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

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
Ι) ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΑ ΙΙ) ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μελέτη της μεταβολής του ρυθμού οξείδωσης των λευκών οίνων έπειτα από επιτάχυνση της οξείδωσης και προσθήκη Se

Μελίνα Μαρία Χ. Χατζησταυρίδη

Επιβλέπουσα καθηγήτρια:
Καλλίθρακα Σταματίνα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ, 2023

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

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μελέτη της μεταβολής του ρυθμού οξείδωσης των λευκών οίνων έπειτα από επιτάχυνση της οξείδωσης και προσθήκη Se

"Study of the alteration of oxidation rate in white wines after acceleration of oxidation and addition of Se"

Μελίνα Μαρία Χ. Χατζησταυρίδη

Εξεταστική Επιτροπή:
Καλλίθρακα Σταματίνα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΓΠΑ (επιβλέπουσα)
Γαρδέλη Χρυσαυγή, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ
Παππάς Χρήστος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Μελέτη της μεταβολής του ρυθμού οξείδωσης των λευκών οίνων έπειτα από επιτάχυνση της οξείδωσης και προσθήκη Se

ΠΜΣ Σύγχρονη Τεχνολογία Τροφίμων Ι)Γαλακτοκομία ΙΙ)Οινολογία
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου
Εργαστήριο Οινολογίας και Αλκοολούχων Ποτών

Περίληψη

Η αντιοξειδωτική ικανότητα που διαθέτουν οι λευκοί οίνοι, είτε από τα συστατικά τους είτε από πρόσθετα αντιοξειδωτικά, χρήζει μεγάλου επιστημονικού ενδιαφέροντος εξαιτίας της προστασίας που έχει τη δυνατότητα να παρέχει στην ποιότητα αυτών αλλά και να αποτρέψει την εμφάνιση οξειδωτικού καφετιάσματος (browning). Στην παρούσα μελέτη εξετάσθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα δύο ελληνικών, λευκών ποικιλιών, Μαλαγουζιά και Ρετσίνα (Σαββατιανό), μέσω πειράματος επιταχυνόμενης οξείδωσης για 12 ημέρες στους 55°C, έπειτα από προσθήκη σεληνίου, γλουταθειόνης, ασκορβικού οξέος και θειώδη ανυδρίτη, σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις το κάθε αντιοξειδωτικό, με στόχο να εξεταστεί η πιθανή αντιοξειδωτική προστασία που πιθανώς να παρέχει το σελήνιο στον οίνο.

Στην πειραματική διαδικασία εξετάσθηκαν και για τις δύο ποικιλίες, για όλες τις προσθήκες, η μεταβολή του ρυθμού οξείδωσης μέσω της μέτρησης της απορρόφησης στα 420 nm, για κάθε μία από τις 12 ημέρες του πειράματος, η μέτρησης της μεταβολής συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας των οίνων, των φαινολικών ενώσεων, του ελεύθερου και ολικού θειώδη ανυδρίτη και η μεταβολή των ολικών σουλφυδρυλομάδων. Επιπλέον, τις ημέρες 0 και 12 έγινε η μέτρηση της ολικής οξύτητας και ο ποσοτικός προσδιορισμός των φαινολικών συστατικών των οίνων προς εξέταση μέσω της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC).

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων οδήγησε στο συμπέρασμα ότι οι ποικιλίες της Μαλαγουζιάς και της Ρετσίνας, παρόλο που τους έγινε προσθήκη θειώδους ανυδρίτη, γλουταθειόνης, σεληνίου και ασκορβικού οξέος εμφάνισαν οξειδωτικό καφέτιασμα. Ο θειώδης ανυδρίτης ήταν εκείνος που κατάφερε να προστατέψει καλύτερα τις δύο ποικιλίες από την οξείδωση, ενώ αντίθετα το ασκορβικό οξύ διαπιστώθηκε πως την επιτάχυνε. Η Ρετσίνα, αν και έχει σαν επιπλέον αντιοξειδωτικό τη ρητίνη, εμφάνισε μεγαλύτερο οξειδωτικό καφέτιασμα και η αντιοξειδωτική της η ικανότητα μειώθηκε στα ίδια επίπεδα με εκείνη της Μαλαγουζιάς. Το σελήνιο αποδείχθηκε ότι θα μπορέσει να αντικαταστήσει ένα ποσοστό του θειώδους ανυδρίτη στην εξαιρετική προστασία που προσφέρεται στον οίνο μελλοντικά.

Επιστημονική περιοχή: Αντιοξειδωτική προστασία λευκών οίνων
Λέξεις κλειδιά: επιταχυνόμενη αμαύρωση, ρυθμός αμαύρωσης, οξείδωση, σελήνιο, αντιοξειδωτικά

Study of the alteration of oxidation rate in white wines after acceleration of oxidation and addition of Se

MSc Advanced Food Technology I) Dairy Science II) Oenology
Department of Food Science and Human Nutrition
Laboratory of Oenology and Alcoholic Drinks

Abstract

The antioxidant capacity of white wines, either from their components or from additional antioxidants, needs great scientific interest, because of the protection it can offer to their quality but also prevents the appearance of oxidative browning. In the present study, the antioxidant capacity of two Greek white varieties, Malagouzia and Retsina (Savvatiano), was examined through an accelerated oxidation experiment for 12 days at 55°C, after the addition of selenium, glutathione, ascorbic acid and sulfur dioxide, in two different concentrations of each antioxidant , with the aim of testing the potential antioxidant protection that selenium can provide in wine.

