 40 mg/l</b>	0,496 <sup>b</sup> ±0,00	0,429 <sup>b</sup> ±0,05	0,428 <sup>b</sup> ±0,05	0,460 <sup>b</sup> ±0,07	0,484 <sup>b</sup> ±0,07	0,440 <sup>a</sup> ±0,02	0,484 <sup>b</sup> ±0,07
<b>Chips 2,5 g/l</b>	0,511 <sup>b</sup> ±0,02	0,522 <sup>b</sup> ±0,02	0,539 <sup>b</sup> ±0,03	0,514 <sup>b</sup> ±0,00	0,531 <sup>b</sup> ±0,01	0,428 <sup>a</sup> ±0,02	0,522 <sup>b</sup> ±0,02
<b>Chips 5 g/l</b>	0,574 <sup>b</sup> ±0,10	0,588 <sup>b</sup> ±0,11	0,575 <sup>b</sup> ±0,11	0,575 <sup>b</sup> ±0,11	0,622 <sup>b</sup> ±0,14	0,488 <sup>bc</sup> ±0,09	0,598 <sup>b</sup> ±0,10
<b>GST 1 g/l</b>	1,012 <sup>a</sup> ±0,00	1,033 <sup>a</sup> ±0,00	0,992 <sup>a</sup> ±0,05	0,992 <sup>a</sup> ±0,05	0,986 <sup>a</sup> ±0,08	0,466 <sup>a</sup> ±0,02	0,989 <sup>b</sup> ±0,06
<b>Se 25</b>	0,419 <sup>b</sup> ±0,01	0,432 <sup>b</sup> ±0,02	0,394 <sup>b</sup> ±0,00	0,438 <sup>b</sup> ±0,04	0,433 <sup>b</sup> ±0,01	1,131 <sup>a</sup> ±0,08	0,458 <sup>a</sup> ±0,04
<b>Se 2,5 mg/l</b>	0,517 <sup>b</sup> ±0,04	0,575 <sup>b</sup> ±0,05	0,483 <sup>b</sup> ±0,00	0,533 <sup>b</sup> ±0,05	0,546 <sup>b</sup> ±0,05	0,442 <sup>a</sup> ±0,02	0,523 <sup>b</sup> ±0,07
<b>M</b>	0,454 <sup>b</sup> ±0,01	0,429 <sup>b</sup> ±0,01	0,451 <sup>b</sup> ±0,04	0,451 <sup>b</sup> ±0,01	0,445 <sup>b</sup> ±0,01	0,673 <sup>abc</sup> ±0,2	0,455 <sup>b</sup> ±0,02

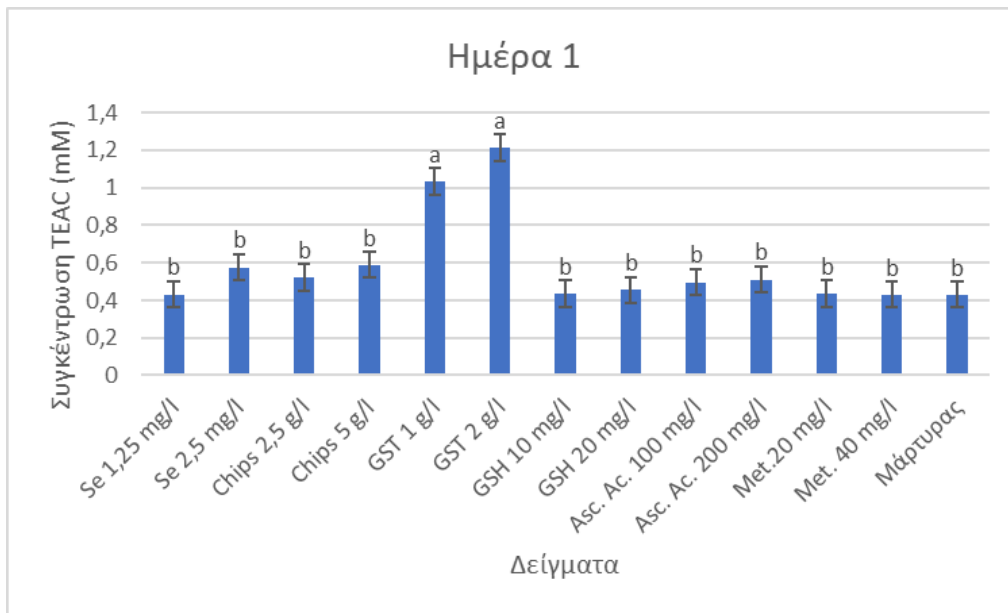
<b>Αντιοξειδωτική Ικανότητα</b>	<b>Ημέρα 7</b>	<b>Ημέρα 8</b>	<b>Ημέρα 9</b>	<b>Ημέρα 10</b>	<b>Ημέρα 11</b>	<b>Ημέρα 12</b>
<b>GSH 10mg/l</b>	0,452 <sup>a</sup> ±0,014	0,465 <sup>b</sup> ±0,093	0,499 <sup>b</sup> ±0,02	0,410 <sup>b</sup> ±0,003	0,435 <sup>c</sup> ±0,071	0,465 <sup>bc</sup> ±0,016
<b>GSH 20mg/l</b>	0,443 <sup>a</sup> ±0,028	0,45 <sup>b</sup> ±0,034	0,581 <sup>b</sup> ±0,03	0,42 <sup>b</sup> ±0,032	0,478 <sup>c</sup> ±0,035	0,469 <sup>bc</sup> ±0,000
<b>Asc. Ac. 100mg/l</b>	0,407 <sup>a</sup> ±0,027	0,431 <sup>b</sup> ±0,022	0,536 <sup>b</sup> ±0,079	0,411 <sup>b</sup> ±0,048	0,403 <sup>c</sup> ±0,026	0,406 <sup>c</sup> ±0,043
<b>Asc. Ac. 200mg/l</b>	0,417 <sup>a</sup> ±0,069	0,432 <sup>b</sup> ±0,011	0,417 <sup>b</sup> ±0,006	0,417 <sup>b</sup> ±0,056	0,381 <sup>c</sup> ±0,003	0,422 <sup>c</sup> ±0,021
<b>Met. 20mg/l</b>	0,478 <sup>a</sup> ±0,076	0,452 <sup>b</sup> ±0,046	0,581 <sup>b</sup> ±0,064	0,435 <sup>b</sup> ±0,069	0,454 <sup>c</sup> ±0,051	0,426 <sup>c</sup> ±0,022
<b>Met. 40mg/l</b>	0,468 <sup>a</sup> ±0,041	0,462 <sup>b</sup> ±0,054	0,453 <sup>b</sup> ±0,012	0,517 <sup>b</sup> ±0,063	0,441 <sup>c</sup> ±0,064	0,410 <sup>c</sup> ±0,035
<b>Chips 2,5g/l</b>	0,511 <sup>a</sup> ±0,007	0,531 <sup>b</sup> ±0,004	0,413 <sup>b</sup> ±0,058	0,550 <sup>b</sup> ±0,039	0,505 <sup>c</sup> ±0,053	0,472 <sup>bc</sup> ±0,000
<b>Chips 5g/l</b>	0,573 <sup>a</sup> ±0,105	0,519 <sup>b</sup> ±0,09	0,454 <sup>b</sup> ±0,065	0,565 <sup>b</sup> ±0,093	0,585 <sup>c</sup> ±0,142	0,511 <sup>bc</sup> ±0,000
<b>GST 1g/l</b>	1,026 <sup>b</sup> ±0,082	0,985 <sup>a</sup> ±0,051	0,481 <sup>b</sup> ±0,086	0,974 <sup>a</sup> ±0,073	0,967 <sup>a</sup> ±0,088	0,969 <sup>a</sup> ±0,073
<b>GST 2g/l</b>	1,136 <sup>b</sup> ±0,095	1,134 <sup>a</sup> ±0,104	1,017 <sup>a</sup> ±0,083	1,095 <sup>a</sup> ±0,077	1,085 <sup>a</sup> ±0,085	1,005 <sup>a</sup> ±0,000
<b>Se 1,25 mg/l</b>	0,417 <sup>a</sup> ±0,006	0,426 <sup>b</sup> ±0,017	1,117 <sup>a</sup> ±0,098	0,431 <sup>b</sup> ±0,008	0,475 <sup>c</sup> ±0,044	0,470 <sup>bc</sup> ±0,044
<b>Se 2,5 mg/l</b>	0,582 <sup>a</sup> ±0,057	0,545 <sup>b</sup> ±0,057	0,42 <sup>b</sup> ±0,016	0,560 <sup>b</sup> ±0,004	0,604 <sup>bc</sup> ±0,046	0,596 <sup>b</sup> ±0,000
<b>M</b>	0,467 <sup>a</sup> ±0,004	0,449 <sup>b</sup> ±0,007	0,416 <sup>b</sup> ±0,031	0,422 <sup>b</sup> ±0,002	0,436 <sup>c</sup> ±0,006	0,456 <sup>bc</sup> ±0,007



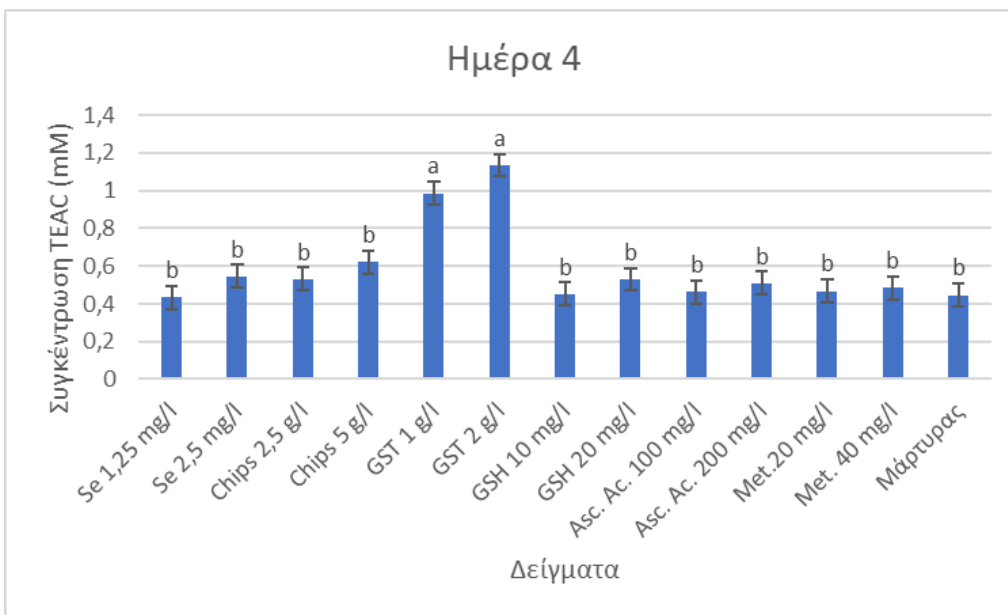
**Διάγραμμα 13:** Αντιοξειδωτική ικανότητα όλων των δειγμάτων τις ημέρες 0,1,4,8 και 12 κατά τη διάρκεια του πειράματος της επιταχυνόμενης οξείδωσης



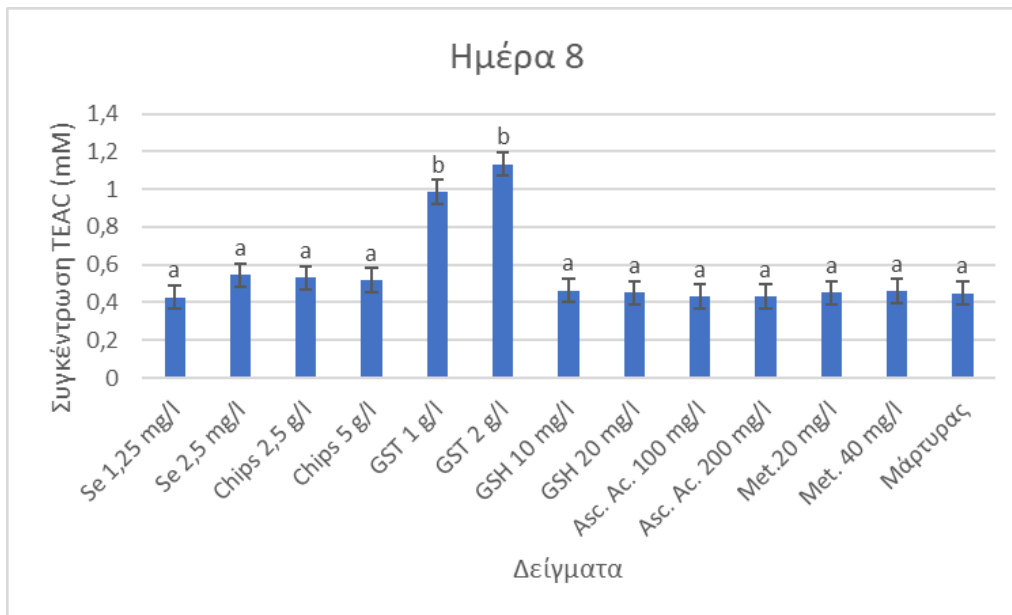
**Διάγραμμα 14:** Αντιοξειδωτική Ικανότητα όλων των δειγμάτων εκτός από των GST, τις ημέρες 0,1,4,8 και 12 κατά τη διάρκεια του πειράματος της επιταχυνόμενης οξείδωσης



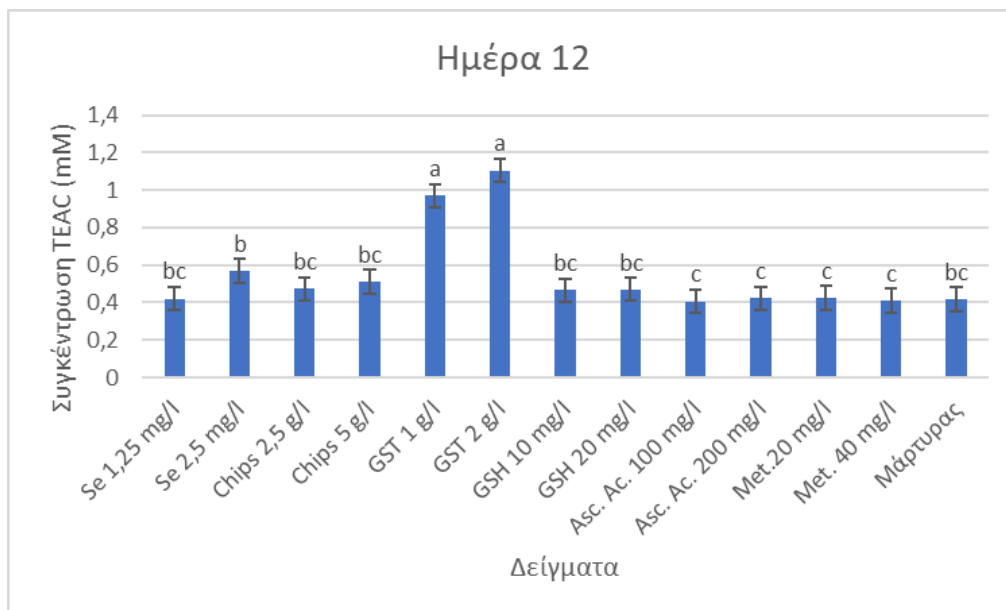
**Διάγραμμα 15:** Αντιοξειδωτική ικανότητα δειγμάτων την ημέρα 1 κατά τη διάρκεια του πειράματος επιταχυνόμενης οξείδωσης



**Διάγραμμα 16:** Αντιοξειδωτική ικανότητα δειγμάτων την ημέρα 4 του πειράματος επιταχυνόμενης οξείδωσης



**Διάγραμμα 17:** Αντιοξειδωτική ικανότητα δειγμάτων την ημέρα 8 κατά τη διάρκεια του πειράματος επιταχυνόμενης οξείδωσης



**Διάγραμμα 18:** Αντιοξειδωτική ικανότητα δειγμάτων την ημέρα 12 κατά τη διάρκεια του πειράματος επιταχυνόμενης οξείδωσης

Ως προς την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας στο συγκεκριμένο πείραμα δεν φαίνεται ιδιαίτερη πτώση καθώς είναι εξ αρχής πολύ χαμηλή τόσο των δειγμάτων του μάρτυρα όσο και των δειγμάτων ανεξαρτήτου φύσης της αντιοξειδωτικής ουσίας (Πίνακας 6). Η αντιοξειδωτική ικανότητα όλων των δειγμάτων όπως φαίνεται δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 σε σχέση με τον μάρτυρα από την ημέρα 1 έως και την 12, εκτός από τα δείγματα των δύο συγκεντρώσεων των ταννινών

γυγάρτων. Την ημέρα 12 τα δείγματα που παρουσιάζουν σημαντική στατιστικά διαφορά με όλα τα υπόλοιπα σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 είναι αυτά των δύο συγκεντρώσεων ταννινών γυγάρτων 1g/l και 2g/l.

Παρόλα αυτά τα δείγματα που εμφανίζουν τη μεγαλύτερη διαφορά αντιοξειδωτικής ικανότητας από τη μέρα 1 στη 12 είναι αυτά του πυκνού σεληνίου 50  $\mu\text{g/l}$  και τη μεγαλύτερη τιμή στο τέλος του οξειδωτικού καφετιάσματος την παρουσιάζουν τα δείγματα των δύο συγκεντρώσεων ταννινών γυγάρτων. Τη μικρότερη τιμή την ημέρα 12 παρουσιάζει το διάλυμα με τη μικρότερη συγκέντρωση ασκορβικού 100  $\text{mg/l}$ . Τα δείγματα του ασκορβικού οξέος παρουσίασαν υψηλές τιμές  $k$  και  $\Delta A\%$ , όχι όμως τις υψηλότερες και τα δείγματα του Se 2,50 $\text{mg/l}$  και 1,25 $\text{mg/l}$  παρουσιάζει τη μικρότερη τιμή  $k$  και  $\Delta A\%$ . Όμως τα δείγματα των ταννινών γυγάρτων με βάση τις τιμές  $k$ , οξειδώνονται εύκολα κάτι που έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα αυτής της μεθόδου. Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από τις τιμές της αντιοξειδωτικής ικανότητας, συνδυάζοντας τις τιμές του δείκτη  $\Delta A\%_{420}$  και του συντελεστή  $k$  βρίσκονται σε συμφωνία όπως ήδη έχει επαληθευτεί από τους Sioumis et al., 2005; Vlahou et al., 2022, όπου οι τελευταίοι είχαν υποστηρίξει ότι το καφέτιασμα συμφωνεί με τη μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Ας σημειωθεί ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα όλων των δειγμάτων αυξομειώνεται κατά τη διάρκεια του δωδεκαήμερου της επιταχυνόμενης οξείδωσης, παρόλο που η τιμή της είναι χαμηλή στις συνθήκες αυτού του πειράματος. Σύμφωνα με την έρευνα των Kallithraka et al., (2009) που διεξήχθη σε παλαιωμένο στη φιάλη κρασί, εξαιτίας του σχηματισμού νέων αντιοξειδωτικών λόγω των αντιδράσεων ανάμεσα στις οξειδωμένες φαινολικές ενώσεις, δεν είναι δυνατό να προβλεφθούν οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες του οίνου.