In the experimental procedure, for both varieties, for all additions, the change in the oxidation rate was examined by measuring the absorbance at 420 nm, for each of the 12 days of the experiment, the measurement of the change in the total antioxidant capacity of the wines, of phenolic compounds, free and total sulfur dioxide and the change of total sulfhydryl groups. In addition, on day 0 and day 12, the total acidity was measured, and the phenolic components of the wines were quantified by High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

The analysis of the results led to the conclusion that the varieties of Malagouzia and Retsina, despite the addition of sulfur dioxide, glutathione, selenium and ascorbic acid, appeared oxidative browning. Sulfur dioxide was the one that managed protect better the two varieties from oxidation, while on the contrary, the ascorbic acid was found to increase it. Although Retsina has resin as an additional antioxidant, has shown an increase at its appearance of oxidative browning and its antioxidant capacity decreased to the same levels as those of Malagouzia. Selenium has been shown to be able to replace a proportion of sulfur dioxide in the oxidative protection of the wine, in future.

Scientific area: Antioxidant protection in white wines
Keywords: accelerated browning experiment, browning rate, oxidation, selenium, antioxidants

Ευχαριστίες

Με την παρούσα ερευνητική μελέτη ολοκληρώνονται οι μεταπτυχιακές μου σπουδές στο Εργαστήριο Οινολογίας και Αλκοολούχων Ποτών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς όσους βοήθησαν στην ολοκλήρωσή της.

Αρχικά, επιθυμώ να ευχαριστήσω την κυρία Καλλίθρακα Σταματίνα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γ.Π.Α., για την επιλογή και ανάθεση του θέματος της μεταπτυχιακής μου μελέτης. Επιπλέον, θα ήθελα να την ευχαριστήσω για τον χρόνο αλλά και για την πολύτιμη βοήθεια και γνώσεις που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια της συγγραφής της συγκεκριμένης μελέτης, όσο και κατά τη φοίτησή μου στο Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών της Οινολογίας.

Παράλληλα, επιθυμώ να ευχαριστήσω την κυρία Γαρδέλη Χρυσαυγή, Επίκουρη Καθηγήτρια του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου Γ.Π.Α., και τον κύριο Παππά Χρήστο, Αναπληρωτή Καθηγητή του Εργαστηρίου Γενικής Χημείας του Γ.Π.Α., που δέχτηκαν να αξιολογήσουν την παρούσα μελέτη.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Χριστοφή Στεφανία, Υποψήφια Διδάκτωρ του Εργαστηρίου Οινολογίας και Αλκοολούχων Ποτών του Γ.Π.Α. και την κυρία Προξενιά Νίκη, μέλος ΕΔΙΠ του Εργαστηρίου Οινολογίας και Αλκοολούχων Ποτών του Γ.Π.Α., για τον χρόνο και την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφεραν με στόχο την πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω βαθύτατα τη μητέρα μου που με στήριξε και με βοήθησε να υλοποιήσω τις μεταπτυχιακές μου σπουδές.

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

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΜΕΛΕΤΗΣ

1. Οίνος 8
1.1. Ορισμός 8
1.2. Ιστορική αναδρομή 8
2. Χημική σύσταση 9
2.1. Σάκχαρα 10
2.2. Αλκοόλες 12
2.3. Οργανικά οξέα 14
2.4. Φαινολικές ενώσεις 19
2.4.1. Φλαβονοειδείς φαινολικές ενώσεις 20
2.4.2. Μη φλαβανοειδείς φαινολικές ενώσεις 25
2.5. Αζωτούχες ενώσεις 27
2.6. Πτητικές ενώσεις- Άρωμα οίνου 30
2.6.1. Πρωτογενές άρωμα 31
2.6.2. Δευτερογενές άρωμα 32
2.6.3. Τριτογενές άρωμα 32
3. Οξείδωση οίνου 33
3.1. Ενζυμική οξείδωση 34
3.2. Χημική οξείδωση (Μη ενζυμική) 35
3.3. Αλληλεπίδραση της οξείδωσης με τα χημικά συστατικά οίνου 37
3.3.1. Σάκχαρα 37
3.3.2. Αλκοόλες 37
3.3.3. Οργανικά οξέα 38
3.3.4. Αζωτούχες ενώσεις 38
3.4. Οξείδωση λευκών οίνων 38
3.4.1. Καφέτιασμα 40
3.4.2. Μέθοδοι προσδιορισμού οξείδωσης 40
4. Αντιοξειδωτική προστασία του οίνου 43
4.1. Φαινολικές ενώσεις 43
4.2. Θειώδης ανυδρίτης 44
4.3. Γλουταθειόνη 46
4.4. Ασκορβικό οξύ 48
4.5. Σελήνιο 49
5. Ελληνικές λευκές ποικιλίες 50
5.1. Σαββατιανό – Ρετσίνα 51
5.2. Μαλαγουζιά 51
6. Σκοπός της μελέτης 51
7. Υλικά και Μέθοδοι 52
7.1. Υλικά 52
7.1.1. Δείγμα οίνου 52