#### **7.4) Προσδιορισμός ολικών φαινολικών – μέθοδος Folin-Ciocalteu**

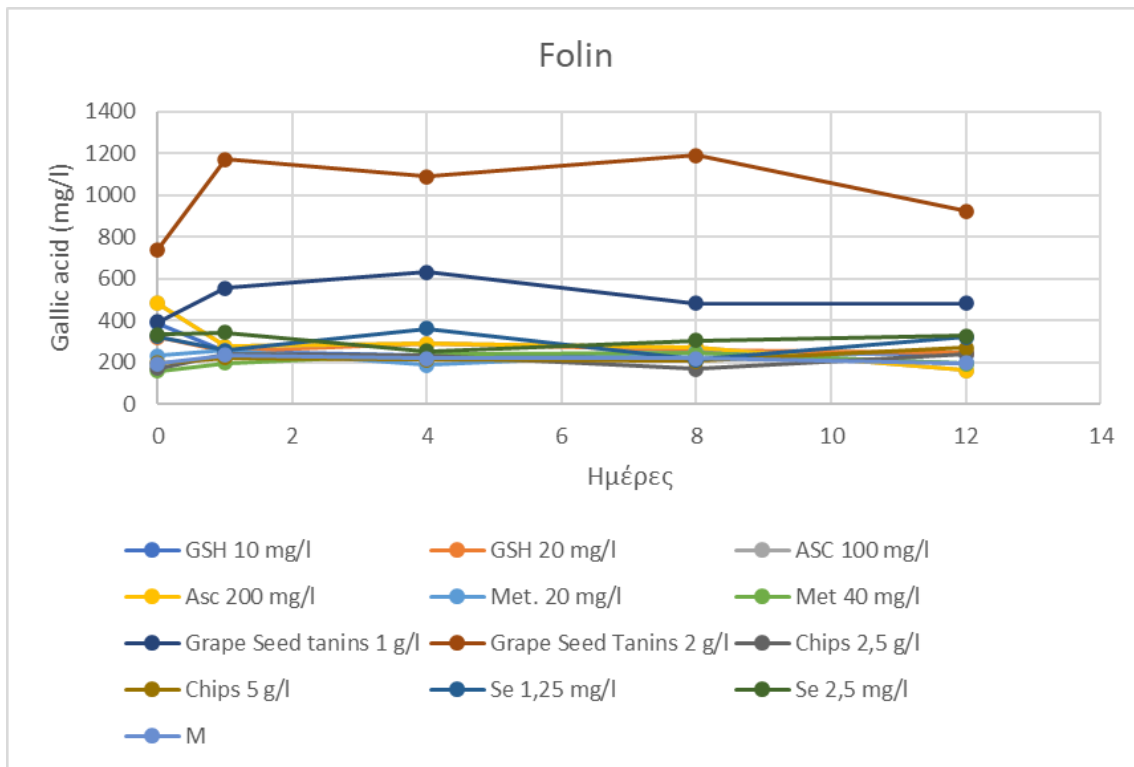
Έχει παρατηρηθεί ότι υψηλότερο ποσοστό καφετιάσματος παρουσίασαν τα κρασιά με μεγάλες διαφορές στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο κατά το διάστημα της επιταχυνόμενης οξείδωσης στους 55°C. Κάτι τέτοιο εξηγείται διότι οι ortho-κινόνες που σχηματίστηκαν από τις ortho-διϋδροξυφαινολικές ενώσεις (κατεχίνη, επικατεχίνη, καφεϊκό οξύ και άλλα υδροξυκιναμμομικά οξέα) έχουν αυξηθεί. Επίσης οι ortho-κινόνες που προέρχονται από τις ortho-διϋδροξυφαινολικές ενώσεις είναι πιθανό να μειώσουν το ολικό φαινολικό περιεχόμενο που προσδιορίζεται με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu (Kotseridis et al., 2013).



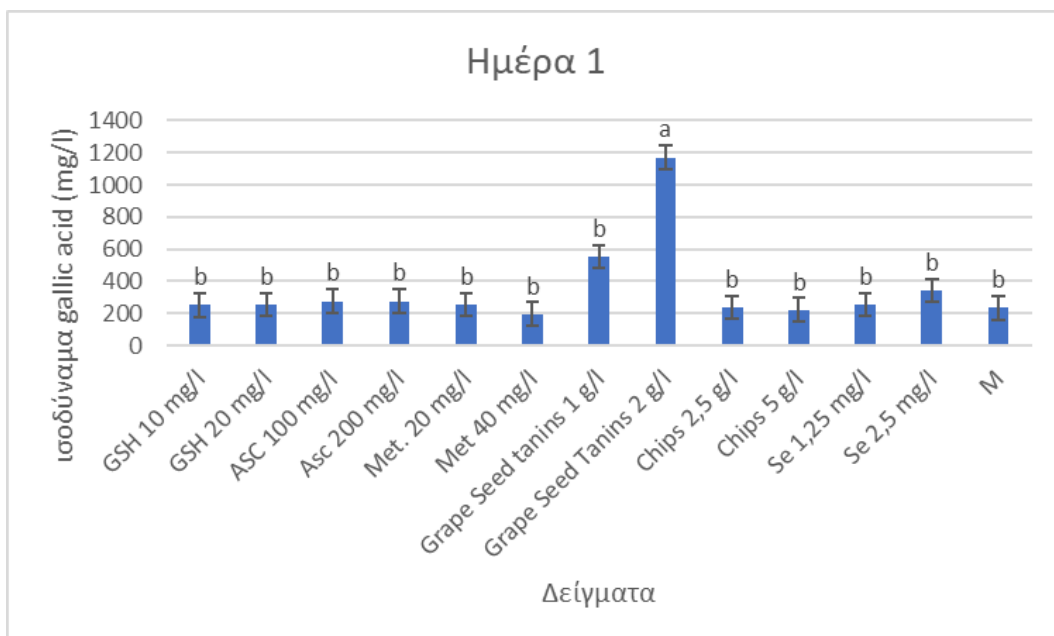
**Πίνακας 8:** Ολικές Φαινολικές ενώσεις των δειγμάτων απο την ημέρα 0 έως 12

Φαινολικές ενώσεις	Ημέρα 0	Ημέρα 1	Ημέρα 2	Ημέρα 3	Ημέρα 4	Ημέρα 5	Ημέρα 6
<b>GSH 10 mg/l</b>	385,429 <sup>bcd</sup> ±0,000	253,143 <sup>b</sup> ±0,000	241,185 <sup>b</sup> ±16,614	275,900 <sup>b</sup> ±20,100	235,043 <sup>bc</sup> ±5,243	288,186 <sup>bc</sup> ±46,386	297,471 <sup>b</sup> ±35,671
<b>GSH 20 mg/l</b>	321,686 <sup>cde</sup> ±90,888	253,614 <sup>b</sup> ±43,814	399,500 <sup>b</sup> ±59,500	469,500 <sup>b</sup> ±68,388	288,186 <sup>bc</sup> ±46,385	631,166 <sup>b</sup> ±2,277	492,278 <sup>b</sup> ±88,944
<b>Asc. Ac. 100 mg/l</b>	483,143 <sup>b</sup> ±0,000	276,257 <sup>b</sup> ±114,543	1157,111 <sup>a</sup> ±159,222	1209,333 <sup>a</sup> ±110,333	289,257 <sup>bc</sup> ±7,543	1088,222 <sup>c</sup> ±255,888	1163,222 <sup>a</sup> ±147,555
<b>Asc. Ac. 200 mg/l</b>	424,800 <sup>bc</sup> ±0,000	253,757 <sup>b</sup> ±92,043	325,143 <sup>b</sup> ±0,000	380,857 <sup>b</sup> ±0,000	273,757 <sup>bc</sup> ±7,957	362,286 <sup>bc</sup> ±0,000	352,286 <sup>b</sup> ±0,000
<b>Met. 20 mg/l</b>	229,800 <sup>ef</sup> ±0,000	256,257 <sup>b</sup> ±5,457	266,571 <sup>b</sup> ±34,285	308 <sup>b</sup> ±2,857	188,257 <sup>c</sup> ±23,457	253,714 <sup>bc</sup> ±34,285	303,714 <sup>b</sup> ±28,571
<b>Met. 40 mg/l</b>	159,8 <sup>ef</sup> ±0,000	195,685 <sup>b</sup> ±41,114	266,048 <sup>b</sup> ±7,854	295,290 <sup>b</sup> ±1,690	241,828±22,971	227,663 <sup>bc</sup> ±9,839	302,380 <sup>b</sup> ±11,294
<b>GST 1 g/l</b>	171,555 <sup>f</sup> ±6,333	553,389 <sup>b</sup> ±122,277	314,571 <sup>b</sup> ±0,000	253,471 <sup>b</sup> ±0,328	631,166 <sup>b</sup> ±2,277	235,043 <sup>bc</sup> ±5,243	253,185 <sup>b</sup> ±21,386
<b>GST 2 g/l</b>	196,555 <sup>ef</sup> ±2,444	1169,333 <sup>b</sup> ±81,444	253,257 <sup>b</sup> ±41,542	182,543 <sup>b</sup> ±92,257	1088,222 <sup>a</sup> ±255,888	188,257 <sup>c</sup> ±23,457	260,400 <sup>b</sup> ±44,400
<b>Chips 2,5 g/l</b>	394,444 <sup>bcd</sup> ±0,000	240,777 <sup>b</sup> ±113,111	210,257 <sup>b</sup> ±48,542	193,757 <sup>b</sup> ±42,042	229,889 <sup>bc</sup> ±7,555	241,829 <sup>bc</sup> ±22,971	270,257 <sup>b</sup> ±28,543
<b>Chips 5 g/l</b>	739,6667 <sup>a</sup> ±0,000	270,77 <sup>a</sup> ±83,667	208,222 <sup>b</sup> ±52,555	236,556 <sup>b</sup> ±59,777	213,222 <sup>bc</sup> ±89,777	229,889 <sup>bc</sup> ±7,555	280,444 <sup>b</sup> ±22,555
<b>Se 1,25 mg/l</b>	255,143 <sup>cde</sup> ±0,000	322,286 <sup>b</sup> ±0,000	238,777 <sup>b</sup> ±30,888	189,333 <sup>b</sup> ±60,333	362,286 <sup>bc</sup> ±0,000	213,222 <sup>bc</sup> ±89,777	232,666 <sup>b</sup> ±68,111
<b>Se 2,5 mg/l</b>	333 <sup>cde</sup> ±3,571	341,571 <sup>b</sup> ±26,428	309,257 <sup>b</sup> ±17,542	193,686 <sup>b</sup> ±69,114	253,714 <sup>bc</sup> ±34,286	273,757 <sup>bc</sup> ±7,957	278,328 <sup>b</sup> ±9,471
<b>M</b>	270,125 <sup>def</sup> ±4,495	276,978 <sup>b</sup> ±20,055	309,757 <sup>b</sup> ±18,042	216,186 <sup>b</sup> ±91,614	227,663 <sup>bc</sup> ±9,838	289,257 <sup>bc</sup> ±7,543	265,328 <sup>b</sup> ±3,528

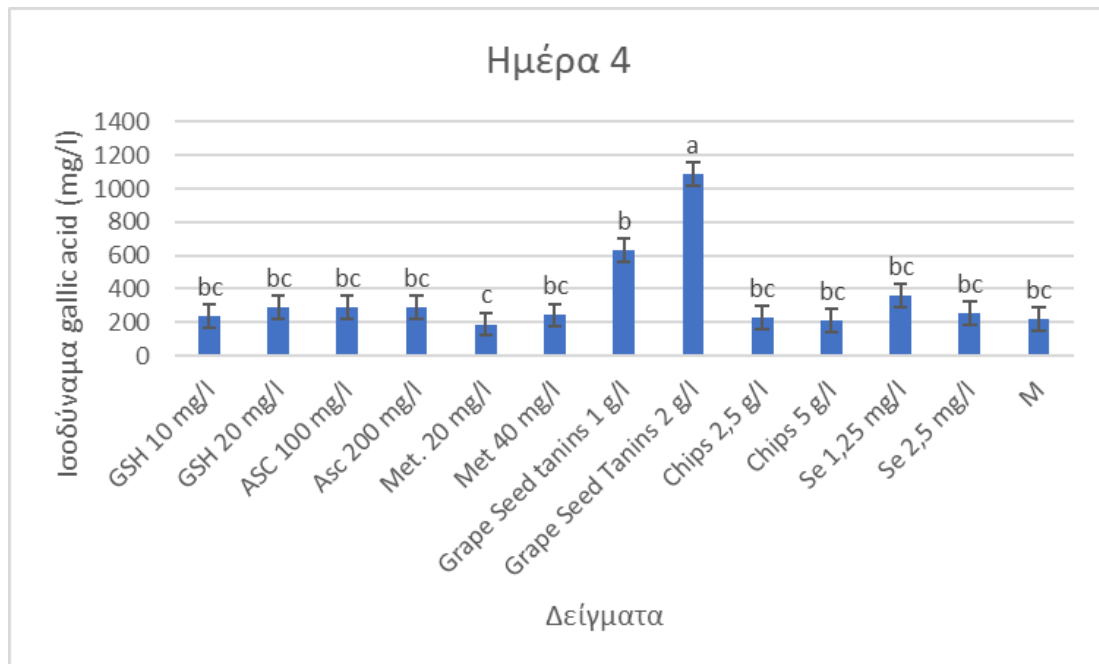
Φαινολικές ενώσεις	Ημέρα 7	Ημέρα 8	Ημέρα 9	Ημέρα 10	Ημέρα 11	Ημέρα 12
<b>GSH 10mg/l</b>	269,257 <sup>bc</sup> ±47,543	244,829 <sup>bc</sup> ±14,029	244,329 <sup>c</sup> ±4,528	225,900 <sup>c</sup> ±0,100	259,114 <sup>b</sup> ±11,686	236,114 <sup>def</sup> ±11,314
<b>GSH 20mg/l</b>	266,757 <sup>c</sup> ±24,957	261,257 <sup>bc</sup> ±0,457	236,543 <sup>c</sup> ±3,743	225,543 <sup>c</sup> ±34,743	171,471 <sup>b</sup> ±8,328	244,571 <sup>de</sup> ±0,000
<b>Asc.Ac 100mg/l</b>	268,471 <sup>c</sup> ±5,328	273,971 <sup>bc</sup> ±50,828	230,328 <sup>c</sup> ±1,471	186,900 <sup>c</sup> ±9,100	207,471 <sup>b</sup> ±35,671	163,043 <sup>f</sup> ±2,757
<b>Asc.Ac 200mg/l</b>	244,471 <sup>c</sup> ±18,671	247,471 <sup>bc</sup> ±24,329	236,828 <sup>c</sup> ±7,971	220,900 <sup>c</sup> ±24,900	236,471 <sup>b</sup> ±6,671	206,043 <sup>def</sup> ±45,757
<b>Met.20mg/l</b>	273,114 <sup>bc</sup> ±15,686	246,257 <sup>bc</sup> ±74,543	191,971 <sup>c</sup> ±8,828	212,329 <sup>c</sup> ±73,471	228,114 <sup>b</sup> ±30,686	197,686 <sup>def</sup> ±6,885
<b>Met. 40mg/l</b>	181,614 <sup>c</sup> ±24,185	243,971 <sup>bc</sup> ±19,171	221,257 <sup>c</sup> ±30,457	215,971 <sup>c</sup> ±12,829	187,114 <sup>b</sup> ±59,686	193,800 <sup>ef</sup> ±0,000
<b>GST 1g/l</b>	568,388 <sup>b</sup> ±66,166	481,722 <sup>b</sup> ±65,055	606,722 <sup>b</sup> ±42,277	577,278 <sup>b</sup> ±46,166	414,500 <sup>b</sup> ±58,944	483,444 <sup>def</sup> ±0,000
<b>GST 2g/l</b>	1115,444 <sup>a</sup> ±138,666	1187,667 <sup>a</sup> ±23,111	1040,444 <sup>a</sup> ±172,555	994,333 <sup>a</sup> ±158,666	927,111 <sup>a</sup> ±244,777	922,333 <sup>def</sup> ±0,000
<b>Chips 2,5</b>	202,111 <sup>c</sup> ±23,111	168,777 <sup>c</sup> ±83,111	214,333 <sup>c</sup> ±33,111	229,889 <sup>c</sup> ±23,111	162,111 <sup>b</sup> ±2,444	236,555 <sup>de</sup> ±0,000
<b>Chips 5g/l</b>	203,778 <sup>c</sup> ±91,444	206,556 <sup>bc</sup> ±97,556	187,666 <sup>c</sup> ±70,888	241,000 <sup>c</sup> ±49,777	159,888 <sup>b</sup> ±64,222	221,555 <sup>cd</sup> ±0,000
<b>Se 1,25mg/l</b>	345,143 <sup>bc</sup> ±0,000	212,286 <sup>bc</sup> ±0,000	345,143 <sup>bc</sup> ±0,000	183,714 <sup>c</sup> ±0,000	322,286 <sup>b</sup> ±0,000	320 <sup>c</sup> ±0,000
<b>Se 2,5 mg/l</b>	250,143 <sup>c</sup> ±13,571	303,714 <sup>bc</sup> ±28,571	319,428 <sup>bc</sup> ±14,286	257,286 <sup>c</sup> ±42,142	352,286 <sup>b</sup> ±20,000	326,571 <sup>c</sup> ±0,000
<b>M</b>	261,649 <sup>c</sup> ±9,732	234,072 <sup>bc</sup> ±8,145	252,853 <sup>c</sup> ±1,505	202,206 <sup>c</sup> ±2,039	181,026 <sup>b</sup> ±17,563	219,382 <sup>def</sup> ±0,441



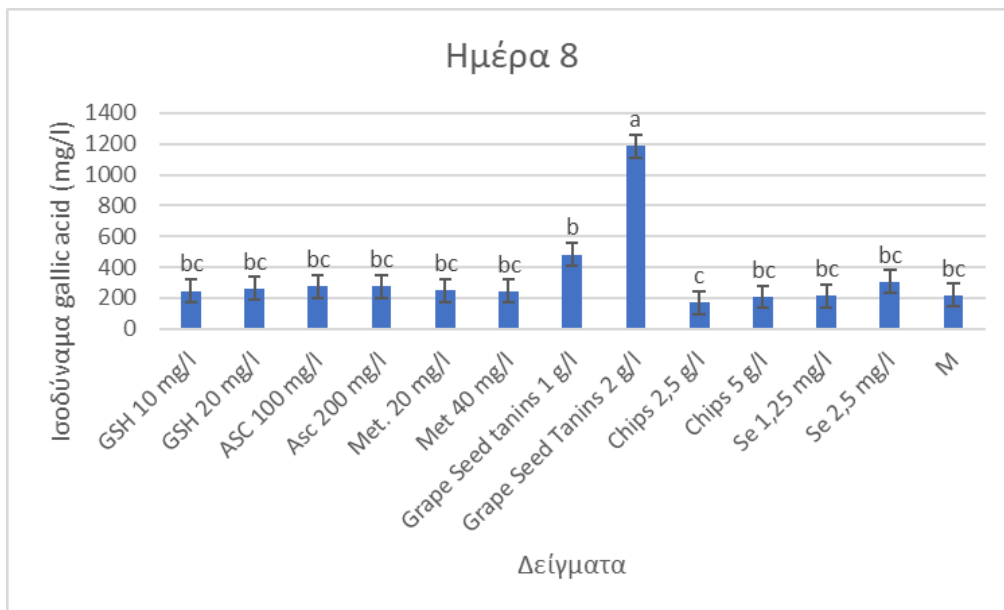
**Διάγραμμα 19:** Συγκένρωση ολικών φαινολικών τις ημέρες 0, 1, 4, 8 και 12 κατά τη διάρκεια του πειράματος επιταχυνόμενης οξείδωσης στους 55° C



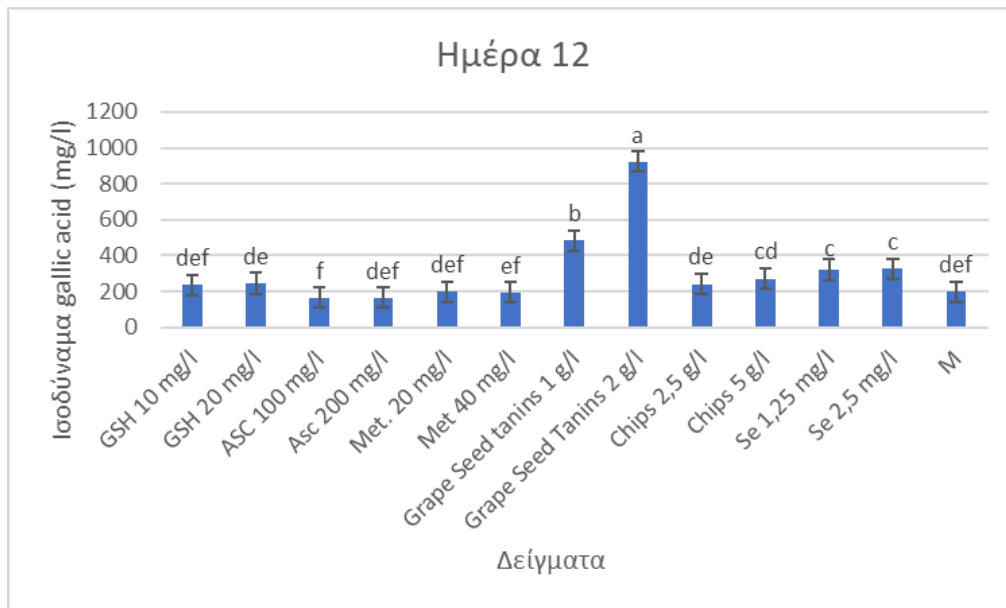
**Διάγραμμα 20:** Συγκένρωση ολικών φαινολικών τη ημέρα 1 κατά τη διάρκεια του πειράματος επιταχυνόμενης οξείδωσης στους 55° C



**Διάγραμμα 21:** Συγκένρωση ολικών φαινολικών τη ημέρα 4 κατά τη διάρκεια του πειράματος επιταχυνόμενης οξείδωσης στους 55° C



**Διάγραμμα 22:** Συγκένρωση ολικών φαινολικών την ημέρα 8 κατά τη διάρκεια του πειράματος επιταχυνόμενης οξείδωσης στους 55° C



**Διάγραμμα 23:** Συγκέντρωση ολικών φαινολικών τη ημέρα 12 κατά τη διάρκεια του πειράματος επιταχυνόμενης οξείδωσης στους 55° C

Στον οίνο περιέχονται φαινολικές ενώσεις που έχουν μεταξύ τους μια οξειδοαναγωγική ισορροπία και αλληλομετατρέπονται σε διαφορετικές μορφές. Οι φαινολικές ενώσεις σύμφωνα με τους Sioumis et al., (2005); Vlahou et al. (2021) μπορούν να λειτουργήσουν ως δότες πρωτονίων ( $H^+$ ) όπως και ως δότες ηλεκτρονίων (αντιοξειδωτικά-αναγωγικά μέσα) ενώ οι πολυφαινολικές ενώσεις δρουν ως οξειδωτικοί παράγοντες, προσλαμβάνουν δηλαδή ηλεκτρόνια για να αναχθούν. Σε αμφότερες περιπτώσεις, αφού συμμετέχουν σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, οι συγκεντρώσεις είναι λογικό να ελαττώνονται.

Σύμφωνα με το διάγραμμα 19 στα αποτελέσματα σε όλων των δειγμάτων παρατηρείται μια τελική μείωση στις ολικές φαινολικές ενώσεις που περιέχονται, σε κάποια περισσότερο ενώ σε άλλα λιγότερο στη θερμοκρασία των 55°C. Επίσης σε γενικές γραμμές φαίνονται αυξομειώσεις στις τιμές της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών οι οποίες υποδεικνύουν τη συμμετοχή των πολυφαινολών στις αντιδράσεις οξειδοαναγωγής.

Πιο ειδικά τα μόνα δείγματα που δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 με το δείγμα του μάρτυρα την ημέρα 1 είναι αυτά των δύο συγκεντρώσεων chips δρυός 2,5 g/l και 5 g/l και τα δείγματα των δύο συγκεντρώσεων metabisulfite 20 mg/l και 40mg/l ενώ με όλα τα υπόλοιπα παρουσιάζουν σημαντική στατιστική διαφορά σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05. Αντίθετα, τις επόμενες μέρες η πλειοψηφία των δειγμάτων δε διαφέρει στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 με τον μάρτυρα, παρόλα αυτά την ημέρα 1 το δείγμα που διαφέρει σημαντικά είναι το δείγμα με grape seed tanins 2g/l και τις ημέρες 2 και 3 το δείγμα με τη μικρότερη

συγκέντρωση ασκορβικού οξέος 100 mg/l. Επίσης την ημέρα 4 το μόνο δείγμα που διαφέρει στατιστικά σημαντικά είναι των ταννινών γιγάρτων 2 g/l και την 6 το δείγμα του ασκορβικού οξέος συγκέντρωσης 100 mg/l. Από την ημέρα 8 έως και την ημέρα 11 το μόνο δείγμα που παρουσιάζει όλες τις ημέρες στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 είναι στο δείγμα γιαγάρτων ταννινών συγκεντρωσης 2 g/l. Άλλα δείγματα που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά με τον μάρτυρα είναι κατά την ημέρα 7 το δείγμα του σεληνίου 1,25 mg/l, του metabisulfite 20 mg/l, της γλουταθειόνης 10 mg/l και του δείγματος ταννινών γιγάρτων 1 g/l. Την ημέρα 9 φαίνεται να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά με τον μάρτυρα τα δείγματα των δύο συγκεντρώσεων σεληνίου και γιγάρτων ταννινών στην συγκέντρωση 1 g/l. Όπως και την ημέρα 10 πέρα από το πυκνό δείγμα ταννινών διαφέρει στατιστικά σημαντικά με τον μάρτυρα σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 το δείγμα ταννινών γιγάρτων 1 g/l. Τέλος, την τελευταία μέρα του καφετιάσματος, ημέρα 12, τα δείγματα που εμφανίζουν στατιστικά μεγάλη διαφορά με τον μάρτυρα είναι τα δείγματα των δύο συγκεντρώσεων σεληνίου 1,25 mg/l και 2,50 mg/l και chips 5 g/l.

Όπως φαίνεται στο διάγραμμα 19 υπάρχουν αυξομειώσεις στις τιμές της συγκέντρωσης των ολικών φαινολών, με την κάθε αντιοξειδωτική ουσία να συμπεριφέρεται με διαφορετικό τρόπο. Παρατηρώντας τις μεταβολές ανά διαστήματα όπως φαίνεται στο διάγραμμα αυτό γίνονται οι ακόλουθες αυξομειώσεις. Δηλαδή, το διάστημα των πρώτων ημερών 0 και 1 τα δείγματα με ταννίνες γιγάρτων 1 g/l και 2 g/l, metabisulfite 20mg/l και 40 mg/l και Se 2,5 mg/l παρουσιάζουν αύξηση της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών ενώσεων ενώ τα υπόλοιπα δείγματα δηλαδή των δύο συγκεντρώσεων ασκορβικού οξέος, γλουταθειόνης και σεληνίου 2,5 mg/l μείωση. Από τη μέρα 1 έως και 4 συνεχίζει να αυξάνεται η περιεκτικότητα σε ολικές φαινολικές ενώσεις των δειγμάτων των δύο συγκεντρώσεων του σεληνίου και των ταννινών γιγάρτων συγκέντρωσης 1 g/l. Επίσης αυξάνονται οι τιμές της γλουταθειόνης 20 mg/l, των δύο συγκεντρώσεων ασκορβικού οξέος και του metabisulfite 40 mg/l. Η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών των υπόλοιπων δειγμάτων μειώνεται. Κατά τη διάρκεια του διαστήματος από την ημέρα 4 έως 8 τα δείγματα στα οποία παρουσιάζεται αύξηση τιμών είναι αυτά των ταννινών γιγάρτων 2 g/l, Se 2,5 mg/l, GSH 10 mg/l και των δύο συγκεντρώσεων metabisulfite 20 και 40mg/l. Ενώ στο διάστημα που διαρκεί από την ημέρα 8 μέχρι και 12 η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών όλων των δειγμάτων μειώνεται εκτός από τα δείγματα με ταννίνες γιγάρτων συγκέντρωσης 1 g/l, των δύο συγκεντρώσεων chips δρυός και Se. Τέλος, τη μεγαλύτερη τιμή συγκέντρωσης ολικών φαινολικών παρουσιάζουν τα δείγματα των δύο συγκεντρώσεων ταννινών γιγάρτων 1g/l και 2g/l που έχει την υψηλότερη τιμή απορρόφησης στα 420 nm και τιμή δείκτη καφετιάσματος ,ενώ τη

μικρότερη την έχει το δείγμα του ασκορβικού 100mg/l. Το δείγμα του ασκορβικού 100 mg/l παρουσιάζει κι αυτό υψηλές τιμές δείκτη καφετιάσματος και απορρόφησης, ενώ και τα τρία δείγματα παρουσίασαν τις μεγαλύτερες μεταβολές των ολικών φαινολικών από την ημέρα 1 έως 12. Αποδεικνύεται ο περίπλοκος ρόλος των πολυφαινολών καθώς δεν παρουσιάζεται κάποια συσχέτιση με τις αυξήσεις και τις μειώσεις των τιμών της απορρόφησης στα 420nm ή στις τιμές K. Σύμφωνα με τους (Rossi & Singleton, 1966; Sioumis et al., 2005; Vlahou et al., 2022) δεν διαθέτουν όλες οι πολυφαινολικές ενώσεις την ίδια σημαντικότητα, καθώς η παραγωγή των προϊόντων οξείδωσης δεν συνάδει με την ευκολία παρουσίασης της οξειδωτικής κασάνωσης στον οίνο.

## 8) Αποτελέσματα των φαινολικών ενώσεων με την HPLC

Με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας υψηλών πιέσεων προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις των φαινολικών ενώσεων (μεμονωμένων). Στον πίνακα 10 φαίνονται οι συγκεντρώσεις των φλαβονοειδών συστατικών (φλαβαν-3-ολών) και στους πίνακες 8, 9 οι συγκεντρώσεις των μη φλαβονοειδών συστατικών μετά την ανάλυση των δειγμάτων. Τα δείγματα προέρχονται από τις ημέρες 0 και 12 του πειράματος της επιταχυνόμενης οξειδωσης στους 55°C. Οι φαινολικές ενώσεις που βρέθηκαν με τη βοήθεια της HPLC την ημέρα 0 και 12 ήταν:

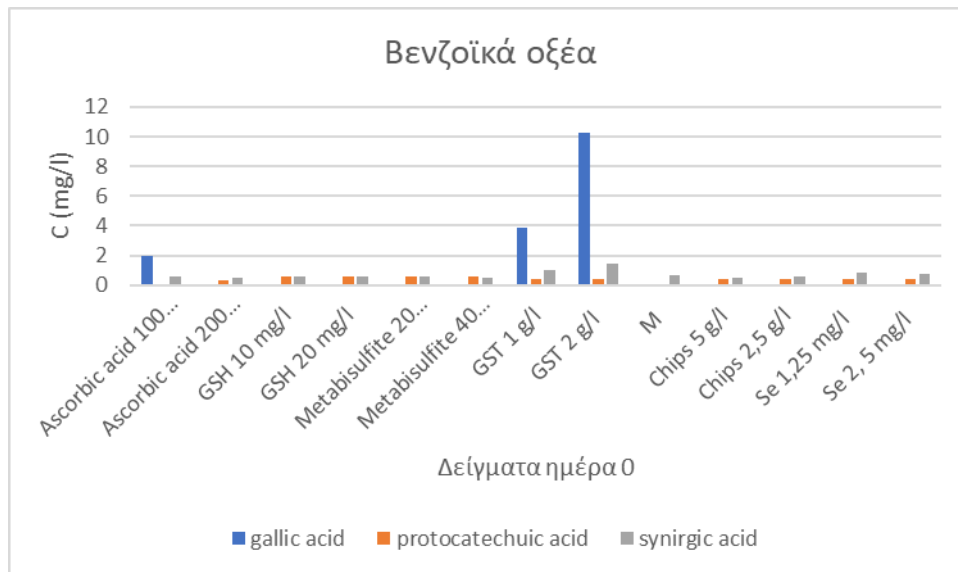
- Υδροξυκιναμωμικά οξέα όπως το καφταρικό, το καφεϊκό, το p- κουμαρικό και το κουταρικό οξύ.
- Φλαβανόλες και Φλαβονόλες όπως η κατεχίνη, η προκυανιδίνη-B1, η προκυανιδίνη-A2 και η γαλλικός εστέρας επικατεχίνης (ECG).
- Βενζοϊκά οξέα όπως το PCA (Protocatechuic acid) ή διϋδροξυβενζοϊκό οξύ και το 4-υδροξυ-3,5- διμεθυλοξυβενζοϊκό οξύ ή syringic acid και το γαλλικό οξύ.

Η συγκέντρωση (mg/l) των φαινολικών συστατικών ποσοτικοποιήθηκε όπως φαίνεται στους ακόλουθους πίνακες και οι τιμές που έχουν διαφορετικό εκθέτη παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 ( $p < 0,05$ ).

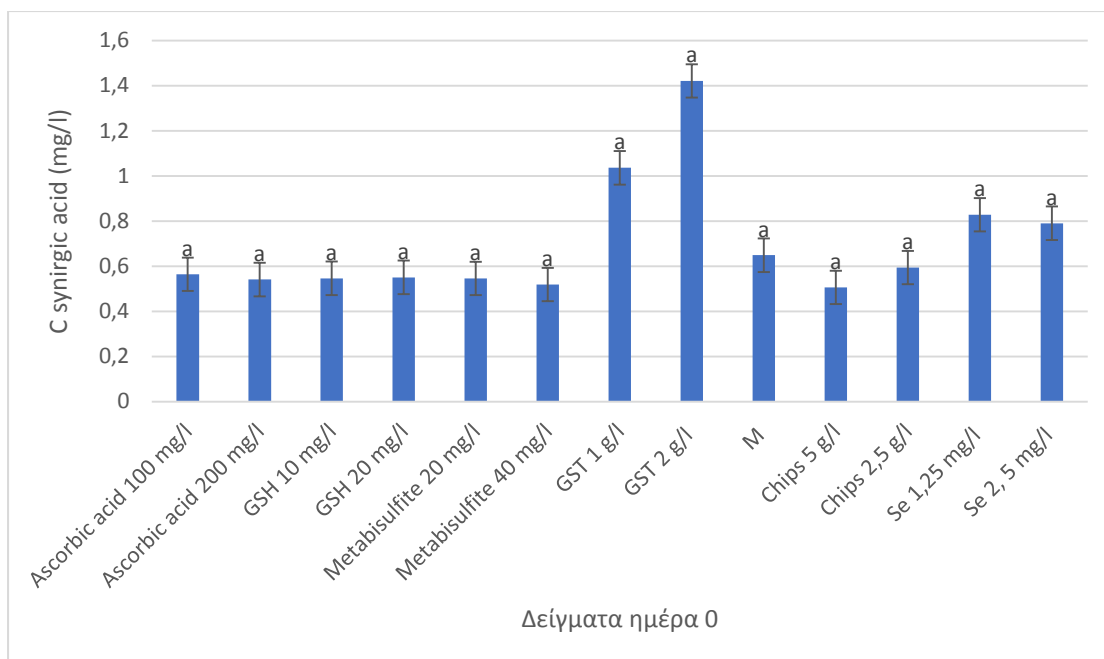
**Πίνακας 9: Βενζοϊκά οξέα**

Δείγματα ημέρα 0	Gallic acid	Protocatechuic acid	Synirgic acid	Σύνολο
Ascorbic acid 100 mg/l	1,989 <sup>c</sup> ±0,000	0,000 <sup>e</sup> ±0,000	0,564 <sup>a</sup> ±0,000	<b>2,553</b>
Ascorbic acid 200 mg/l	0,000 <sup>d</sup> ±0,000	0,354 <sup>d</sup> ±0,000	0,541 <sup>a</sup> ±0,000	<b>0,895</b>
GSH 10 mg/l	0,000 <sup>d</sup> ±0,000	0,574 <sup>a</sup> ±0,000	0,546 <sup>a</sup> ±0,000	<b>1,12</b>
GSH 20 mg/l	0,000 <sup>d</sup> ±0,000	0,562 <sup>a</sup> ±0,003	0,550 <sup>a</sup> ±0,000	<b>1,112</b>
Metabisulfite 20 mg/l	0,000 <sup>d</sup> ±0,000	0,594 <sup>a</sup> ±0,000	0,546 <sup>a</sup> ±0,000	<b>1,14</b>
Metabisulfite 40 mg/l	0,000 <sup>d</sup> ±0,000	0,584 <sup>a</sup> ±0,000	0,518 <sup>a</sup> ±0,000	<b>1,102</b>
GST 1 g/l	3,844 <sup>b</sup> ±0,029	0,409 <sup>bc</sup> ±0,000	1,036 <sup>a</sup> ±0,935	<b>5,289</b>
GST 2 g/l	10,282 <sup>a</sup> ±1,189	0,454 <sup>b</sup> ±0,000	1,421 <sup>a</sup> ±1,253	<b>12,157</b>
M	0,000 <sup>d</sup> ±0,000	0,000 <sup>e</sup> ±0,000	0,649 <sup>a</sup> ±0,135	<b>0,649</b>
Chips 5 g/l	0,000 <sup>d</sup> ±0,000	0,374 <sup>cd</sup> ±0,033	0,506 <sup>a</sup> ±0,027	<b>0,88</b>
Chips 2,5 g/l	0,000 <sup>d</sup> ±0,000	0,374 <sup>cd</sup> ±0,009	0,594 <sup>a</sup> ±0,080	<b>0,968</b>
Se 1,25 g/l	0,000 <sup>d</sup> ±0,000	0,406 <sup>bcd</sup> ±0,008	0,828 <sup>a</sup> ±0,002	<b>1,243</b>
Se 2,5 g/l	0,000 <sup>d</sup> ±0,000	0,402 <sup>bcd</sup> ±0,000	0,790 <sup>a</sup> ±0,002	<b>1,192</b>

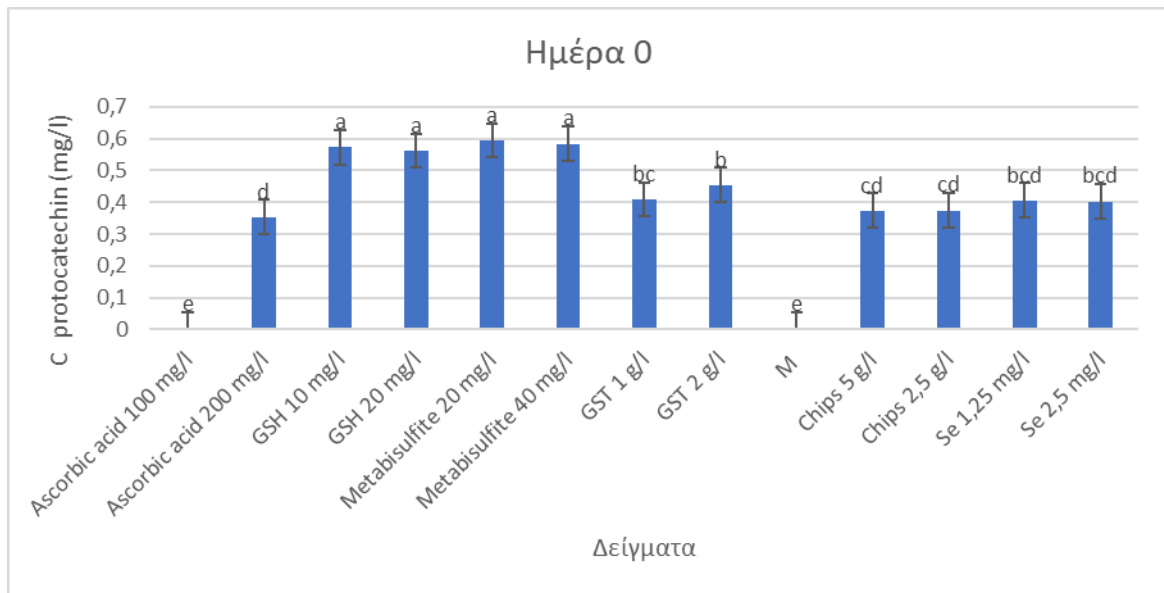




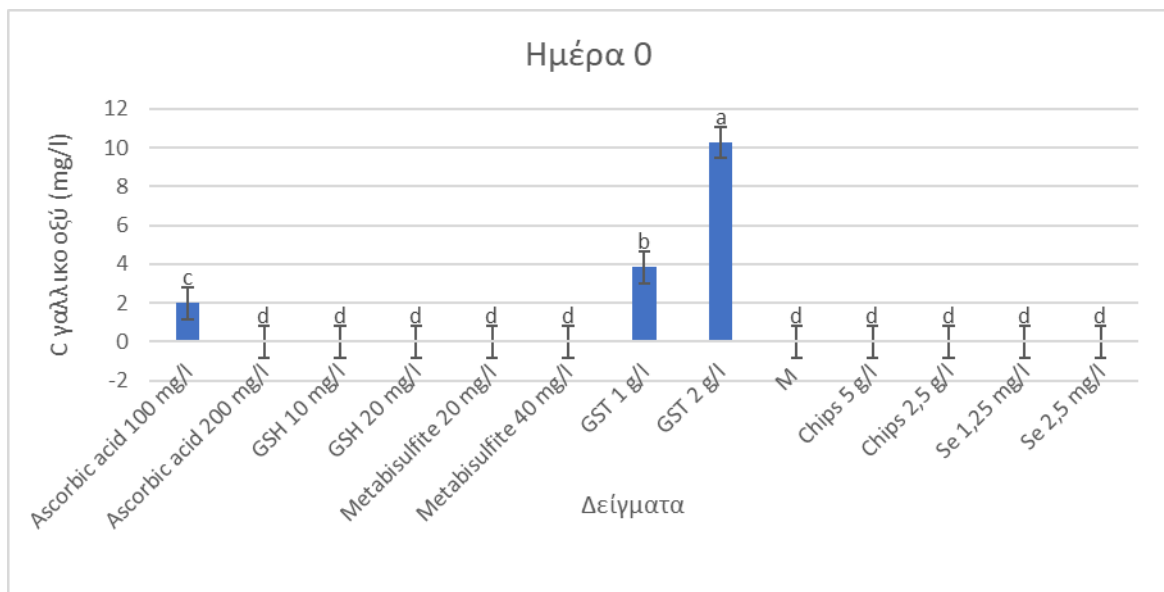
**Διάγραμμα 24:** Συγκέντρωση βενζοϊκών οξέων (mg/l) σε κάθε ένα από τα δείγματα την ημέρα 0 του καφετιάσματος