7.1.2. Αντιδραστήρια 53
7.1.3. Όργανα 53
7.2. Πειραματική διαδικασία 54
7.2.1. Δείγματα προς ανάλυση και θερμοκρασία εφαρμογής πειράματος 54
7.2.2. Προετοιμασία δειγμάτων 54
7.2.3. Δειγματοληψίες 57
7.3. Μέθοδοι ανάλυσης 57
7.3.1. Απορρόφηση στα 420nm και δείκτης καστάνωσης 57
7.3.1.1. Προετοιμασία δειγμάτων 57
7.3.1.2. Κατασκευή καμπύλης μεταβολής 58
7.3.2. Θειώδης ανυδρίτης (ολικός & ελεύθερος) 58
7.3.2.1. Προετοιμασία δείγματος 59
7.3.3. Ολική ή ογκομετρούμενη οξύτητα 59
7.3.3.1. Προετοιμασία δείγματος 60
7.3.4. Δείκτης φαινολικών ουσιών (ΔΦΟ) 60
7.3.4.1. Προετοιμασία δείγματος 60
7.3.5. Ολικά φαινολικά συστατικά – Μέθοδος Folin-Ciocalteau 61
7.3.5.1. Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς 61
7.3.5.2. Προετοιμασία δείγματος 62
7.3.6. Αντιοξειδωτική ικανότητα – Μέθοδος DPPH 62
7.3.6.1. Κατασκευή πρότυπης καμπύλης 62
7.3.6.2. Προετοιμασία δειγμάτων 63
7.3.7. Ολικές ελεύθερες σουλφυδρυλομάδες (SH) – Μέθοδος Ellman 63
7.3.7.1. Κατασκευή καμπύλης αναφοράς 63
7.3.7.2. Προετοιμασία δείγματος 64
7.3.8. Προσδιορισμός των επιπέδων των φαινολικών ενώσεων με τη χρήση HPLC 65
7.3.9. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων 65
8. Αποτελέσματα και Συζήτηση 66
8.1. Απορρόφηση στα 420nm και δείκτης καστάνωσης 66
8.2. Θειώδης ανυδρίτης (ολικός & ελεύθερος) 78
8.3. Ολική ή ογκομετρούμενη οξύτητα 85
8.4. Δείκτης φαινολικών ουσιών (ΔΦΟ) 88
8.5. Ολικά φαινολικά συστατικά – Μέθοδος Folin-Ciocalteau 92
8.6. Αντιοξειδωτική ικανότητα – Μέθοδος DPPH 99
8.7. Ολικές ελεύθερες σουλφυδρυλομάδες (SH) – Μέθοδος Ellman 104
8.8. Προσδιορισμός των επιπέδων των φαινολικών ενώσεων με τη χρήση HPLC 110
9. Συμπεράσματα 113
10. Βιβλιογραφικές αναφορές 116

1. Οίνος

1.1.Ορισμός

Σύμφωνα με τη νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης, «οίνος» καλείται το προϊόν που παράγεται αποκλειστικά με πλήρη ή μερική αλκοολική ζύμωση νωπών σταφυλιών, είτε αυτά έχουν υποστεί έκθλιψη είτε όχι, ή γλεύκους σταφυλιών (Καν.(ΕΕ) 1308/2013, Παράρτημα VII, Μέρος ΙΙ).

1.2.Ιστορική αναδρομή

Ο οίνος και η διαδικασία της οινοποίησης φαίνεται ότι έχει έναν άρρητο δεσμό με την ανθρώπινη ιστορία. Το 4000 π.Χ. στην Μέση Ανατολή φαίνεται πως ξεκίνησε η καλλιέργεια του φυτού της αμπέλου, ενώ οι πρώτες αναφορές για διαδικασία οινοποίησης ξεκινούν το 2500 π.Χ., από την Αίγυπτο. Υπάρχουν πολλές απόψεις για το πώς δημιουργήθηκε η πρώτη μορφή οίνου στον κόσμο, με την επικρατέστερη να υποστηρίζει πως έγινε από «λάθος», όπου κάποιος ανακάλυψε πως τα σταφύλια που είχε αγνοήσει σε έναν αμφορέα μετατράπηκαν σε κάτι πολύ καλύτερο. Έπειτα, οι Έλληνες, λόγω της ενεργής δράσης τους στο εμπόριο, άρχισαν να μεταφέρουν τον οίνο σε όλο, μέχρι εκείνη την εποχή, γνωστό κόσμο. Επίσης, για να δείξουν την εκτίμηση που είχαν για τον οίνο, δημιούργησαν έναν θεό που είχε ως σύμβολο του το αμπέλι και τον οίνο, το θεό Διόνυσο. Αντίστοιχα, οι Ρωμαίοι άρχισαν να καλλιεργούν την άμπελο σε διάφορα μέρη της αυτοκρατορίας τους, περιοχές που στη σύγχρονη εποχή αποτελούν μοναδικά Terroir.

Στο πέρασμα των αιώνων, υπήρξαν φορές που ο οίνος κινδύνεψε να χαθεί ή να αντικατασταθεί από άλλα υποκατάστατα που ανακαλύπτονταν (μπύρα, αποστάγματα, κ.ά.), αλλά κατάφερε να επιβιώσει μέχρι και σήμερα. Αποτέλεσε αντικείμενο μελέτης πολλών διάσημων επιστημόνων, με βασικότερο το Louis Pasteur, ο οποίος προσπάθησε να εξηγήσει την φύση της αλκοολικής ζύμωσης και από τι προκαλούνταν. Επίσης, τον 17^{ο} αιώνα μ.Χ. φαίνεται πως ξεκίνησε η μεγαλύτερη επανάσταση στο κόσμο του οίνου, μετά φυσικά από την ανακάλυψη του. Στις οινοπαραγωγικές χώρες (παλαιός κόσμος) που υπήρχαν μέχρι τότε και είχαν μεγάλη οινολογική ιστορία

(Γαλλία, Ιταλία, Ισπανία, Ελλάδα, κ.ά.) ξεκίνησαν να προστίθενται χώρες (ΗΠΑ, Αυστραλία, Νότια Αφρική, Χιλή, κ.ά.) που το αμπέλι και ο οίνος αποτελούσαν μέρη της νεότερης ιστορίας τους (νέος κόσμος). Ως αποτέλεσμα, δημιουργήθηκε μία σύγκρουση ανάμεσα στην προστασία της «τυπικότητας» του οίνου και στις επιθυμίες του καταναλωτή. Πλέον, ακόμα και χώρες που παλιότερα για ιδεολογικούς ή/και θρησκευτικούς λόγους δεν κατανάλωναν οίνο (Κίνα, Ινδία), είναι μεγάλες οινοπαραγωγικές δυνάμεις (Amerine,1968).

2. Χημική σύσταση

Η αλκοολική ζύμωση θεωρείται η πιο σημαντική αντίδραση που συμβαίνει στη διαδικασία της οινοποίησης, μετατρέπει δηλαδή το γλεύκος σε οίνο. Αναλυτικότερα, η αλκοολική ζύμωση είναι η αναερόβια μετατροπή των σακχάρων που υπάρχουν στο γλεύκος (γλυκόζη και φρουκτόζη), σε αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα (Αντίδραση1).

$$C_6H_{12}O_6 \xrightarrow{\text{ένζυμο}} 2\ CH_3CH_2OH + 2\ CO_2\uparrow$$

Αντίδραση 1: Αλκοολική ζύμωση

Εκτός από αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα, παράγονται και διάφορα άλλα συστατικά κατά την αντίδραση της αλκοολικής ζύμωσης, που του ενισχύουν το οργανοληπτικό ενδιαφέρον (Moreno-Arribas & Polo,2009).

Ο οίνος είναι ένα υδατο-αλκοολικό διάλυμα (Πίνακας 1), που εμπεριέχει σε μεγαλύτερο ποσοστό νερό, οργανικές ενώσεις (αλκοόλες, σάκχαρα, οργανικά οξέα, φαινολικές ενώσεις, αζωτούχες ενώσεις, πολυσακχαρίτες, πτητικές ενώσεις, βιταμίνες και ένζυμα) και ανόργανα κατιόντα και ανιόντα (Σουφλερός, 1997).

Πίνακας 1: Κύρια συστατικά οίνου

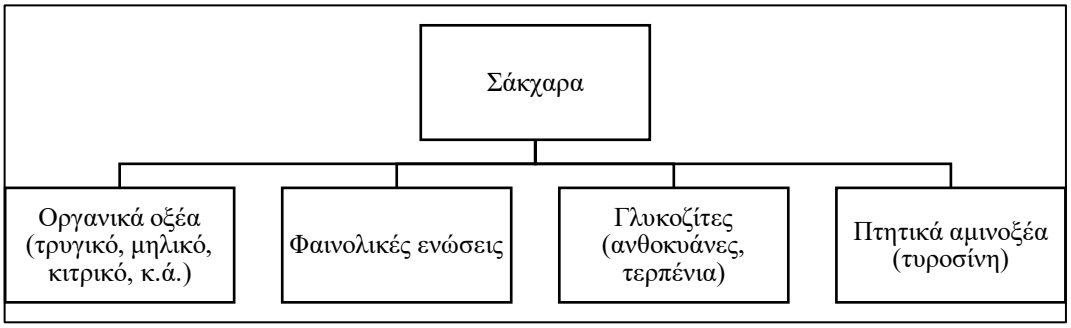
Συστατικά οίνου	Ποσοστό (%) στον οίνο
Νερό	85%-93%
Αιθανόλη	7%-15%
Λοιπά	<3%