**Διάγραμμα 25:** Συγκέντρωση syringic acid (mg/l) σε κάθε ένα από τα δείγματα την ημέρα 0 του καφετιάσματος



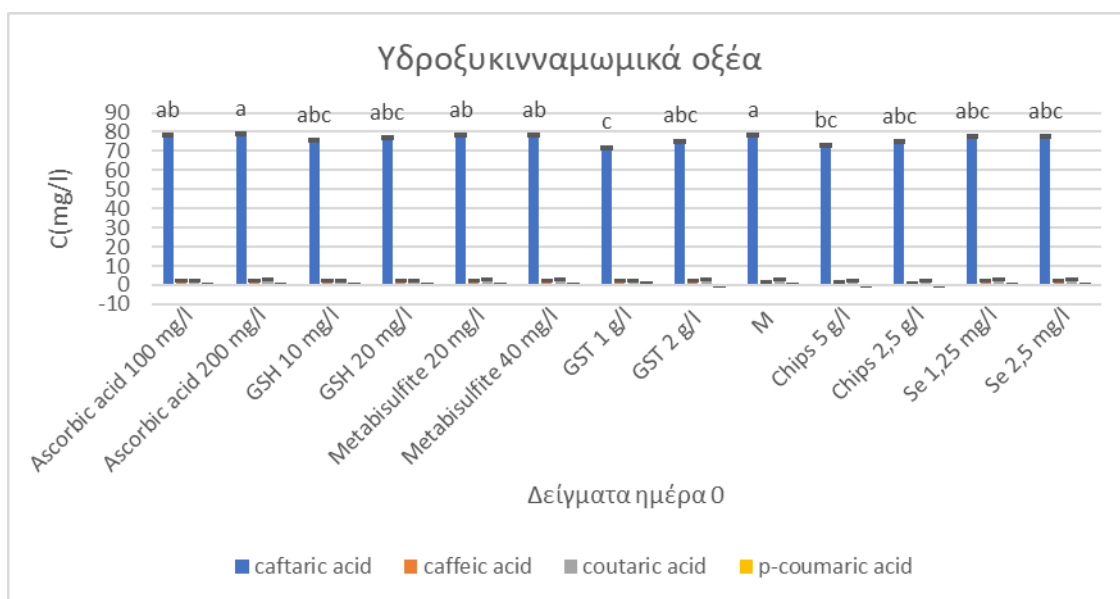
**Διάγραμμα 26:** Συγκέντρωση protocatechin acid (mg/l) σε κάθε ένα από τα δείγματα την ημέρα 0 του καφετιάσματος



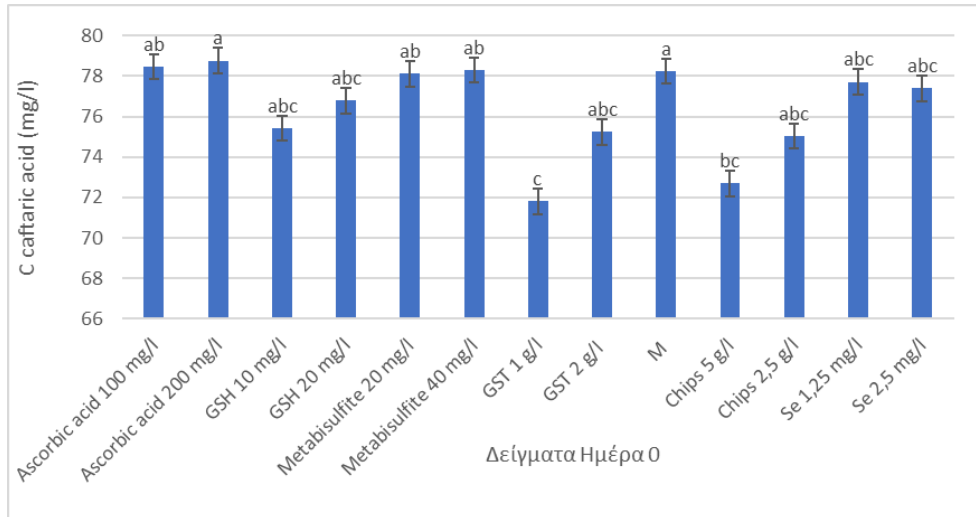
**Διάγραμμα 27:** Συγκέντρωση gallic acid (mg/l) σε κάθε ένα από τα δείγματα την ημέρα 0 του καφετιάσματος

Πίνακας 10: Υδροξυκινναμωμικά οξέα

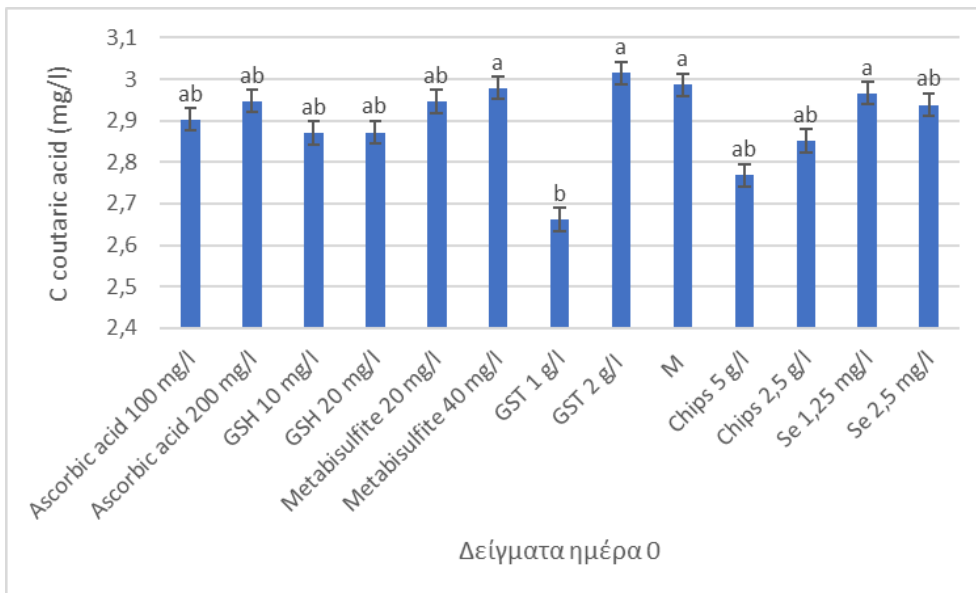
Δείγματα ημέρας 0	caftaric acid	caffeic acid	coutaric acid	p-coumaric acid	Σύνολο
Ascorbic acid 100 mg/l	78,469 <sup>ab</sup> ±0,000	2,439 <sup>a</sup> ±0,000	2,903 <sup>ab</sup> ±0,000	0,597 <sup>ab</sup> ±0,000	<b>84,408</b>
Ascorbic acid 200 mg/l	78,756 <sup>ab</sup> ±0,000	2,457 <sup>a</sup> ±0,000	2,947 <sup>ab</sup> ±0,000	0,657 <sup>ab</sup> ±0,000	<b>84,817</b>
GSH 10 mg/l	75,419 <sup>ab</sup> ±0,000	2,476 <sup>a</sup> ±0,000	2,871 <sup>ab</sup> ±0,000	0,571 <sup>ab</sup> ±0,000	<b>81,337</b>
GSH 20 mg/l	76,791 <sup>ab</sup> ±0,000	2,496 <sup>a</sup> ±0,000	2,872 <sup>ab</sup> ±0,000	0,657 <sup>ab</sup> ±0,000	<b>82,816</b>
Metabisulfite 20 mg/l	78,111 <sup>ab</sup> ±0,000	2,482 <sup>a</sup> ±0,000	2,946 <sup>ab</sup> ±0,000	0,664 <sup>ab</sup> ±0,000	<b>84,203</b>
Metabisulfite 40 mg/l	78,301 <sup>ab</sup> ±0,000	2,477 <sup>a</sup> ±0,000	2,979 <sup>a</sup> ±0,000	0,588 <sup>ab</sup> ±0,000	<b>84,345</b>
GST 1g/l	71,814 <sup>a</sup> ±0,000	2,263 <sup>a</sup> ±0,163	2,661 <sup>b</sup> ±0,127	1,066 <sup>a</sup> ±0,1108	<b>77,804</b>
GST 2 g/l	75,242 <sup>b</sup> ±0,000	2,456 <sup>a</sup> ±0,012	3,015 <sup>a</sup> ±0,028	0,221 <sup>b</sup> ±0,002	<b>80,934</b>
M	78,244 <sup>b</sup> ±1,047	1,743 <sup>a</sup> ±0,769	2,987 <sup>a</sup> ±0,039	0,235 <sup>b</sup> ±0,235	<b>83,209</b>
Chips 5 g/l	72,691 <sup>b</sup> ±5,547	1,970 <sup>a</sup> ±0,338	2,768 <sup>ab</sup> ±0,136	0,000 <sup>b</sup> ±0,000	<b>77,429</b>
Chips 2,5 g/l	75,027 <sup>b</sup> ±0,496	1,267 <sup>a</sup> ±1,062	2,852 <sup>ab</sup> ±0,018	0,000 <sup>b</sup> ±0,000	<b>79,146</b>
Se 1,25 mg/l	77,708 <sup>ab</sup> ±0,378	2,464 <sup>a</sup> ±0,023	2,966 <sup>a</sup> ±0,007	0,316 <sup>ab</sup> ±0,317	<b>83,454</b>
Se 2,5 mg/l	77,395 <sup>ab</sup> ±0,211	2,458 <sup>a</sup> ±0,003	2,938 <sup>ab</sup> ±0,015	0,301 <sup>ab</sup> ±0,300	<b>83,092</b>



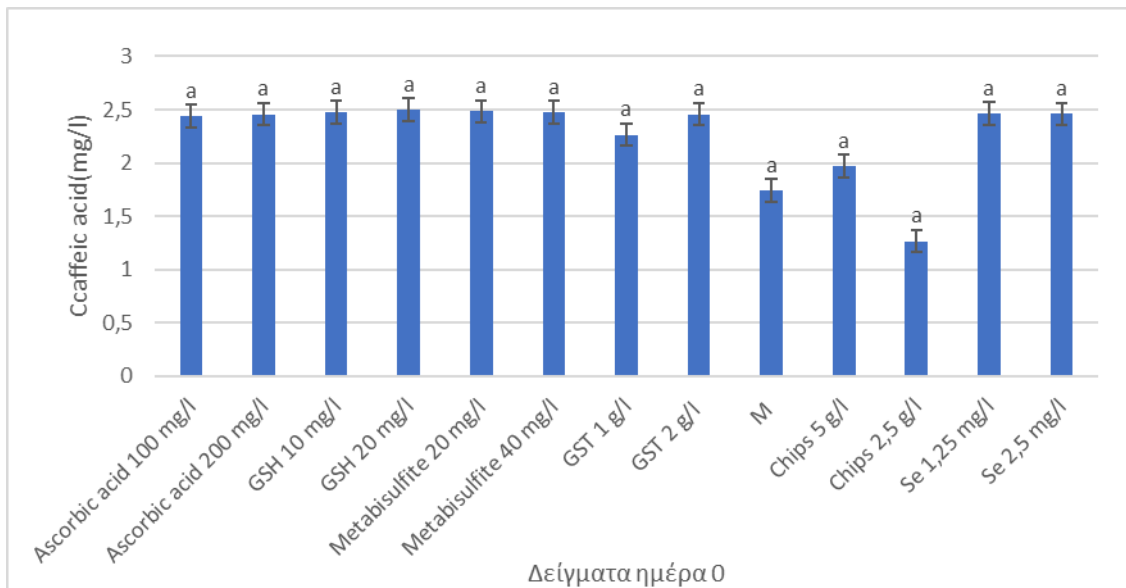
Διάγραμμα 28: Συγκέντρωση υδροξυκινναμωμικών οξέων σε κάθε ένα από τα δείγματα την ημέρα 0 του καφετιάσματος



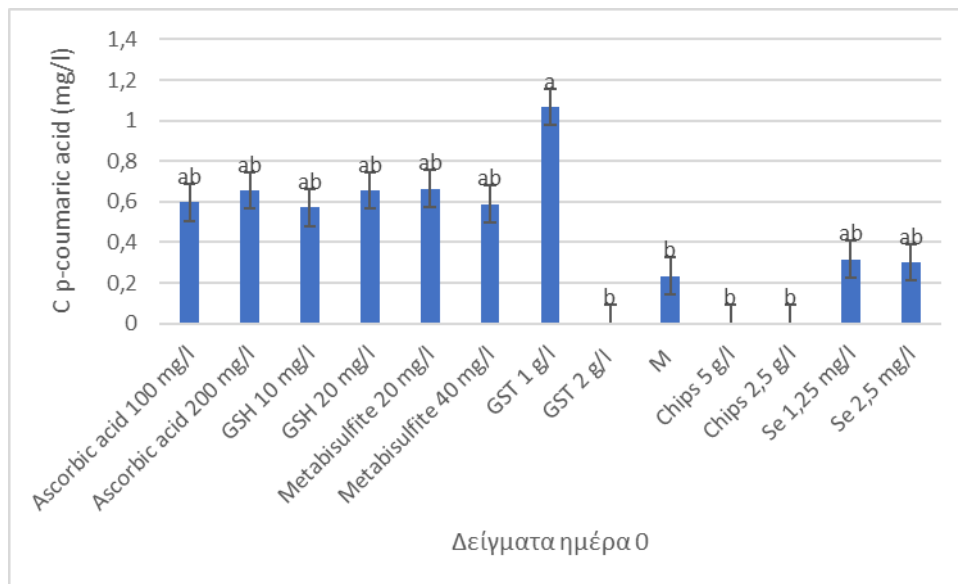
**Διάγραμμα 29:** Συγκέντρωση καφταρικού οξέος (mg/l) σε κάθε ένα από τα δείγματα την ημέρα 0 του καφετιάσματος



**Διάγραμμα 30:** Συγκέντρωση κουταρικού οξέος (mg/l) σε κάθε ένα από τα δείγματα την ημέρα 0 του καφετιάσματος



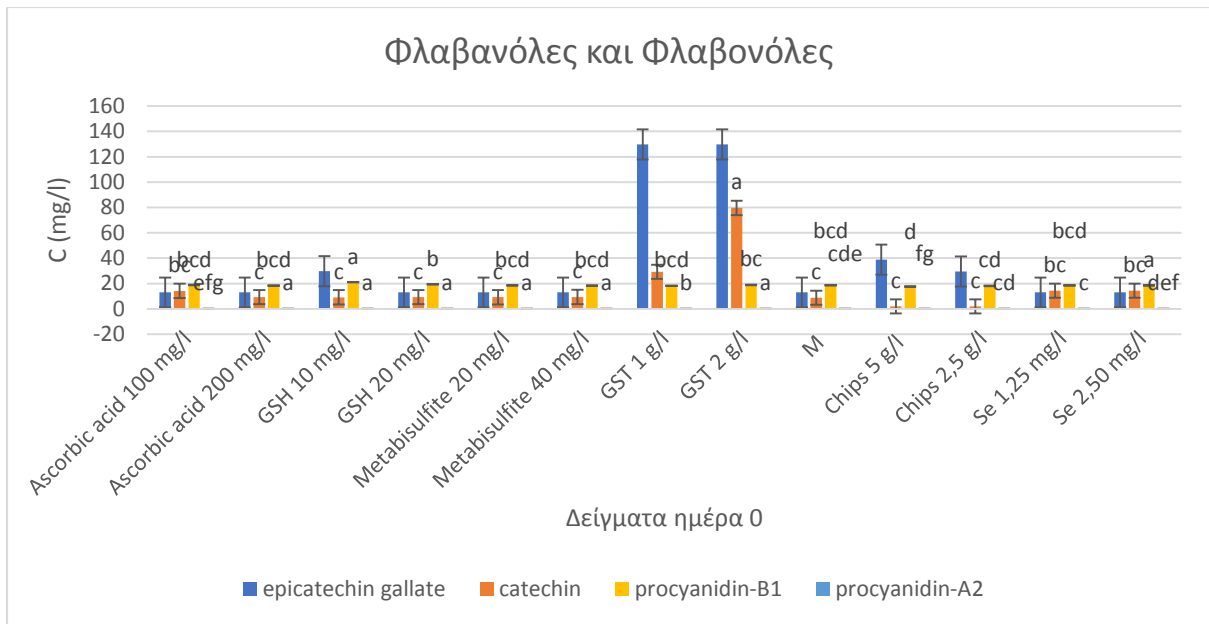
**Διάγραμμα 31:** Συγκέντρωση καφεϊκού οξέος (mg/l) σε κάθε ένα από τα δείγματα την ημέρα 0 του καφετιάσματος



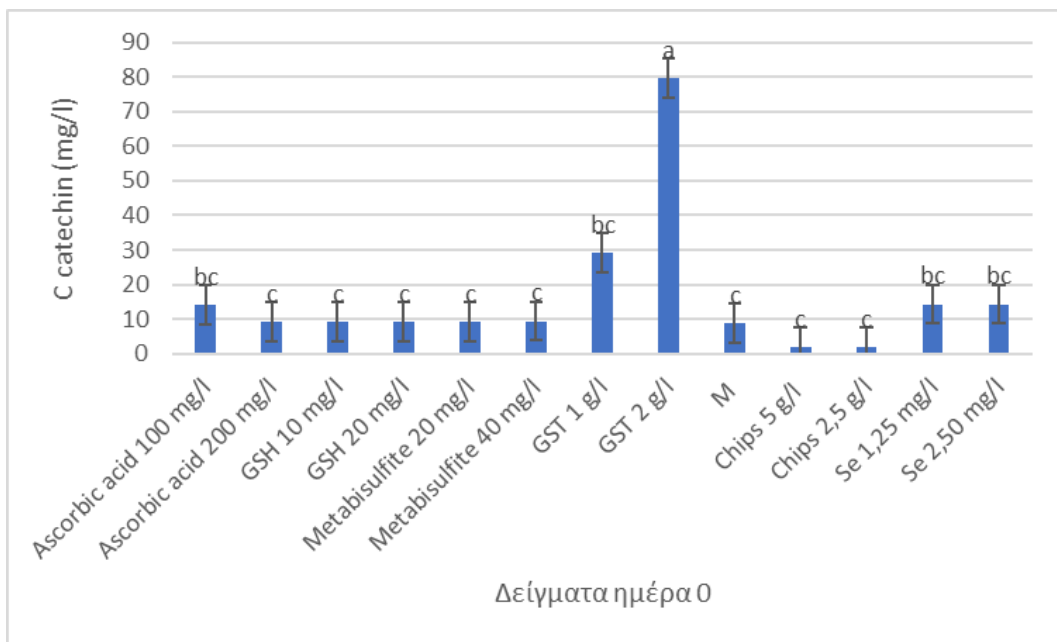
**Διάγραμμα 32:** Συγκέντρωση p-κουμαρικού οξέος (mg/l) σε κάθε ένα από τα δείγματα την ημέρα 0 του καφετιάσματος

**Πίνακας 11:** Φλαβανόλες και Φλαβονόλες

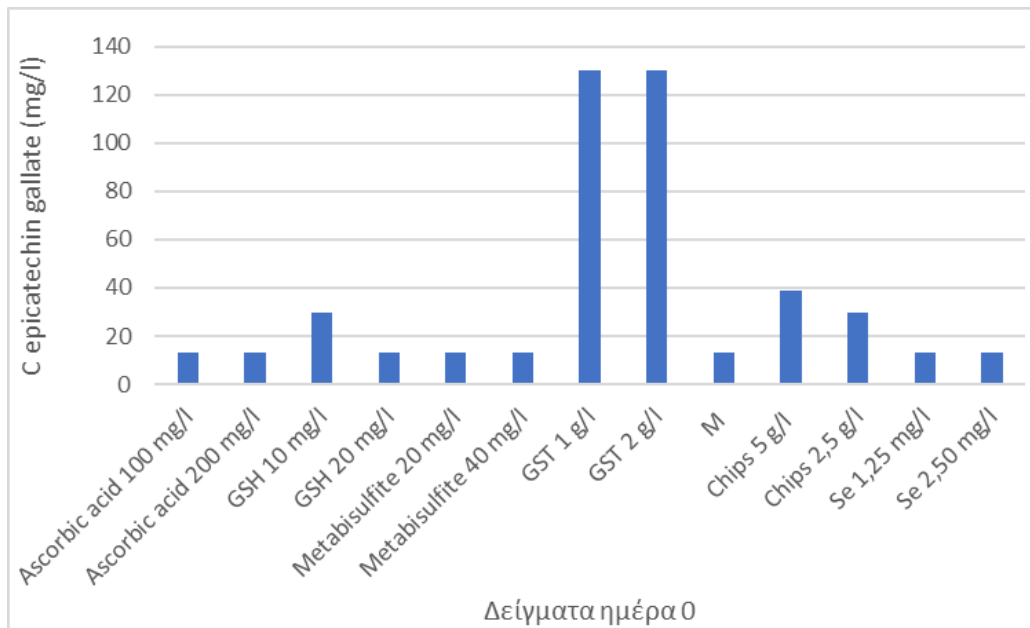
Δείγματα ημέρας 0	epicatechin gallate	catechin	procyanidin-B1	procyanidin-A2	Συνολο Φλαβονοειδών
Ascorbic acid 100 mg/l	12,98	14,224bc±0,000	18,822bcd±0,000	0,135efg±0,000	<b>59,818</b>
Ascorbic acid 200 mg/l	12,98	9,375c±0,000	18,462bcd±0,000	0,120g±0,000	<b>55,302</b>
GSH 10 mg/l	<b>29,868</b>	9,185c±0,000	21,035a±0,000	0,134efg±0,000	<b>74,558</b>
GSH 20 mg/l	12,982	9,362c±0,000	19,431b±0,000	0,139def±0,000	<b>56,176</b>
Metabisulfite 20 mg/l	12,98	9,239c±0,000	18,519bcd±0,000	0,139def±0,000	<b>55,255</b>
Metabisulfite 40 mg/l	12,98	9,431c±0,000	18,440bcd±0,000	0,135efg±0,000	<b>55,363</b>
GST 1 g/l	<b>129,803</b>	29,185bc±0,000	18,288bcd±0,000	0,228b±0,000	<b>191,429</b>
GST 2 g/l	<b>129,823</b>	79,657a±8,528	18,972bc±0,000	0,305a±0,000	<b>243,151</b>
M	12,982	8,876c±3,715	18,625bcd±0,191	0,151cde±0,000	<b>54,93</b>
Chips 5 g/l	<b>38,782</b>	2,009c±0,000	17,729d±0,715	0,131fg±0,000	<b>72,549</b>
Chips 2,5 g/l	<b>29,499</b>	2,009c±0,000	18,181cd±0,107	0,155cd±0,000	<b>64,055</b>
Se 1,25 mg/l	12,982	14,316bc±0,069	18,544bcd±0,057	0,159c±0,0018	<b>61,805</b>
Se 2,5 mg/l	12,982	14,298bc±0,018	18,501bcd±0,022	0,139def±0,0015	<b>60,237</b>