2.1.Σάκχαρα

Τα σάκχαρα, ή οι υδατάνθρακες, είναι φωτοσυνθετικά προϊόντα (Αντίδραση 2) που παράγονται από τα πράσινα μέρη της αμπέλου, όπως τα φύλλα και οι ράγες, ενώ την περίοδο ωρίμανσης του καρπού συγκεντρώνονται στη ράγα (Ribereau-Gayon et al., 2006). Θεωρείται από τα κυριότερα συστατικά του γλεύκους, διότι εκτός της μεγαλύτερης συγκέντρωσης τους, συγκριτικά με τα άλλα συστατικά (12-30%), η περιεκτικότητά του σε αυτά καθορίζει τον αλκοολικό βαθμό του παραγόμενου οίνου αλλά και την ποιότητά του, αφού αποτελούν πρόδρομες ενώσεις (Διάγραμμα 1) των περισσότερων συστατικών του (Κοτσερίδης & Προξενιά, 2020).

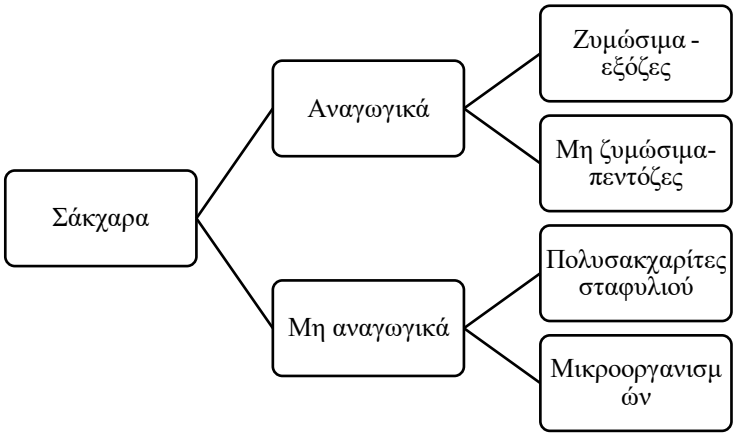
$$6\ CO_2 + 6\ H_2O \xrightarrow{\text{Ηλιακή Ενέργεια}} C_6H_{12}O_6 + 6\ O_2$$

Αντίδραση 2: Σύντομη απεικόνιση της φωτοσύνθεσης



Διάγραμμα 1: Παραγόμενες ενώσεις από σάκχαρα

Τα σάκχαρα έχουν γενικό χημικό τύπο $C_n(H_2O)_n$ και αποτελούνται από μία ανθρακική αλυσίδα με αλκοολικές ομάδες και μία αλδεϋδική (αλδόζες) ή μία κετονική (κετόζες) ομάδα (Σουφλερός, 2015). Τα σάκχαρα που υπάρχουν στο γλεύκος ή/και στον οίνο, χωρίζονται στα αναγωγικά και τα μη αναγωγικά (πολυσακχαρίτες σταφυλιών και μικροοργανισμών). Τα αναγωγικά χωρίζονται και αυτά στα ζυμώσιμα (εξόζες – C6) και στα μη ζυμώσιμα (πεντόζες – C5).(Διάγραμμα 2)



Διάγραμμα 2: Κατηγορίες των σακχάρων σε γλεύκος & οίνο

<u>Αναγωγικά σάκχαρα</u>

Τα αναγωγικά σάκχαρα αποτελούνται από μια ελεύθερη κετονομάδα (-CO) ή αλδεϋδομάδα (-CHO) και ανάγουν το φελλίγγειο υγρό (αλκαλικό διάλυμα χαλκού). Είναι βιολογικά ασταθή, αφού μεταβολίζονται από τις ζύμες και τα βακτήρια που υπάρχουν στο γλεύκος ή/και στον οίνο, ενώ δεσμεύουν το διαθέσιμο θειώδη ανυδρίτη (Moreno-Arribas & Polo,2009). Χωρίζονται σε ζυμώσιμα (εξόζες) και μη ζυμώσιμα (πεντόζες).

Τα ζυμώσιμα σάκχαρα είναι εκείνα τα οποία μεταβολίζονται από τους ζυμομύκητες του γλεύκους και η περιεκτικότητα των οίνων σε αυτά τους χωρίζει στις εξής κατηγορίες· Ξηρός (< 2 g/L), Ημίξηρος (2-18 g/L), Ημίγλυκος (18-40 g/L) και Γλυκός (> 40 g/L). Τα πιο γνωστά ζυμώσιμα σάκχαρα είναι η D-(+)-γλυκόζη και η D-(-)-φρουκτόζη. Τα μη ζυμώσιμα σάκχαρα δεν ζυμώνονται από ζύμες αλλά προσβάλλονται από γαλακτικά βακτήρια, αυξάνοντας την πτητική οξύτητα του οίνου και προκαλώντας αλλοίωση στο τελικό προϊόν. Η συγκέντρωσή τους κυμαίνεται στα 0,3-2 g/L, με μεγαλύτερη συγκέντρωση στους ερυθρούς οίνους, ενώ συγκεντρώσεις > 2 g/L δημιουργεί υποψίες για ανάμιξη με οίνους από άλλα φρούτα. Οι πιο γνωστές πεντόζες είναι η D-ξυλόζη, η D-ριβόζη, η D-αραβινόζη και η L-ραμνόζη (Καλλίθρακα,2021).

<u>Μη αναγωγικά σάκχαρα</u>

Τα μη αναγωγικά καλούνται τα μη ζυμώσιμα σάκχαρα τα οποία δεν έχουν την ικανότητα να ανάγουν το φελλίγγειο υγρό. Βρίσκονται σε ίχνη στους οίνους ενώ ο προσδιορισμός ικανής ποσότητας τους υποδηλώνει νοθεία. Τέλος, τα πιο γνωστά μη αναγωγικά σάκχαρα είναι η λακτόζη (γλυκόζη & γαλακτόζη), η μαλτόζη (2 μόρια

γλυκόζης), η μελιβιόζη (γαλακτόζη & γλυκόζη) και η ραφινόζη (φρουκτόζη & μελιβιόζη) (Καλλίθρακα,2021).

Πολυσακχαρίτες

Οι πολυσακχαρίτες είναι σάκχαρα με βαθμό πολυμερισμού μεγαλύτερο του 20. Κατά την περίοδο ωρίμανσης των σταφυλιών, η συγκέντρωση των πολυσακχαριτών μειώνεται, ενώ σε περιόδους ξηρασίας είναι απαραίτητη η προσθήκη πηκτινολυτικών ενζύμων. Η συγκέντρωσή τους είναι μεγαλύτερη στο γλεύκος από ότι στον οίνο. (Moreno-Arribas & Polo,2009). Δρουν ως προστατευτικά κολλοειδή εμποδίζοντας τη συσσωμάτωση άλλων σωματιδίων που θα οδηγούσε σε θόλωμα του οίνου ή/και στη δημιουργία ιζήματος. Όμως, επηρεάζουν δυσμενώς την διαύγαση των οίνων και φράζουν τις διηθητικές πλάκες (Καλλίθρακα,2021). Χωρίζονται σε δύο κατηγορίες· ομοπολυσακχαρίτες (πηκτίνες) και ετεροπολυσακχαρίτες (κόμμεα).

Οι ομοπολυσακχαρίτες είναι δομικά συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων των φλοιών και της σάρκας, αποτελούνται από γαλακτουρονικό οξύ και είναι αδιάλυτοι. Στα γλεύκη υδρολύονται από πηκτινολυτικά ένζυμα ενώ δεν υπάρχουν όταν το γλεύκος προέρχεται από σταφύλια προσβεβλημένα από βοτρύτη. Οι ετεροπολυσακχαρίτες είναι διαλυτοί και, εκτός από γαλακτουρονικό οξύ, περιέχουν αραβινόζη, ραμνόζη, γαλακτόζη και μικρότερες ποσότητες ξυλόζης, μαννόζης και γλυκόζης. Τέλος, παράγονται και στην αλκοολική ζύμωση πολυσακχαρίτες, κυρίως μαννοπρωτεΐνες και γλυκομαννοπρωτεΐνες, με χαρακτηριστικό το μεγάλο μοριακό τους βάρος. (Καλλίθρακα,2021).

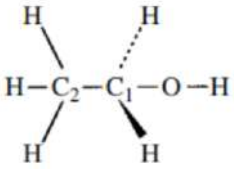
2.2. Αλκοόλες

Στον οίνο εμπεριέχονται τρεις κατηγορίες αλκοολών, οι απλές μονοαλκοόλες (αιθανόλη, μεθανόλη), οι ανώτερες αλκοόλες και οι πολυαλκοόλες (πολυόλες).

Αιθανόλη

Μετά το νερό, η αιθανόλη (Εικόνα 1) είναι το πιο σημαντικό συστατικό του οίνου. Αποτελεί το 7%-15% του οίνου και είναι αποτέλεσμα της αλκοολικής ζύμωσης σε αυτόν, αφού παράγεται όταν οι ζύμες μεταβολίσουν τα σάκχαρα. Επίσης, αιθανόλη μπορεί να παραχθεί και από τα κύτταρα του σταφυλιού, σε αναερόβιες συνθήκες. Κατά

την αντίδραση της αλκοολικής ζύμωσης χρειάζονται περίπου 16-18 g/L για να παραχθεί 1% αιθανόλης (Ribereau – Gayon et al., 2006). Στη μέτρηση της αλκοολοπεριεκτικότητας του οίνου χρησιμοποιείται η μέθοδος του Gay-Lussac και εκφράζεται με τον όρο «αλκοολικός βαθμός». Ο OIV αντικατέστησε τον «αλκοολικό βαθμό» με τον όρο «αλκοολικός τίτλος», και όρισε πως «αλκοολικός τίτλος κατ' όγκο» ενός οινικού προϊόντος (% vol) ονομάζεται ο αριθμός των λίτρων άνυδρης αιθανόλης που περιέχεται σε 100 λίτρα του προϊόντος αυτού, όταν οι δύο όγκοι μετριούνται σε θερμοκρασία 20ºC (Κοτσερίδης & Προξενιά, 2020).