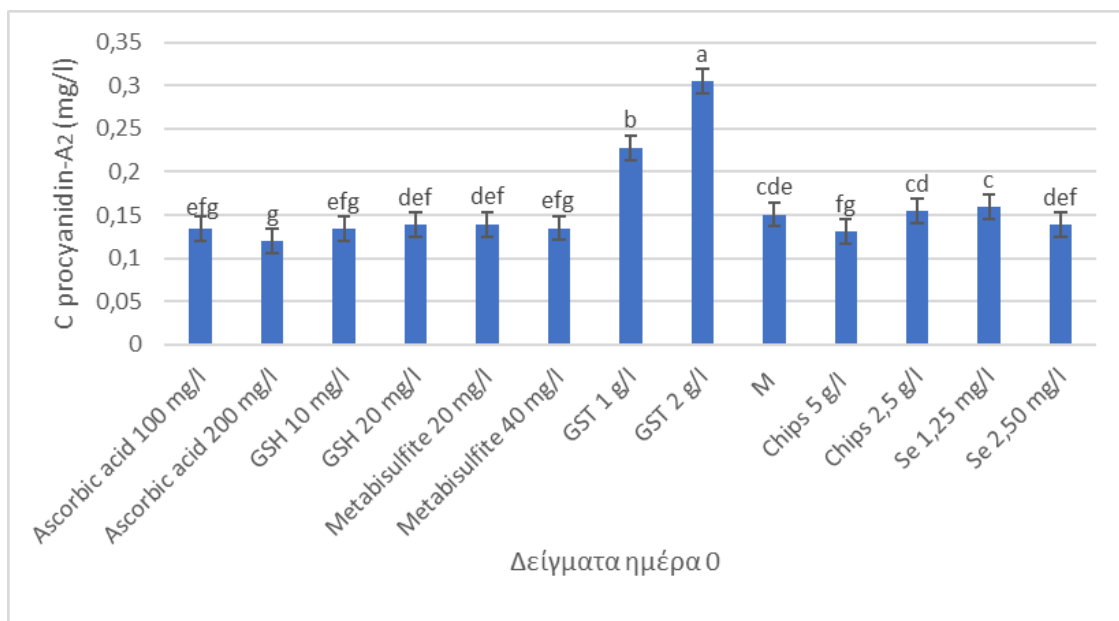
**Διάγραμμα 33:** Συγκέντρωση φλαβανολών και φλαβονολών σε κάθε ένα από τα δείγματα την ημέρα 0 του καφετιάσματος



**Διάγραμμα 34:** Συγκέντρωση catechin (mg/l) σε κάθε ένα από τα δείγματα την ημέρα 0 του καφετιάσματος

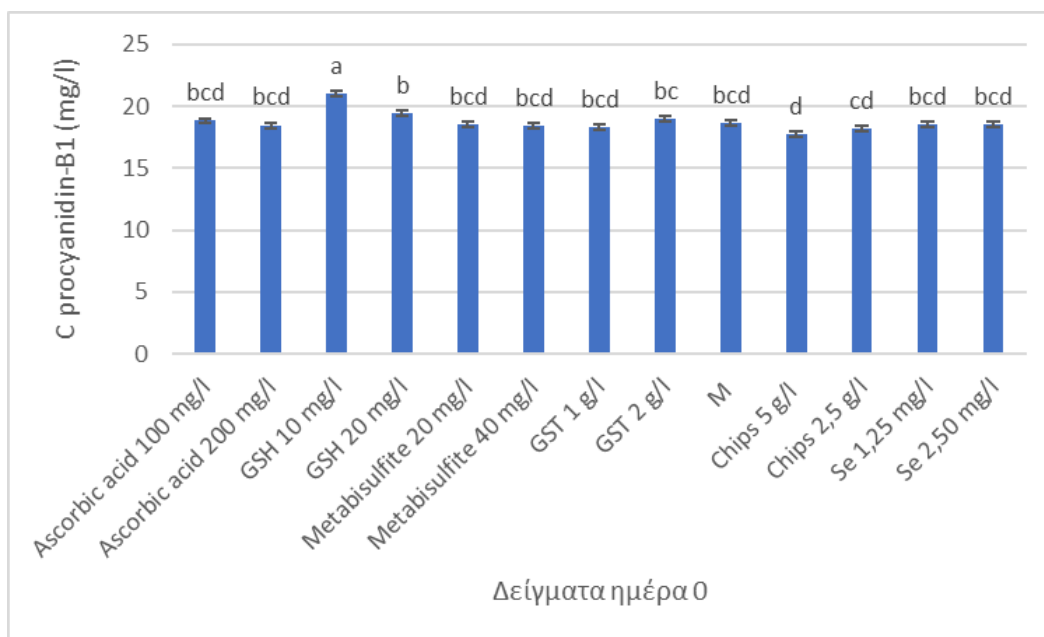


**Διάγραμμα 35:** Συγκέντρωση epicatechin gallate(mg/l) σε κάθε ένα από τα δείγματα την ημέρα 0 του καφετιάσματος



**Διάγραμμα 36:** Συγκέντρωση procyanidin-A<sub>2</sub>(mg/l) σε κάθε ένα από τα δείγματα την ημέρα 0 του καφετιάσματος





**Διάγραμμα 37:** Συγκέντρωση procyanidin-B1 (mg/l) σε κάθε ένα από τα δείγματα την ημέρα 0 του καφετιάσματος

Ξεκινώντας από τα μη φλαβονοειδή συστατικά των δειγμάτων της ημέρας 0 και συγκεκριμένα από τα βενζοϊκά οξέα (και τα παράγωγά τους), οι μέγιστες συγκεντρώσεις τους παρουσιάστηκαν στα δείγματα των δύο συγκεντρώσεων ταννινών γιγάρτων 1g/l και 2 g/l και οι αμέσως υψηλότερες μετά από αυτά παρουσίασε το δείγμα ασκορβικού οξέος 100mg/l. Από τα βενζοϊκά οξέα είχε τη μεγαλύτερη ποσότητα το γαλλικό οξύ (gallic acid) αν και σε λίγα δείγματα εντοπίστηκε. Συγκεκριμένα ανιχνεύθηκε στα δείγματα των συγκεντρώσεων των ταννινών γιγάρτων 1 g/l, 2 g/l και του ασκορβικού οξέος 100mg/l. Τα δείγματα αυτά διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 τόσο μεταξύ τους όσο και με τον μάρτυρα. Τα δείγματα περιείχαν επίσης syringic acid τα οποία δε διέφεραν στατιστικά μεταξύ τους, σε αντίθεση με το protocatechuic acid που διέφεραν τόσο με το μάρτυρα όσο και μεταξύ τους.

Αντίστοιχα, οι μέγιστες συγκεντρώσεις υδροξυκιναμωμικών οξέων την ημέρα 0 βρέθηκαν στα δείγματα των δύο συγκεντρώσεων ασκορβικού οξέος 200 mg/l και 100 mg/l και τα δείγματα που παρουσίασαν την αμέσως υψηλότερη συγκέντρωση ήταν τα δείγματα metabisulfite 20mg/l και 40mg/l. Από το σύνολο των υδροξυκιναμωμικών οξέων βρέθηκε να έχει τη μεγαλύτερη τιμή το καφταρικό οξύ (caftaric acid) στα δείγματα του ασκορβικού 200mg/l και 100 mg/l και στα δείγματα των δύο συγκεντρώσεων metabisulfite 20 mg/l και 40 mg/l ακολούθως. Τα δείγματα που διέφεραν σημαντικά με τον μάρτυρα ήταν αυτά της γλουταθειόνης 10 mg/l και ταννινών γιγάρτων 1 g/l. Τα υπόλοιπα υδροξυκιναμωμικά οξέα

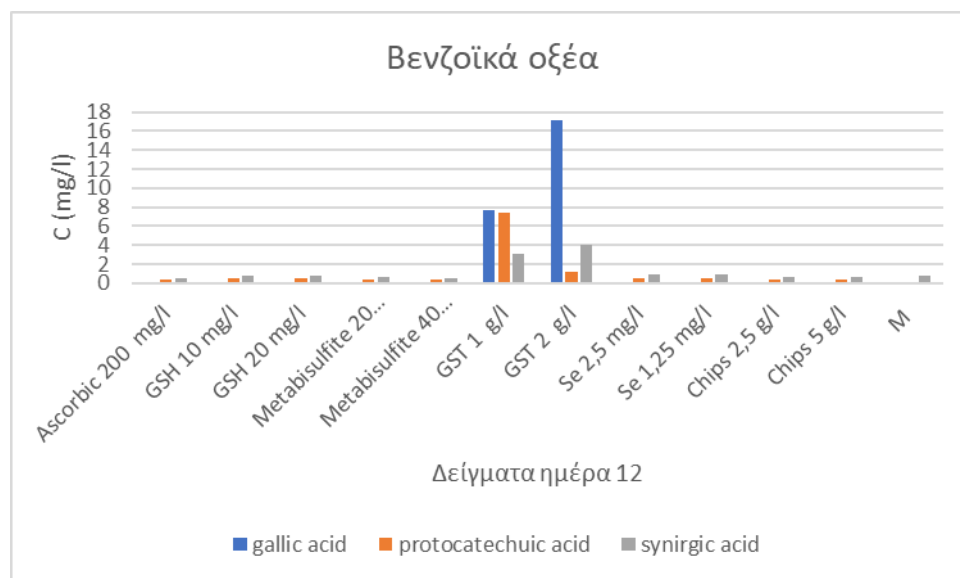
που βρέθηκαν στα δείγματα ήταν το caffeic acid, στο οποίο τα δείγματα δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, το coumaric acid και το p-coumaric acid όπου στα δύο τελευταία μόνο το δείγμα ταννινών γιγάρτων 1 g/l διέφερε σημαντικά στατιστικά με τον μάρτυρα.

Αντίστοιχα, οι πιο μικρές συγκεντρώσεις βενζοϊκών οξέων παρουσιάζονται στα δείγματα chips δρυός 5g/l και ασκορβικού οξέος 200mg/l και τις αμέσως μικρότερες τα δείγματα με chips 2,5 g/l. Τις μικρότερες συγκεντρώσεις των υδροξυκιναμωμικών οξέων τις παρουσίασαν τα δείγματα chips 5 g/l και 2,5 g/l ενώ τις αμέσως μικρότερες τα δείγματα ταννινών γιγάρτων 1g/l και 2 g/l. Από αυτά τα δείγματα μόνο το δείγμα ταννινών γιγάρτων 1 g/l διαφέρει στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 με τον μάρτυρα.

Τέλος, τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις φλαβονολών την ημέρα 0 τις έχουν τα δείγματα ταννινών γιγάρτων 1 g/l, 2 g/l και αυτά των δύο συγκεντρώσεων chips δρυός 2,5 g/l και 5 g/l ακολούθως. Από την άλλη τα δείγματα με τις μικρότερες περιεκτικότητες ολικών φλαβονολών βρέθηκαν να είναι αυτά των δειγμάτων metabisulfite 20mg/l, 40mg/l και ασκορβικού οξέος 200mg/l. Από τις φλαβανόλες τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις που βρέθηκαν στα δειγματα ήταν αυτές της epicatechin gallate και της προκυανιδίνης-B<sub>1</sub>. Σε αυτό το σημείο να αναφερθεί ότι η μεγαλύτερη συγκέντρωση του γαλλικού εστέρα της επικατεχίνης μπορεί να συσχετιστεί με την σχεδόν παντελή έλλειψη γαλλικού εστέρα και επικατεχίνης στα δείγματα. Ως προς τη συγκέντρωση της procyanidin-B<sub>1</sub> δε διέφερε κανένα στατιστικά σημαντικά με τον μάρτυρα εκτός από το δείγμα γλουταθειόνης 10 mg/l και τα δείγματα που διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ήταν τα GSH 10 mg/l και 20 mg/l και chips δρυός 5 g/l. Στην περίπτωση της procyanidin-A<sub>2</sub> τα δείγματα chips 2,5 g/l και Se 1,25 μg/l ήταν τα μόνα που δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντική διαφορά με τον μάρτυρα καθώς όλα τα υπόλοιπα διέφεραν στατιστικά με αυτόν και μεταξύ τους. Τέλος ως προς την κατεχίνη, το μόνο δείγμα που διέφερε στατιστικά σημαντικά με τα υπόλοιπα ήταν των ταννινών γιγάρτων 2 g/l.

**Πίνακας 12:** Βενζοϊκά οξέα

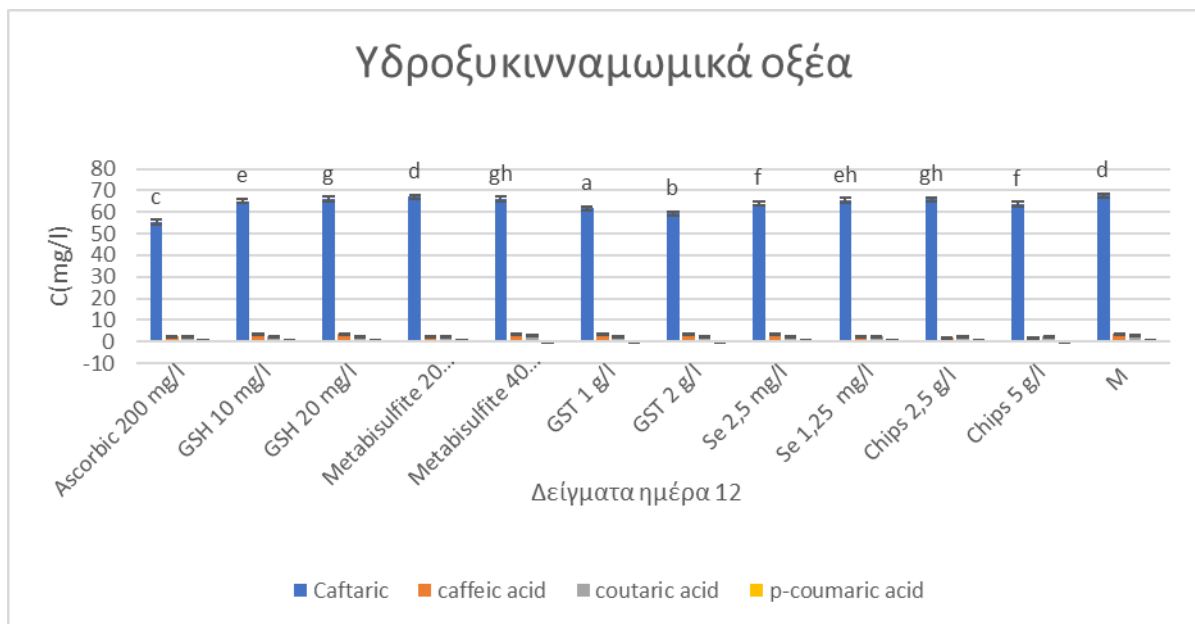
Δείγματα ημέρας 12	Galic acid	Protocatechuic acid	Synirgic acid	Σύνολο
Ascorbic 200 mg/l	0,000±0,000	0,432 <sup>ef</sup> ±0,000	0,484 <sup>f</sup> ±0,000	<b>0,916</b>
GSH 10 mg/l	0,000±0,000	0,559 <sup>d</sup> ±0,000	0,732 <sup>cdef</sup> ±0,000	<b>1,291</b>
GSH 20 mg/l	0,000±0,000	0,559 <sup>d</sup> ±0,000	0,734 <sup>cdef</sup> ±0,000	<b>1,293</b>
Metabisulfite 20mg/l	0,000±0,000	0,415 <sup>c</sup> ±0,000	0,594 <sup>ef</sup> ±0,000	<b>1,009</b>
Metabisulfite 40 mg/l	0,000±0,000	0,435 <sup>ef</sup> ±0,000	0,523 <sup>f</sup> ±0,000	<b>0,958</b>
GST 1 g/l	7,658±0,000	7,471 <sup>a</sup> ±0,000	3,125 <sup>b</sup> ±0,000	<b>18,254</b>
GST 2 g/l	17,113±0,000	1,232 <sup>b</sup> ±0,000	4,000 <sup>a</sup> ±0,000	<b>22,345</b>
Se 2,5 mg/l	0,000±0,000	0,466 <sup>f</sup> ±0,013	0,936 <sup>cd</sup> ±0,041	<b>1,402</b>
Se 1,25 mg/l	0,000±0,000	0,476 <sup>f</sup> ±0,009	0,967 <sup>c</sup> ±0,026	<b>1,443</b>
Chips 2,5 g/l	0,000±0,000	0,455 <sup>ef</sup> ±0,010	0,701 <sup>def</sup> ±0,078	<b>1,156</b>
Chips 5 g/l	0,000±0,000	0,453 <sup>ef</sup> ±0,005	0,664 <sup>ef</sup> ±0,046	<b>1,117</b>
M	0,000±0,000	0,111 <sup>c</sup> ±0,019	0,819 <sup>cde</sup> ±0,123	<b>0,93</b>



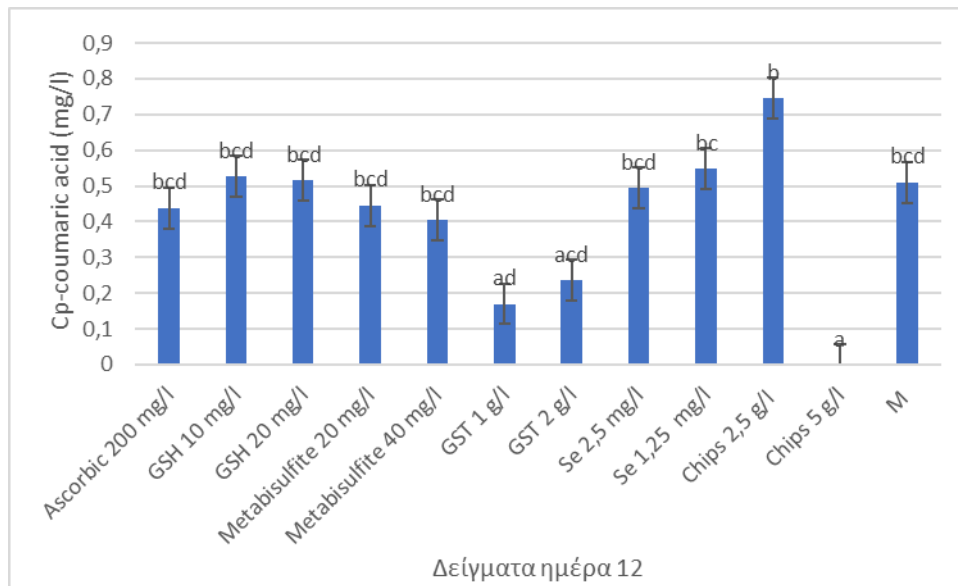
**Διάγραμμα 38:** Συγκέντρωση βενζοϊκών οξέων σε κάθε ένα από τα δείγματα την ημέρα 12 του καφετιάσματος