Εικόνα 1: Χημική δομή αιθανόλης (Ribereau – Gayon et al., 2006)

<u>Μεθανόλη</u>

Η μεθανόλη δεν παράγεται στην αλκοολική ζύμωση, όμως προέρχεται από την ενζυμική υδρόλυση των πηκτινών. Εμπεριέχεται στον οίνο σε μικρές ποσότητες (60-150 mg/L) και δεν επηρεάζει το οργανοληπτικό προφίλ του. Σε μεγάλες συγκεντρώσεις είναι επικίνδυνη για τον άνθρωπο, αφού οξειδώνεται σε φορμαλδεΰδη, η οποία είναι τοξική για το κεντρικό νευρικό σύστημα. Στους οίνους δεν παρατηρείται κάποιος τέτοιος κίνδυνος (Ribereau – Gayon et al., 2006).

<u>Ανώτερες αλκοόλες</u>

Ανώτερες αλκοόλες καλούνται οι αλκοόλες με περισσότερα από δύο άτομα άνθρακα. Παράγονται στην αλκοολική ζύμωση και μαζί με τους αντίστοιχους εστέρες τους επηρεάζουν το αρωματικό προφίλ του οίνου (Ribereau – Gayon et al., 2006). Η επιρροή αυτή συσχετίζεται με τις συγκεντρώσεις τους, δηλαδή αν βρίσκονται σε ποσότητες έως 400mg/L συμμετέχουν θετικά, ειδάλλως σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις προσδίδουν ανεπιθύμητες βαριές οσμές. Μερικές ανώτερες αλκοόλες που εμπεριέχονται μέσα σε έναν οίνο είναι οι 1-προπανόλη, 2-μεθυλ-1-προπανόλη, 3-μεθυλ-1-βουτανόλη και η μεθυλ-βουτανόλη (Καλλίθρακα, 2022).

Πολυαλκοόλες

Στον οίνο οι κύριες πολυαλκοόλες που εμπεριέχονται είναι η γλυκερόλη, η σοβιτόλη, η μαννιτόλη και η 2,3-βουτανεδιόλη, με την πρώτη να βρίσκεται στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Η γλυκερόλη παράγεται στην αλκοολική ζύμωση και θεωρείται από τα βασικότερα συστατικά των οίνων μετά το νερό και την αιθανόλη. Η συγκέντρωσή της κυμαίνεται συνήθως στα 5 g/L, όμως από μεταβολές στη διάρκεια της ζύμωσης μπορεί να αυξηθεί στα 15-20 g/L. Σε υψηλές συγκεντρώσεις έχει παρατηρηθεί πως επηρεάζει το γευστικό προφίλ του οίνου, προσφέροντας του μια «απαλότητα - τυπικότητα» (Ribereau – Gayon et al., 2006).

2.3.Οργανικά οξέα

Ο οίνος είναι όξινο διάλυμα εξαιτίας της ύπαρξης ελεύθερων οργανικών οξέων μέσα σε αυτόν. Τα κυριότερα οξέα έχουν δημιουργηθεί από μεταβολικά μονοπάτια στο φυτό της αμπέλου (τρυγικό, μηλικό, κιτρικό, ασκορβικό κ.ά.) ενώ τα υπόλοιπα εμφανίζονται στη διαδικασία της αλκοολικής ζύμωσης ή τη δράση κάποιων βακτηρίων (γαλακτικό, ηλεκτρικό, οξικό κ.ά.) (Ribereau – Gayon et al., 2006). Τόσο συνολικά, όσο και μεμονωμένα τα οργανικά οξέα συμβάλλουν στα ποιοτικά χαρακτηριστικά του οίνου, αλλά και προσδίδουν ιδιότητες, ανάλογα και με τη συγκέντρωσή τους (Πίνακας 2), που ο οινολόγος θα πρέπει να γνωρίζει για την σωστή παραγωγή, επεξεργασία και συντήρηση του προϊόντος (Κοτσερίδης & Προξενιά, 2020).

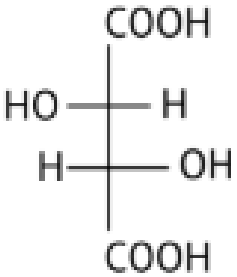
Πίνακας 2: Τα σημαντικότερα οργανικά οξέα του οίνου

Οργανικό οξύ	**Συγκέντρωση στον οίνο**
Τρυγικό οξύ	1,5-2,5 g/L
Μηλικό οξύ	1-2,5 g/L
Κιτρικό οξύ	0,0-1,0 g/L
Ασκορβικό οξύ	Κατανάλωση από ζύμες
D (-) Γαλακτικό οξύ	0,1-0,4 g/L
L (+) Γαλακτικό οξύ	3,0 g/L
Ηλεκτρικό οξύ	0,5-1 g/L
Οξικό οξύ	0,5-0,6 g/L

Τρυγικό οξύ

Το τρυγικό οξύ (Εικόνα 2) είναι το βασικότερο οξύ στο σταφύλι (7,5-15 g/L), στο γλεύκος (2-6 g/L) και στον οίνο (1,5-2,5 g/L) (Ribereau – Gayon et al., 2006). Η άμπελος είναι το μόνο φυτό που μπορεί να το αποθηκεύσει στα πράσινα μέρη του (φύλλα, πράσινες ράγες), ενώ είναι αρκετά ανθεκτικό στις βακτηριακές προσβολές. Ανάλογα με την συγκέντρωση που βρίσκονται στον οίνο, το τρυγικό οξύ και τα κατιόντα καλίου, διαμορφώνεται το pH. Επομένως, αν ασκηθεί αυξημένη πίεση στα σταφύλια, θα μειωθεί η συγκέντρωση του τρυγικού, με παράλληλη αύξηση των κατιόντων καλίου (K^+) και άρα αύξηση του pH του γλεύκους και μετέπειτα του οίνου (Καλλίθρακα, 2021).