**Πίνακας 13:** Υδροξυκινναμωμικά οξέα

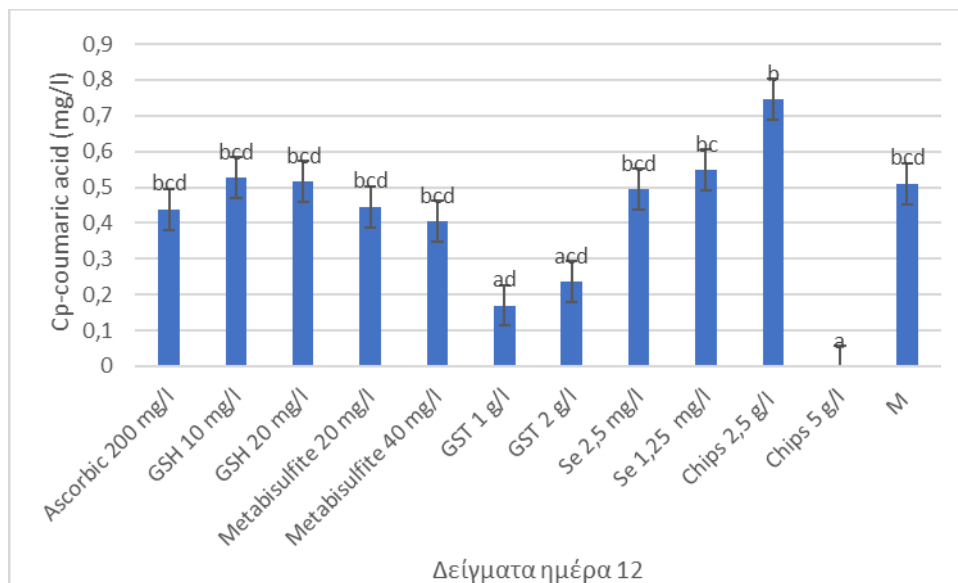
Δείγματα ημέρας 12	caftaric	caffeic acid	coutaric acid	p-coumaric acid	Σύνολο
Ascorbic 200 mg/l	55,273 <sup>a</sup> ±0,000	2,619 <sup>a</sup> ±0,000	2,355 <sup>a</sup> ±0,000	0,438 <sup>bcd</sup> ±0,217	<b>60,685</b>
GSH 10 mg/l	65,128 <sup>c</sup> ±0,000	3,606 <sup>a</sup> ±0,000	2,737 <sup>ef</sup> ±0,000	0,526 <sup>bcd</sup> ±0,000	<b>71,997</b>
GSH 20 mg/l	66,124 <sup>g</sup> ±0,000	3,631 <sup>a</sup> ±0,000	2,745 <sup>ef</sup> ±0,000	0,516 <sup>bcd</sup> ±0,000	<b>73,016</b>
Metabisulfite 20 mg/l	67,037 <sup>d</sup> ±0,000	2,039 <sup>a</sup> ±0,000	2,776 <sup>bf</sup> ±0,000	0,446 <sup>bcd</sup> ±0,000	<b>72,298</b>
Metabisulfite 40 mg/l	65,968 <sup>gh</sup> ±0,000	3,673 <sup>a</sup> ±0,000	2,825 <sup>d</sup> ±0,000	0,406 <sup>bcd</sup> ±0,000	<b>72,872</b>
GST 1g/l	61,665 <sup>a</sup> ±0,000	3,444 <sup>a</sup> ±0,000	2,808 <sup>bf</sup> ±0,000	0,169 <sup>ad</sup> ±0,000	<b>68,086</b>
GST 2g/l	59,279 <sup>b</sup> ±0,000	3,217 <sup>a</sup> ±0,000	2,757 <sup>f</sup> ±0,000	0,236 <sup>acd</sup> ±0,000	<b>65,489</b>
Se 2,5 mg/l	63,9681 <sup>f</sup> ±0,331	3,619 <sup>a</sup> ±0,013	2,652 <sup>c</sup> ±0,013	0,494 <sup>bcd</sup> ±0,006	<b>70,7331</b>
Se 1,25 mg/l	65,473 <sup>eh</sup> ±0,149	2,039 <sup>a</sup> ±0,000	2,716 <sup>e</sup> ±0,017	0,547 <sup>bc</sup> ±0,027	<b>70,775</b>
Chips 2,5 g/l	65,789 <sup>gh</sup> ±0,134	1,8778 <sup>a</sup> ±1,674	2,743 <sup>ef</sup> ±0,008	0,747 <sup>b</sup> ±0,016	<b>71,1568</b>
Chips 5 g/l	63,796 <sup>f</sup> ±0,049	1,874 <sup>a</sup> ±1,669	2,658 <sup>c</sup> ±0,003	0,000 <sup>a</sup> ±0,000	<b>68,328</b>
<b>M</b>	<b>67,573<sup>d</sup>±0,041</b>	<b>3,725<sup>a</sup>±0,044</b>	<b>2,817<sup>d</sup>±0,009</b>	<b>0,510<sup>bcd</sup>±0,015</b>	<b>74,625</b>



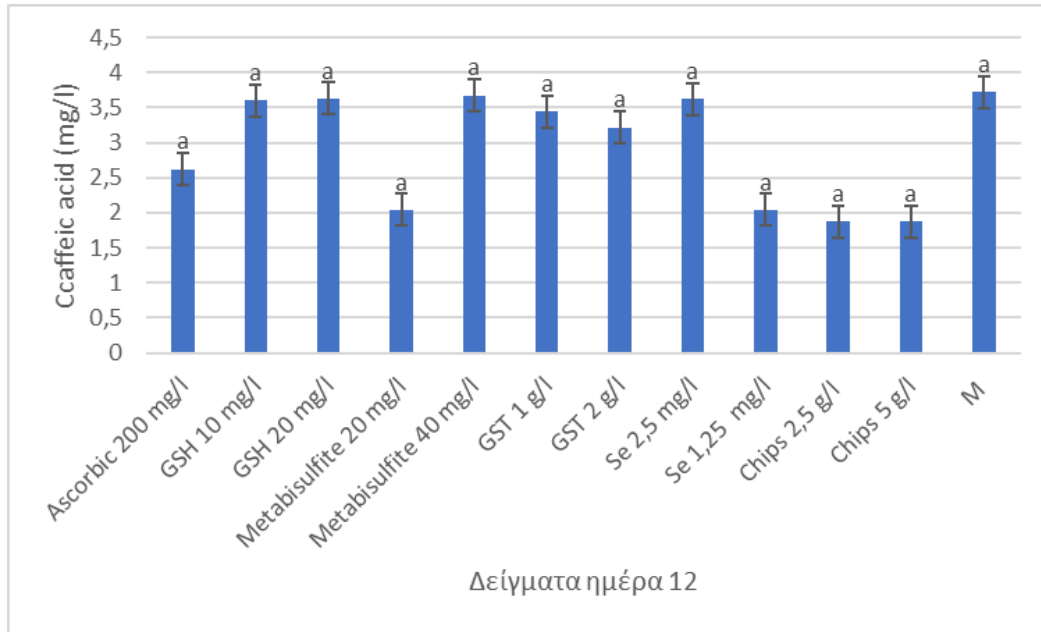
**Διάγραμμα 39:** Συγκέντρωση υδροξυκινναμωμικών οξέων σε κάθε ένα από τα δείγματα την ημέρα 12 του καφετιάσματος



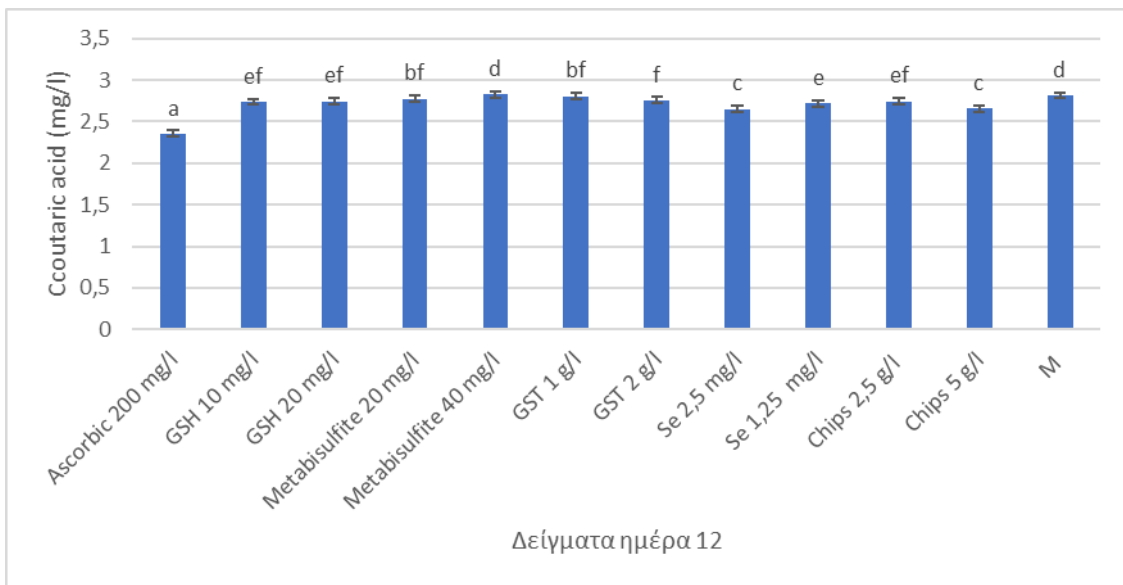
**Διάγραμμα 40:** Συγκέντρωση p-coumaric acid (mg/l) σε κάθε ένα από τα δείγματα την ημέρα 12 του καφετιάσματος



**Διάγραμμα 41:** Συγκέντρωση caftaric acid (mg/l) σε κάθε ένα από τα δείγματα την ημέρα 12 του καφετιάσματος



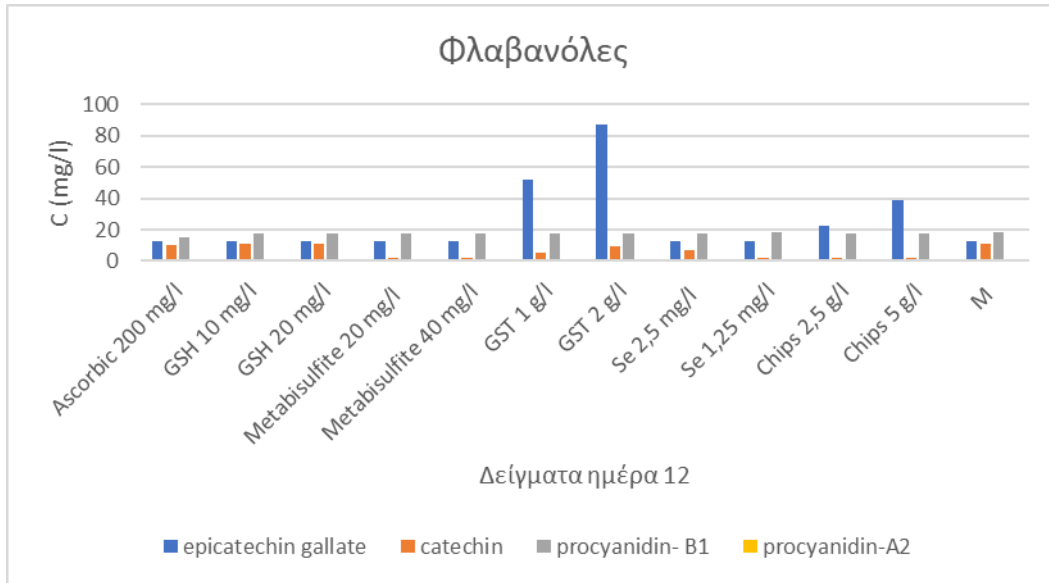
**Διάγραμμα 42:** Συγκέντρωση caffeic acid (mg/l) σε κάθε ένα από τα δείγματα την ημέρα 12 του καφετιάσματος



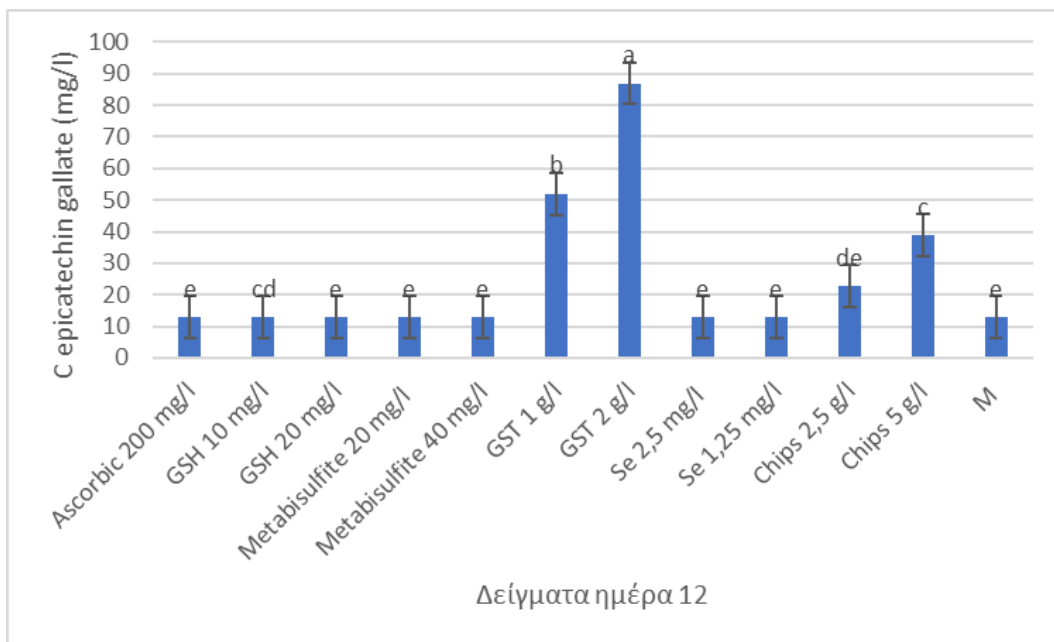
**Διάγραμμα 43:** Συγκέντρωση coumaric acid (mg/l) σε κάθε ένα από τα δείγματα την ημέρα 12 του καφετιάσματος

Πίνακας 14: Φλαβανόλες και Φλαβονόλες

Δείγματα ημέρας 12	epicatechin gallate	catechin	procyanidin- B1	procyanidin-A2	Σύνολο
Ascorbic 200 mg/l	12,982 <sup>e</sup> ±0,000	10,196 <sup>a</sup> ±0,000	14,907 <sup>a</sup> ±0,000	0,058 <sup>b</sup> ±0,000	<b>51,64</b>
GSH 10 mg/l	12,982 <sup>e</sup> ±0,000	11,251 <sup>a</sup> ±0,000	17,462 <sup>d</sup> ±0,000	0,156 <sup>f</sup> ±0,000	<b>55,924</b>
GSH 20 mg/l	12,982 <sup>e</sup> ±0,000	11,081 <sup>a</sup> ±0,000	17,651 <sup>cd</sup> ±0,000	0,174 <sup>de</sup> ±0,000	<b>56,006</b>
Metabisulfite 20 mg/l	12,982 <sup>e</sup> ±0,000	2,009 <sup>b</sup> ±0,000	17,726 <sup>bcd</sup> ±0,00	0,000 <sup>b</sup> ±0,000	<b>46,848</b>
Metabisulfite 40 mg/l	12,982 <sup>e</sup> ±0,000	2,009 <sup>b</sup> ±0,000	17,518 <sup>d</sup> ±0,000	0,164 <sup>bc</sup> ±0,000	<b>46,639</b>
GST 1 g/l	<b>52,019<sup>b</sup>±0,000</b>	4,898 <sup>ab</sup> ±0,000	17,878 <sup>bcd</sup> ±0,00	0,157 <sup>ef</sup> ±0,000	<b>88,771</b>
GST 2 g/l	<b>86,985<sup>a</sup>±0,000</b>	9,636 <sup>ab</sup> ±0,000	17,471 <sup>d</sup> ±0,000	0,175 <sup>d</sup> ±0,000	<b>128,106</b>
Se 1,25 mg/l	12,982 <sup>e</sup> ±0,000	6,699 <sup>ab</sup> ±4,689	17,509 <sup>d</sup> ±0,120	0,165 <sup>def</sup> ±0,002	<b>51,421</b>
Se 2,5 mg/l	12,982 <sup>e</sup> ±0,000	2,009 <sup>b</sup> ±0,000	18,001 <sup>bc</sup> ±0,23	0,000 <sup>c</sup> ±0,000	<b>47,032</b>
Chips 2,5 g/l	<b>22,791<sup>de</sup>±2,187</b>	2,009 <sup>b</sup> ±0,000	17,590 <sup>cd</sup> ±0,00	0,150 <sup>f</sup> ±0,000	<b>55,963</b>
Chips 5 g/l	<b>38,776<sup>c</sup>±6,099</b>	2,009 <sup>b</sup> ±0,000	17,590 <sup>cd</sup> ±0,00	0,151 <sup>f</sup> ±0,000	<b>72,202</b>
M	12,982 <sup>e</sup> ±0,000	10,856 <sup>a</sup> ±1,474	18,152 <sup>b</sup> ±0,032	0,195 <sup>a</sup> ±0,010	<b>55,963</b>

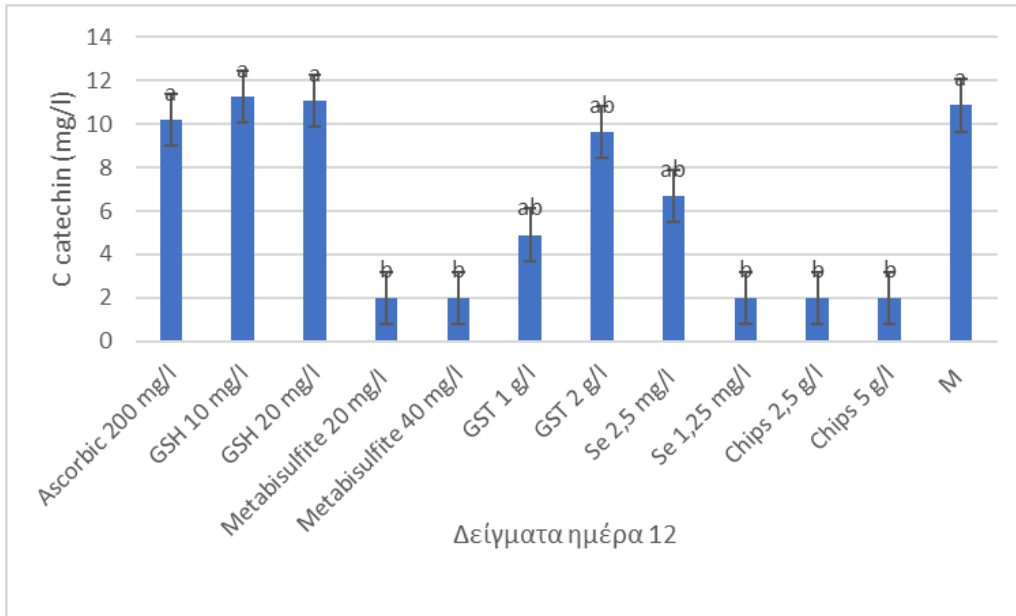


**Διάγραμμα 45:** Συγκέντρωση φλαβανολών και φλαβονολών σε κάθε ένα από τα δείγματα την ημέρα 12 του καφετιάσματος

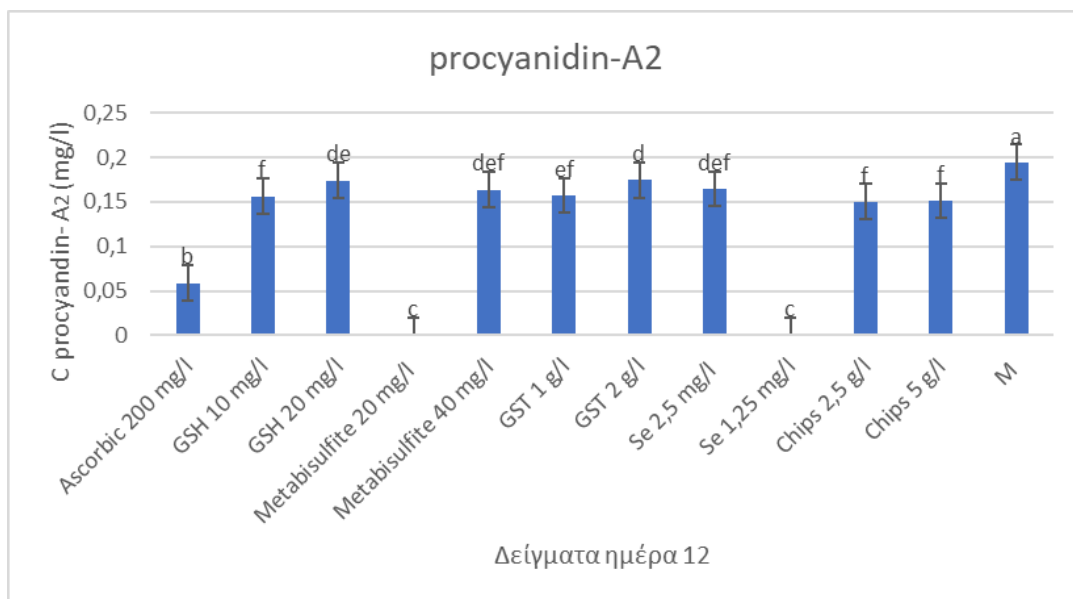


**Διάγραμμα 46:** Συγκέντρωση epicatechin gallate (mg/l) σε κάθε ένα από τα δείγματα την ημέρα 12 του καφετιάσματος

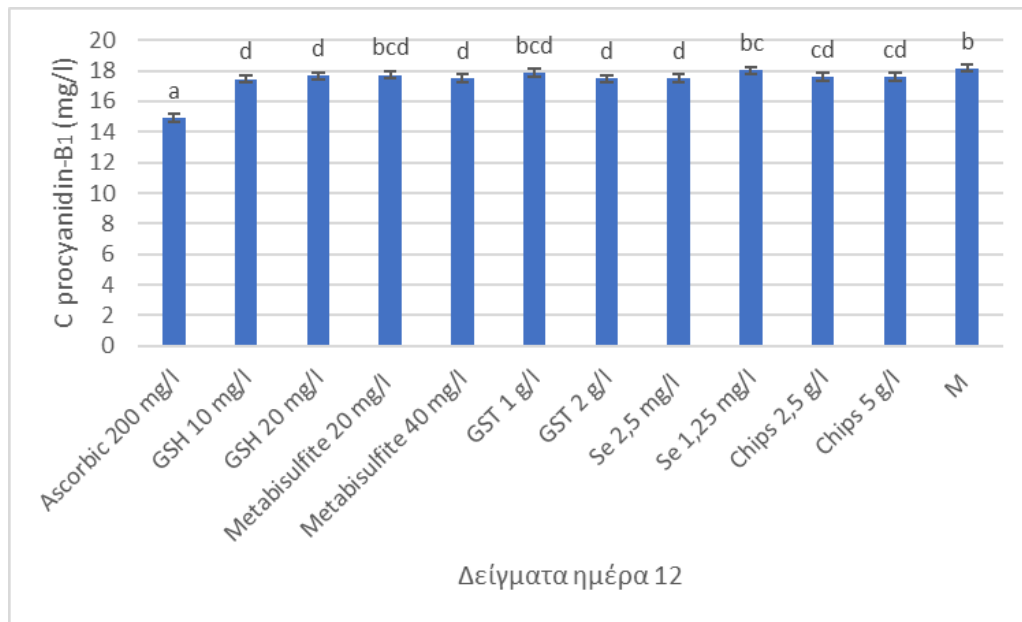




**Διάγραμμα 47:** Συγκέντρωση catechin (mg/l) σε κάθε ένα από τα δείγματα την ημέρα 12 του καφετιάσματος



**Διάγραμμα 48:** Συγκέντρωση procyanidin- A2 (mg/l) σε κάθε ένα από τα δείγματα την ημέρα 12 του καφετιάσματος



**Διάγραμμα 49:** Συγκέντρωση procyanidin- B1 (mg/l) σε κάθε ένα από τα δείγματα την ημέρα 12 του καφετιάσματος

Στα αποτελέσματα από την ανάλυση της χρωματογραφίας υψηλής πίεσης για την ημέρα 12 βρέθηκε ότι τα υψηλότερα επίπεδα βενζοϊκών οξέων είχαν τα δείγματα των δύο συγκεντρώσεων ταννινών γιγάρτων 1g/l και 2 g/l, ενώ τα δείγματα των δύο συγκεντρώσεων σεληνίου 1,25 mg/l και 2,5 mg/l ακολουθούν. Απο όλα τα δείγματα τα μόνα στα οποία εντοπίστηκε γαλλικό οξύ (gallic acid) ήταν τα δείγματα των δύο συγκεντρώσεων ταννινών γιγάρτων. Η μικρότερη συγκέντρωση βρέθηκε να είναι του δείγματος ασκορβικού οξέος 200mg/l. Ως προς τα υπόλοιπα βενζοϊκά οξέα δηλαδή το syringic acid και protocatechuic acid, παρουσίασαν χαμηλές τιμές και στατιστικές διαφορές μεταξύ τους.

Απο το σύνολο των υδροξυκιναμωμικών οξέων οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις βρέθηκαν να είναι αυτές των δειγμάτων γλουταθειόνης (GSH) 10mg/l και 20mg/l με τα δείγματα των δύο συγκεντρώσεων metabisulfite 20mg/l και 40mg/l να ακολουθούν. Το καφταρικό οξύ βρέθηκε να έχει τη μεγαλύτερη τιμή από το σύνολο των υδροξυκιναμωμικών οξέων κι αυτό εντοπίστηκε να έχει μεγαλύτερη τιμή στα δείγματα metabisulfite 20mg/l και 40 mg/l, όπου από αυτά μόνο το δεύτερο διέφερε σημαντικά από τον μάρτυρα. Αντίστοιχα οι μικρότερες τιμές υδροξυκιναμωμικών οξέων υπήρχαν στο ασκορβικό οξύ 200 mg/l. Ως προς τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων τους βρέθηκε ότι ως προς το caftaric acid όλα τα δείγματα διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους και με τον μάρτυρα εκτός από το δείγμα metabisulfite 20mg/l. Στην περίπτωση του caffeic acid δε σημειώθηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά ενώ ως προς το coutaric acid τα δείγματα εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους και με τον μάρτυρα εκτός του metabisulfite 40

mg/l. Να σημειωθεί ότι το δείγμα του ασκορβικού οξέος 200 mg/l διέφερε στατιστικά σημαντικά με όλα τα υπόλοιπα δείγματα σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05. Ως προς το p-coumaric acid τα μόνα δείγματα που εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές με τα υπόλοιπα ήταν τα δείγματα ταννινών γιγάρτων 1g/l, 2g/l και chips 5 g/l.

Τέλος, οι φλαβανόλες τη μέρα 12 βρέθηκαν να είναι περισσότερες στα δείγματα των δύο συγκεντρώσεων ταννινών γιγάρτων 1g/l και 2g/l και chips δρυός 2,5 g/l και 5g/l ακολούθως σε γαλλικό εστέρα της επικατεχίνης και κατεχίνη. Αντίθετά, οι μικρότερες τιμές φλαβονολών ήταν στα δείγματα metabisulfite 20mg/l, 40 mg/l και σεληνίου 1,25 mg/l και 2,50 mg/l ακολούθως. Να τονιστεί ότι τα δείγματα που παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά με όλα τα υπόλοιπα στην περίπτωση του γαλλικού εστέρα της επικατεχίνης (epicatechin gallate) που είχε τη μεγαλύτερη συγκέντρωση στα δείγματα ήταν αυτό που περιείχε ταννίνες γιγάρτων συγκέντρωσης 1 και 2 g/l και τα δείγματα chips δρυός 5 g/l, γλουταθειόνης 10 mg/l όπου τα δύο τελευταία δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους. Όπως αναφέρθηκε και στην ημέρα 0 η μεγάλη περιεκτικότητα σε γαλλικό εστέρα της επικατεχίνης μπορεί να εξηγηθεί με την απουσία του γαλλικού οξέος και της επικατεχίνης, παρόλο που απαιτείται περαιτέρω έρευνα (Gómez,et.al., 2011). Τα υπόλοιπα δηλαδή κατεχίνη (catechin), προκυανιδίνη-A<sub>2</sub> (procyanidin -A<sub>2</sub>) και προκυανιδίνη- B<sub>1</sub> παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές τόσο μεταξύ τους όσο και με τον μάρτυρα. Συγκεκριμένα, ως προς την procyanidin-B<sub>1</sub>, που έχει τη δεύτερη μεγαλύτερη συγκέντρωση, τα δείγματα ασκορβικού οξέος 200 mg/l διέφερε στατιστικά σημαντικά με τα υπόλοιπα. Ως προς την catechin τα δείγματα metabisulfite 20mg/l και 40 mg/l, chips δρυός 2,5g/l και 5 g/l, Se 1,25 mg/l διέφεραν στατιστικά σημαντικά με τα δείγματα ασκορβικού οξέος 200 mg/l, γλουταθειόνης 10mg/l και 20 mg/l ενώ στην procyanidin-A<sub>2</sub> τα δείγματα διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους.

## 9) Συμπεράσματα

Στο πείραμα αυτό υποβλήθηκαν όλα τα δείγματα οίνου της ποικιλίας σταφυλιών Ρομπόλα σε θερμοκρασία 55°C και προστέθηκαν οι εξής αντιοξειδωτικές ουσίες σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις: το μεταδιθειώδες κάλιο (sodium metabisulfite) 20 mg/l και 40 mg/l, το ασκορβικό οξύ 100 mg/l και 200mg/l, η γλουταθειόνη 10 mg/l και 20mg/l, τα chips δρυός 2,5 g/l και 5g/l, οι ταννίνες γιγάρτων 1g/l και 2g/l και το σελήνιο 1,25mg/l και 2,5mg/l. Η σταθερή υψηλή θερμοκρασία στην οποία υποβλήθηκαν, επιτάχυνε την πραγματοποίηση των οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων και υποβοήθησε το καφέτισμα.

Αρχικά, τη μεγαλύτερη τιμή της απορρόφησης στα 420 nm κατά τη διάρκεια του πειράματος της επιταχυνόμενης οξείδωσης στους 55°C εμφάνισαν τα δείγματα ταννινών γιγάρτων 1g/l και 2g/l και τα δείγματα των δύο συγκεντρώσεων ασκορβικού οξέος 100mg/l και 200mg/l. Μάλιστα τα δείγματα του ασκορβικού οξέος λόγω της οξείδωσής τους συμβάλλουν στην παραγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Τα ίδια δείγματα εμφάνισαν εξίσου τις υψηλότερες τιμές του ρυθμού μεταβολής χρώματος K και δείκτη καφετιάσματος ΔΑ%. Αυτή η παρατήρηση συνδέεται άμεσα με τις χαμηλότερες τιμές ελεύθερου και ολικού θειώδη ανυδρίτη κατά την τελευταία μέρα του καφετιάσματος (ημέρα 12) εκτός από τη συγκέντρωση του δείγματος των ταννινών γιγάρτων 2 g/l που εμφανίζει τη μέγιστη συγκέντρωση ελεύθερου θειώδη ανυδρίτη. Παρατηρείται δηλαδή ότι η αύξηση της απορρόφησης στα 420 nm, του K και του ΔΑ% άρα και ο σχηματισμός καφετιάσματος συμβάλλει στην εντονότερη ελάττωση των επιπέδων ελεύθερου και ολικού θειώδη ανυδρίτη μη προστατεύοντας πλέον τον οίνο από τις οξειδώσεις. Επιβεβαιώνεται λοιπόν ότι αυτά τα δείγματα υπέστη την εντονότερη επιτάχυνση των οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων. Από την άλλη παρατηρήθηκε ότι τα δείγματα που παρουσίασαν τη χαμηλότερη απορρόφηση στα 420 nm ,δείκτη καφετιάσματος ΔΑ% και ρυθμού μεταβολής χρώματος K, δηλαδή τα δείγματα των δύο συγκεντρώσεων μεταδιθειώδους καλίου (sodium metabisulfite) ή metabisulfite 20 mg/l και 40mg/l και σεληνίου 1,25mg/l και 2,50 mg/l, ενώ είχαν τις υψηλότερες τιμές συγκέντρωσης ελεύθερου κι ολικού θειώδους ανυδρίτη. Ανεξαρτήτως όμως από τις διακυμάνσεις των επιπέδων θειώδους ανυδρίτη (ελεύθερου ή ολικού), τελικά η συγκέντρωσή τους μειώθηκε σε όλα τα δείγματα και η απορρόφηση στα 420 nm αυξήθηκε αντίστοιχα, στις συνθήκες της επιταχυνόμενης οξείδωσης.

Επίσης, τα δείγματα των δύο συγκεντρώσεων ταννινών γιγάρτων 1g/l και 2 g/l παρουσίασαν μέγιστες συγκεντρώσεις ολικών φαινολικών ενώσεων και φλαβονολών, κάτι που είναι πιθανό να έχει άμεση συσχέτιση με την αμαύρωση του οίνου. Η μείωση των φλαβαν-3-ολών

(συμμετέχουν σε αντιδράσεις πολυμερισμού) συσχετίζεται με την άνοδο της τιμής του δείκτη καφετιάσματος κι άρα το οξειδωτικό καφέτιασμα στο κρασί. Οι φλαβαν-3-όλες που ταυτοποιήθηκαν στον οίνο με τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις την ημέρα 0 και 12 μέσω HPLC ήταν ο γαλλικός εστέρας επικατεχίνης και από τις φλαβονόλες η προκυανιδίνη- B<sub>1</sub> με μεγαλύτερη τη συγκέντρωση του γαλλικού εστέρα της επικατεχίνης στα δείγματα με ταννίνες γιγάρτων 1 g/l και 2 g/l. Αποδεικνύεται λοιπόν ότι η παρουσία των δειγμάτων των δύο συγκεντρώσεων ταννινών γιγάρτων επηρέασαν θετικά την οξείδωση και την ελάττωση των φλαβανολών, στις μέγιστες συγκεντρώσεις από τα υπόλοιπα δείγματα. Συνέβαλαν δηλαδή την αντίδραση πολυμερισμού των ενώσεων των ο-κινονών (πολυμερή καφέ χρωματισμού). Η παρουσία των προκυανιδινών-B<sub>1</sub> φαίνεται να επηρέασε θετικά το οξειδωτικό καφέτιασμα (μείωση τιμών) όμως χρήζει εκτενέστερου ελέγχου.

Συνεχίζοντας, η συγκέντρωση των υδροξυκινναμωμικών οξέων που ταυτοποιήθηκαν σε όλα τα δείγματα την ημέρα 0 και 12 εμφάνισε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων εκτός από το καφεϊκό οξύ. Φαίνεται λοιπόν η πιθανή σύνδεση με το καφέτιασμα κατά το διάστημα του πειράματος της επιταχυνόμενης οξείδωσης. Τα υδροξυκινναμωμικά οξέα που ταυτοποιήθηκαν σε όλα τα δείγματα τις δυο αυτές ημέρες μέσω HPLC ήταν το καφταρικό οξύ, το κουταρικό οξύ, το καφεϊκό οξύ και το π - κουμαρικό οξύ.

Τη μικρότερη τιμή της αντιοξειδωτικής ικανότητας την ημέρα 12 διέθεταν τα δείγματα με τις προσθήκες των δύο συγκεντρώσεων ασκορβικού οξέος. Η προσθήκη των δύο συγκεντρώσεων της γλουταθειόνης 10mg/l και 20 mg/l δεν επηρέασε την αντιοξειδωτική ικανότητα των δειγμάτων. Επομένως η ελάττωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας κατά τη διάρκεια του πειράματος της επιταχυνόμενης οξείδωσης συνδέεται με την αύξηση της απορρόφησης στα 420 nm και τις τιμές του ρυθμού μεταβολής χρώματος k. Όπως φάνηκε πιο πάνω, αντίστοιχα η θερμοκρασία των 55°C συνέβαλε όχι μόνο στην επιτάχυνση των οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων αλλά και τη μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε όλα τα δείγματα. Να σημειωθεί ότι μόνο το δείγμα της γλουταθειόνης 10mg/l και 20 mg/l δεν επέδρασε θετικά στο σχηματισμό καφέ χρώματος στις συνθήκες της επιταχυνόμενης οξείδωσης.

Βάσει όλων των συμπερασμάτων που διατυπώθηκαν, το δημιουργούμενο καφέτιασμα στους λευκούς οίνους αποτελεί συνισταμένη πολλών παραγόντων. Παράγοντες όπως η αύξηση της θερμοκρασίας στους 55°C, ο υψηλός δείκτης καφετιάσματος, ο ρυθμός μεταβολής του χρώματος, η αυξανόμενη απορρόφηση στα 420 nm και η μείωση των τιμών του ελεύθερου και ολικού θειώδους ανυδρίτη, των ολικών φαινολικών ουσιών, της αντιοξειδωτικής ικανότητας και των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν με ανάλυση HPLC. Δηλαδή των

υδροξυκινναμωμικών οξέων, των βενζοϊκών οξέων ενώ οι φλαβανόλες παρέμειναν σχεδόν αμετάβλητες εκτός από την κατεχίνη και τον γαλλικό εστέρα της επικατεχίνης που μειώθηκαν. Να σημειωθεί ότι γενικά τα δείγματα του κρασιού από Ρομπόλα παρουσίασαν χαμηλές τιμές αντιοξειδωτικής ικανότητας και ολικών φαινολικών γι' αυτό το λόγο δεν ήταν ευκρινής η πτώση των τιμών.

## 10) Βιβλιογραφία

### Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

- Alañón, M. E., Castro-Vázquez, L., Díaz-Maroto, M. C., Gordon, M. H., & Pérez-Coello, M. S. (2011). A study of the antioxidant capacity of oak wood used in wine ageing and the correlation with polyphenol composition. *Food Chemistry*, 128(4), 997–1002. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.005>
- Amarowicz, R., & Janiak, M. (2018). Hydrolysable tannins. In *Encyclopedia of Food Chemistry* (pp. 337–343). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21771-X>
- Askar, A. and Treptow, H., Biogene Amine in Lebensmitteln — Vorkommen, Bedeutung und Bestimmung, *J. Molecular Nutrition and Food Research*, 32, 4, 420, (1988).
- Ball, D. W. (2006). Concentration Scales for Sugar Solutions. *Journal of Chemical Education*, 83(10), 1489. <https://doi.org/10.1021/ed083p1489>
- Barbulescu, I. D. B. N., & F. M. (2011). *The importance of selenium from powder of skins and seeds of italian grapes and wine, resulting from the vinification processes. Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*. 17(3), 218–224.
- Barril, C., Clark, A. C., & Scollary, G. R. (2012). Chemistry of ascorbic acid and sulfur dioxide as an antioxidant system relevant to white wine. *Analytica Chimica Acta*, 732, 186–193. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.11.011>
- Bayly, F. C., & Berg, H. W. (1967). Grape and Wine Proteins of White Wine Varietals. *American Journal of Enology and Viticulture*, 18(1), 18–32. <https://www.ajevonline.org/content/18/1/18>
- Binati, R. L., Lemos Junior, W. J. F., & Torriani, S. (2021). Contribution of non- *Saccharomyces* yeasts to increase glutathione concentration in wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 27(3), 290–294. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12473>
- Bloem, A., Bertrand, A., Lonvaud-Funel, A., & de Revel, G. (2006). Vanillin production from simple phenols by wine-associated lactic acid bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 44(1), 62–67. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.02037.x>
- Boulton, R. B., Singleton, V. L., Bisson, L. F., & Kunkee, R. E. (1999). *Principles and Practices of Winemaking*. Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-4757-6255-6>
- Burk, R. F. (2002). *Selenium, an antioxidant nutrient. Nutrition in clinical Care*. 5(2), 75–79.
- Câmara, A. de A., Maréchal, P.-A., Tourdot-Maréchal, R., & Husson, F. (2019). Dehydration stress responses of yeasts *Torulaspora delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima* and *Lachancea thermotolerans*: Effects of glutathione and trehalose biosynthesis. *Food Microbiology*, 79, 137–146. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.12.008>
- Capece, A., Pietrafesa, R., Siesto, G., & Romano, P. (2020). Biotechnological Approach Based on Selected *Saccharomyces cerevisiae* Starters for Reducing the Use of Sulfur Dioxide in Wine. *Microorganisms*, 8(5), 738. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050738>
- Carrascosa, A. v., Muñoz, R., & González, R. (2011). *Molecular Wine Microbiology*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-01909-6>
- Castaldo, Narváez, Izzo, Graziani, Gaspari, Minno, & Ritieni. (2019). Red Wine Consumption and Cardiovascular Health. *Molecules*, 24(19), 3626. <https://doi.org/10.3390/molecules24193626>
- Chidi, B. S., Bauer, F. F., & Rossouw, D. (2018). Organic Acid Metabolism and the Impact of Fermentation Practices on Wine Acidity: A Review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 39(2). <https://doi.org/10.21548/39-2-3172>

- Chira, K., Jourdes, M., & Teissedre, P.-L. (2012). Cabernet sauvignon red wine astringency quality control by tannin characterization and polymerization during storage. *European Food Research and Technology*, 234(2), 253–261. <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1627-1>
- Chira, K., & Teissedre, P.-L. (2013). Extraction of oak volatiles and ellagitannins compounds and sensory profile of wine aged with French winewoods subjected to different toasting methods: Behaviour during storage. *Food Chemistry*, 140(1–2), 168–177. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.02.049>
- Cos, P., Bruyne, T., Hermans, N., Apers, S., Berghe, D., & Vlietinck, A. (2004). Proanthocyanidins in Health Care: Current and New Trends. *Current Medicinal Chemistry*, 11(10), 1345–1359. <https://doi.org/10.2174/0929867043365288>
- Dennis, E. G., Keyzers, R. A., Kalua, C. M., Maffei, S. M., Nicholson, E. L., & Boss, P. K. (2012). Grape Contribution to Wine Aroma: Production of Hexyl Acetate, Octyl Acetate, and Benzyl Acetate during Yeast Fermentation Is Dependent upon Precursors in the Must. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(10), 2638–2646. <https://doi.org/10.1021/jf2042517>
- du Toit, W. J., Marais, J., Pretorius, I. S., & du Toit, M. (2017). Oxygen in Must and Wine: A review. *South African Journal of Enology & Viticulture*, 27(1). <https://doi.org/10.21548/27-1-1610>
- Duan, W.-P., Zhu, B.-Q., Song, R.-R., Zhang, B., Lan, Y.-B., Zhu, X., Duan, C.-Q., & Han, S.-Y. (2018). Volatile composition and aromatic attributes of wine made with *Vitisvinifera L .cv* Cabernet Sauvignon grapes in the Xinjiang region of China: effect of different commercial yeasts. *International Journal of Food Properties*, 21(1), 1423–1441. <https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1479860>
- Ehrlich, F. (1904). Ueber das natürliche Isomere des Leucins. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 37(2), 1809–1840. <https://doi.org/10.1002/cber.19040370295>
- el Hosry, L., Auezova, L., Sakr, A., & Hajj-Moussa, E. (2009). Browning susceptibility of white wine and antioxidant effect of glutathione. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(12), 2459–2463. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.02036.x>
- Evers, M. S., Roullier- Gall, C., Morge, C., Sparrow, C., Gobert, A., & Alexandre, H. (2021). Vitamins in wine: Which, what for, and how much? *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(3), 2991–3035. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12743>
- Fan, W., Xu, Y., & Yu, A. (2006). Influence of Oak Chips Geographical Origin, Toast Level, Dosage and Aging Time on Volatile Compounds of Apple Cider. *Journal of the Institute of Brewing*, 112(3), 255–263. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2006.tb00721.x>
- Ferreira, I., & Guido, L. (2018). Impact of Wort Amino Acids on Beer Flavour: A Review. *Fermentation*, 4(2), 23. <https://doi.org/10.3390/fermentation4020023>
- Ferreira, R. B., Piçarra-Pereira, M. A., Monteiro, S., Loureiro, V. B., & Teixeira, A. R. (2001). The wine proteins. *Trends in Food Science & Technology*, 12(7), 230–239. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(01\)00080-2](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00080-2)
- Flores-Mateo, G., Navas-Acien, A., Pastor-Barriuso, R., & Guallar, E. (2006). Selenium and coronary heart disease: a meta-analysis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 84(4), 762–773. <https://doi.org/10.1093/ajcn/84.4.762>
- Fontanella, M. C., D'Amato, R., Regni, L., Proietti, P., Beone, G. M., & Businelli, D. (2017). Selenium speciation profiles in biofortified sangiovese wine. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 43, 87–92. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2016.11.015>
- Gabrielli, M., Aleixandre-Tudo, J. L., Kilmartin, P. A., Siczkowski, N., & du Toit, W. J. (2017). Additions of Glutathione or Specific Glutathione-rich Dry inactivated Yeast Preparation (DYP) to Sauvignon blanc Must: Effect on Wine Chemical and Sensory Composition. *South African Journal of Enology & Viticulture*, 38(2). <https://doi.org/10.21548/38-1-794>
- Gammon, S. D., & Ebbing, D. D. (1999). *General Chemistry* (6th ed.). Houghton Mifflin Company.



- Garcia-Muñoz, C., & Vaillant, F. (2014). Metabolic Fate of Ellagitannins: Implications for Health, and Research Perspectives for Innovative Functional Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(12), 1584–1598. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.644643>
- Garde-Cerdán, T., & Ancín-Azpilicueta, C. (2006). Review of quality factors on wine ageing in oak barrels. *Trends in Food Science & Technology*, 17(8), 438–447. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.01.008>
- Garrido, J., & Borges, F. (2011). Wine and grape polyphenols—A chemical perspective. *Food Research International*, 44(10), 3134–3148. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.08.010>
- Gayon, P. R., Dubourdieu, D., Doneche, B., & Lonvaud, A. (2006). *Handbook of Enology: The Microbiology of Wine and Vinifications* (2nd ed.).
- Guo, Y.-Y., Yang, Y.-P., Peng, Q., & Han, Y. (2015). Biogenic amines in wine: a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 50(7), 1523–1532. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12833>
- Gómez-Plaza, E., & Cano-López, M. (2011). *Wine Science: Principles and Applications* (3rd ed.). Academic Press.
- Gutierrez Afonso, V. L. (2002). Sensory Descriptive Analysis Between White Wines Fermented With Oak Chips and In Barrels. *Journal of Food Science*, 67(6), 2415–2419. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb09563.x>
- H.- D. Belitz, W. Grosch, & P. Schieberle. (2011). *Χημεία Τροφίμων* (Τζιόλα).
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free radicals in biology and medicine*.
- Hernández-Orte, P., Ibarz, M. J., Cacho, J., & Ferreira, V. (2005). Effect of the addition of ammonium and amino acids to musts of Airen variety on aromatic composition and sensory properties of the obtained wine. *Food Chemistry*, 89(2), 163–174. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.02.021>
- Heymann, H. (2004). *Wine Tasting: a Professional Handbook*. Ronald S. Jackson. Academic Press, San Diego, 2002. ISBN: 0-12-379076-X. *Food Quality and Preference*, 15(6), 607. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2003.10.001>
- Hodson, G., Wilkes, E., Azevedo, S., & Battaglene, T. (2017). Methanol in wine. *BIO Web of Conferences*, 9, 02028. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20170902028>
- Iriti, M., & Faoro, F. (2006). Grape phytochemicals: A bouquet of old and new nutraceuticals for human health. *Medical Hypotheses*, 67(4), 833–838. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2006.03.049>
- Jackson, R. S. (2009). Qualitative Wine Assessment. In *Wine Tasting* (pp. 303–348). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374181-3.00006-5>
- John McMurry. (2012). *Οργανική Χημεία* (Vol. 5). Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
- Jordão, A. M., Correia, A. C., DelCampo, R., & González SanJosé, M. L. (2012). Antioxidant capacity, scavenger activity, and ellagitannins content from commercial oak pieces used in winemaking. *European Food Research and Technology*, 235(5), 817–825. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1803-y>
- Kanakaki, E., Siderakou, D., Kallithraka, S., Kotseridis, Y., & Makris, D. P. (2015). Effect of the degree of toasting on the extraction pattern and profile of antioxidant polyphenols leached from oak chips in model wine systems. *European Food Research and Technology*, 240(5), 1065–1074. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2410-x>
- Karbowiak, T., Gougeon, R. D., Alinc, J.-B., Brachais, L., Debeaufort, F., Voilley, A., & Chassagne, D. (2009). Wine Oxidation and the Role of Cork. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50(1), 20–52. <https://doi.org/10.1080/10408390802248585>

- Kielczykowska, M., Kocot, J., Paździor, M., & Musik, I. (2018). Selenium – a fascinating antioxidant of protective properties. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 27(2), 245–255. <https://doi.org/10.17219/acem/67222>
- Kotseridis, Y., Kallithraka, S., Kyraleou, M., Proxenia, N., & Makris, D. P. (2013). Browning rate of white wines: Dependence on antioxidant activity kinetics and changes in phenolic composition.
- Kritzinger, E. C., Bauer, F. F., & du Toit, W. J. (2013). Role of Glutathione in Winemaking: A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(2), 269–277. <https://doi.org/10.1021/jf303665z>
- Kyraleou, M., Gkanidi, E., Koundouras, S., & Kallithraka, S. (2019). Tannin content and antioxidant capacity of five Greek red grape varieties. *Vitis -Geilweilerhof-*, 58, 69–75. <https://doi.org/10.5073/vitis.2019.58.special-issue.69-75>
- Lachenmeier, D. W., & Sohnius, E.-M. (2008). The role of acetaldehyde outside ethanol metabolism in the carcinogenicity of alcoholic beverages: Evidence from a large chemical survey. *Food and Chemical Toxicology*, 46(8), 2903–2911. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.05.034>
- Lambrechts, M. G., & Pretorius, I. S. (2019). Yeast and its Importance to Wine Aroma - A Review. *South African Journal of Enology & Viticulture*, 21(1). <https://doi.org/10.21548/21-1-3560>
- 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 Research International*, 40(1), 176–181. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.09.003>
- Lilly, M., Lambrechts, M. G., & Pretorius, I. S. (2000). Effect of Increased Yeast Alcohol Acetyltransferase Activity on Flavor Profiles of Wine and Distillates. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(2), 744–753. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.2.744-753.2000>
- Liu, Q. (2010). Determination of inorganic selenium species in commercial wine collected from the Beijing region, China. *Chemical Speciation & Bioavailability*, 22(2), 81–85. <https://doi.org/10.3184/095422910X12690197015430>
- Liu, S.-Q. (2002). Malolactic fermentation in wine - beyond deacidification. *Journal of Applied Microbiology*, 92(4), 589–601. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01589.x>
- Liu, S.-Q., & Pilone, G. J. (2000). An overview of formation and roles of acetaldehyde in winemaking with emphasis on microbiological implications. *International Journal of Food Science & Technology*, 35(1), 49–61. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2000.00341.x>
- Loscos, N., Hernandez-Orte, P., Cacho, J., & Ferreira, V. (2007). Release and Formation of Varietal Aroma Compounds during Alcoholic Fermentation from Nonfloral Grape Odorless Flavor Precursors Fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(16), 6674–6684. <https://doi.org/10.1021/jf0702343>
- Makhotkina, O., & Kilmartin, P. A. (2009). Uncovering the influence of antioxidants on polyphenol oxidation in wines using an electrochemical method: Cyclic voltammetry. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 633(1), 165–174. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2009.05.007>
- Marks, A. C., & Morris, J. R. (1993). Ascorbic Acid Effects on the Post-Disgorgement Oxidative Stability of Sparkling Wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 44(2), 227–231. <https://www.ajevonline.org/content/44/2/227>
- McArdle, J. v, & Hoffmann, M. R. (1983). Kinetics and mechanism of the oxidation of aquated sulfur dioxide by hydrogen peroxide at low pH. *The Journal of Physical Chemistry*, 87(26), 5425–5429. <https://doi.org/10.1021/j150644a024>
- Michel, J., Jourdes, M., le Floch, A., Giordanengo, T., Mourey, N., & Teissedre, P.-L. (2013). Influence of Wood Barrels Classified by NIRS on the Ellagitannin Content/Composition and on the Organoleptic Properties of Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(46), 11109–11118. <https://doi.org/10.1021/jf403192y>

- Moreno J., & Peinado R. (2012). *Enological Chemistry*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2011-0-69661-9>
- Moreno-Arribas, M. V., & Polo, M. C. (2009). *Wine Chemistry and Biochemistry* (M. V. Moreno-Arribas & M. C. Polo, Eds.). Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-74118-5>
- Nagel, C., & Graber, W. R. (1988). Effect of Must Oxidation on Quality of White Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 39, 1–4.
- Nenadis, N., & Paraskevopoulou, A. (2016). Browning susceptibility of commercial monovarietal white wines under accelerated oxidation conditions: correlation with compositional data and effect on total phenol content and radical scavenging activity. *European Food Research and Technology*, 242(11), 1821–1828. <https://doi.org/10.1007/s00217-016-2681-5>
- Noble, A. C. (1998). Why Do Wines Taste Bitter and Feel Astringent? In *Chemistry of Wine Flavor* (Vol. 714, pp. 156–165). American Chemical Society. <https://doi.org/doi:10.1021/bk-1998-0714.ch012>
- Oszmianski, J., Cheyner, V., & Moutounet, M. (1996). Iron-Catalyzed Oxidation of (+)-Catechin in Model Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(7), 1712–1715. <https://doi.org/10.1021/jf9507710>
- Palomo, E. S., Díaz-Maroto, M. C., Viñas, M. A. G., Soriano-Pérez, A., & Pérez-Coello, M. S. (2007). Aroma profile of wines from Albillo and Muscat grape varieties at different stages of ripening. *Food Control*, 18(5), 398–403. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.11.006>
- Pérez-Coello, M. S., González-Viñas, M. A., García-Romero, E., Cabezudo, M. D., & Sanz, J. (2000). Chemical and sensory changes in white wines fermented in the presence of oak chips. *International Journal of Food Science & Technology*, 35(1), 23–32. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2000.00337.x>
- Pérez-Corona, M. T., Sánchez-Martínez, M., Valderrama, M. J., Rodríguez, M. E., Cámara, C., & Madrid, Y. (2011). Selenium biotransformation by *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* during white wine manufacture: Laboratory-scale experiments. *Food Chemistry*, 124(3), 1050–1055. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.073>
- Perpete, P., Duthoit, O., de Maeyer, S., Imray, L., Lawton, A. I., Stavropoulos, K. E., Gitonga, V. W., Hewlins, M. J. E., & Richard Dickinson, J. (2006). Methionine catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 6(1), 48–56. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1356.2005.00005.x>
- Polášková, P., Herszage, J., & Ebeler, S. E. (2008). Wine flavor: chemistry in a glass. *Chemical Society Reviews*, 37(11), 2478. <https://doi.org/10.1039/b714455p>
- Raineau, Y., Giraud-Héraud, É., Lecocq, S., Pérès, S., Pons, A., & Tempère, S. (2023). When health-related claims impact environmental demand: Results of experimental auctions with Bordeaux wine consumers. *Ecological Economics*, 204, 107663. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2022.107663>
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (2005). *Handbook of Enology*. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/0470010363>
- Ribereau-gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2020). *Handbook of Enology, Volume 2: The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments*.
- Rizwan Ahmad, & Ahtesham Hussain. (2022). *Reactive Oxygen Species* (R. Ahmad, Ed.; Vol. 28). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.94870>
- Robbins, R. J. (2003). Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(10), 2866–2887. <https://doi.org/10.1021/jf026182t>

- Robinson, S. P., & Davies, C. (2000). Molecular biology of grape berry ripening. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 6(2), 175–188. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2000.tb00177.x>
- Rodríguez-Bencomo, J. J., Andújar-Ortiz, I., Sánchez-Patán, F., Moreno-Arribas, M. V., & Pozo-Bayón, M. A. (2016). Fate of the glutathione released from inactive dry yeast preparations during the alcoholic fermentation of white musts. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 22(1), 46–51. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12161>
- Romano, P., & Suzzi, G. (1996). Origin and Production of Acetoin during Wine Yeast Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(2), 309–315. <https://doi.org/10.1128/aem.62.2.309-315.1996>
- Ronald S. Jackson. (2008). *Wine Science*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373646-8.X5001-X>
- Rucker, R. B., Suttie, J. W., McCormick, D. B., & J. Machlin, L. (2001). *Handbook of Vitamins Third Edition* (3rd ed.). Taylor & Francis.
- Sánchez-Palomo, E., Alonso-Villegas, R., Delgado, J. A., & González-Viñas, M. A. (2017). Improvement of Verdejo white wines by contact with oak chips at different winemaking stages. *LWT - Food Science and Technology*, 79, 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.12.045>
- Sarudi, I., & Kelemen, J. (1998). Determination of sulphur and total sulphur dioxide in wines by an ICP-AES method. In *Talanta* (Vol. 45).
- Siebert, T. E., Wood, C., Eelsey, G. M., & Pollnitz, A. P. (2008). Determination of Rotundone, the Pepper Aroma Impact Compound, in Grapes and Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(10), 3745–3748. <https://doi.org/10.1021/jf800184t>
- Smit, I., Pflieginger, M., Binner, A., Großmann, M., Horst, W. J., & Löhnertz, O. (2014). Nitrogen fertilisation increases biogenic amines and amino acid concentrations in *Vitis vinifera* var. *Riesling* musts and wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(10), 2064–2072. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6525>
- Stott, J. A. (1994). Survey of Sulphur Dioxide Levels in White Wine from the 1991 Wine Magazine International Challenge and the Safeway Organic Wine Challenge. *Journal of Wine Research*, 5(2), 127–133. <https://doi.org/10.1080/09571269408717991>
- Styger, G., Prior, B., & Bauer, F. F. (2011). Wine flavor and aroma. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38(9), 1145–1159. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-1018-4>
- Swiegers, J. H., & Pretorius, I. S. (2007). Modulation of volatile sulfur compounds by wine yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(5), 954–960. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0828-1>
- Taylor, R. T., & Jenkins, W. T. (1966). Leucine Aminotransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 241(19), 4396–4405. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)99734-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)99734-6)
- Vaimakis, V. (1996). Must oxygenation together with glutathione addition in the oxidation of white wine. *Food Chemistry*, 57(3), 419–422. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(95\)00244-8](https://doi.org/10.1016/0308-8146(95)00244-8)
- van Sluyter, S. C., McRae, J. M., Falconer, R. J., Smith, P. A., Bacic, A., Waters, E. J., & Marangon, M. (2015). Wine Protein Haze: Mechanisms of Formation and Advances in Prevention. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(16), 4020–4030. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00047>
- VenuGopal, K. S., Cherita, C., & Anu-Appaiah, K. A. (2018). Augmentation of chemical and organoleptic properties in *Syzygium cumini* wine by incorporation of grape seeds during vinification. *Food Chemistry*, 242, 98–105. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.029>
- Visioli, F., Panaite, S.-A., & Tomé-Carneiro, J. (2020). Wine's Phenolic Compounds and Health: A Pythagorean View. *Molecules*, 25(18), 4105. <https://doi.org/10.3390/molecules25184105>

- Vlahou, E., Christofi, S., Roussis, I. G., & Kallithraka, S. (2022). Browning Development and Antioxidant Compounds in White Wines after Selenium, Iron, and Peroxide Addition. *Applied Sciences*, 12(8), 3834. <https://doi.org/10.3390/app12083834>
- Volschenk, H., van Vuuren, H. J. J., & Viljoen-Bloom, M. (2017). Malic Acid in Wine: Origin, Function and Metabolism during Vinification. *South African Journal of Enology & Viticulture*, 27(2). <https://doi.org/10.21548/27-2-1613>
- Waterhouse, A. L. (2002). Wine Phenolics. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 957(1), 21–36. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb02903.x>
- Waterhouse, A. L., & Laurie, V. F. (2006). Oxidation of Wine Phenolics: A Critical Evaluation and Hypotheses. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57, 306–313.
- Waterhouse, A. L., Sacks, G. L., & Jeffery, D. W. (2016). *Understanding Wine Chemistry*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118730720>
- Wegmann-Herr, P., Ullrich, S., Schmarr, H.-G., & Durner, D. (2016). Use of glutathione during white wine production – impact on S-off-flavors and sensory production. *BIO Web of Conferences*, 7, 02031. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20160702031>
- Wood, C., Siebert, T. E., Parker, M., Capone, D. L., Elsey, G. M., Pollnitz, A. P., Eggers, M., Meier, M., Vössing, T., Widder, S., Krammer, G., Sefton, M. A., & Herderich, M. J. (2008). From Wine to Pepper: Rotundone, an Obscure Sesquiterpene, Is a Potent Spicy Aroma Compound. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(10), 3738–3744. <https://doi.org/10.1021/jf800183k>
- Yair Maergalit. (1997). *Concepts in Wine Chemistry* (3rd ed.).

### Ελληνική Βιβλιογραφία

- Γ. Κοτσερίδης, Σ. Καλλίθρακα, & Ν. Προξενιά. (2017). *Εργαστηριακές ασκήσεις Οινολογίας 2*.
- Δρούζας Δημήτρης, & Μπερής Ευάγγελος (PhD). (2021). *ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ*.
- Ε.Κ. Βουνδούρη, & Μ.Γ. Κοντομηνά. (2015). *Εισαγωγή στη Χημεία των Τροφίμων* (2002nd ed.). Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
- Ηλιοπούλου Σ. Χ., (2011), Βιογενείς αμίνες στα τρόφιμα, Α.Τ.Ε.Ι. Καλαμάτας
- Κοτσερίδης Γ., & Προξενιά Ν. (2015). Εργαστηριακές Ασκήσεις: Οινολογία Ι. In *Εργατήριο Οινολογίας*. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Πολύζος Γ.,(2008), Το οινικό δυναμικό των ποικιλιών: Cabernet Sauvignon, Mourvedre, Saunignon blanc, Ροκανιάρης, Τ.Ε.Ι. Καλαμάτας
- Τσακίρης Αργύρης. (2009). *Οινολογία: από το σταφύλι στο κρασί*. Εκδόσεις Ψυχάλου.

### Ιστοσελίδες

1. <http://www.cybercolloids.net/information/technical-articles/introduction-pectin-structure>
- <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/D-Galacturonic-Acid#section=Structures>
- <https://www.mhealthknowledge.org/food-biotechnology/de-novo-synthesis-of-flavors.html>
- <https://www.tuscany-diet.net/2014/03/04/flavonols/>