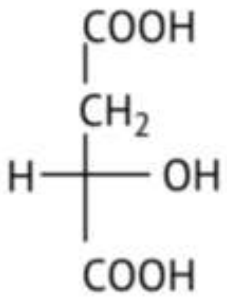
Γενικά, η συγκέντρωση στην οποία βρίσκεται το τρυγικό οξύ σε έναν οίνο επηρεάζεται από· την ποικιλία αμπέλου, τις καιρικές συνθήκες, το έδαφος, τον αλκοολικό τίτλο, τη θερμοκρασία, τη συγκέντρωση σε ανόργανα ανιόντα και τη περιεκτικότητα σε μηλικό οξύ (Καλλίθρακα, 2021). Εκτός από την συγκέντρωση του τρυγικού οξέος, σημαντική είναι και η σταθερότητα του μέσα στον οίνο. Η αστάθεια, και κατά συνέπεια η εμφάνιση τρυγικών αλάτων, εμφανίζεται όταν οι συγκεντρώσεις του τρυγικού οξέος αλλά και των κατιόντων καλίου είναι μεγαλύτερες από το όριο διαλυτότητας. Η τρυγική σταθερότητα ενός οίνου εξαρτάται από· τη θερμοκρασία, το pH, τον αλκοολικό τίτλο και τις συγκεντρώσεις τρυγικού οξέος και κατιόντων καλίου (Κοτσερίδης & Καλλίθρακα, 2017). Τέλος, υπάρχει πιθανότητα να συμβεί γαλακτική ζύμωση τρυγικού οξέος, ή αλλιώς εκτροπίαση, όπου το τρυγικό οξύ θα μετατραπεί σε πυρουβικό και στη συνέχεια σε οξικό οξύ και θα απελευθερωθεί διοξείδιο του άνθρακα. Ως αποτέλεσμα, θα υπάρξει αύξηση του pH, της πτητικής οξύτητας που θα οδηγήσει στην απώλεια οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του οίνου (Καλλίθρακα, 2021).



Εικόνα 2: Τρυγικό οξύ (Ribereau – Gayon et al., 2006)

Μηλικό οξύ

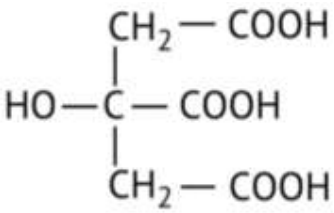
Το μηλικό οξύ (Εικόνα 3) βρίσκεται σε όλους τους οργανισμούς με τη μορφή το L – μηλικό. Στο σταφύλι ανέρχεται σε τιμές έως και 20-25 g/L, κυρίως λίγο πριν το περκασμό (Ribereau – Gayon et al., 2006). Την περίοδο της ωρίμανσης η συγκέντρωση μειώνεται στα 2-4 g/L. Η παρουσία του μηλικού οξέος στο σταφύλι και μετέπειτα στο γλεύκος εξαρτάται άμεσα από τη θερμοκρασία. Σε χαμηλές θερμοκρασίες μειώνεται η διαδικασία καύσης του μηλικού οξέος, άρα αυξάνεται η συγκέντρωση του. Στην αλκοολική ζύμωση παρατηρείται μείωση του μηλικού, της τάξεως 10-25%, ενώ η ύπαρξη γαλακτικών βακτηρίων μπορεί να οδηγήσει σε μηλογαλακτική ζύμωση (ΜΛΖ), τη μετατροπή του L – μηλικού σε L – γαλακτικό. Η ΜΛΖ προσφέρει σταθερότητα στον οίνο, ειδικά για ερυθρούς προς παλαίωση αλλά και με υψηλή οξύτητα, όμως η παρουσία του μηλικού σε μικρές συγκεντρώσεις αποτελεί θετικό στοιχείο ποιότητας (Καλλίθρακα, 2021).



Εικόνα 3: Μηλικό οξύ (Ribereau – Gayon et al., 2006)

Κιτρικό οξύ

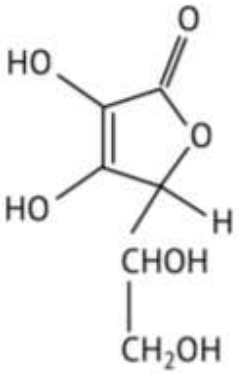
Το κιτρικό οξύ (Εικόνα 4) είναι αρκετά διαδεδομένο στη φύση, ενώ έχει σημαντικό ρόλο σε διάφορα βιοχημικά και μεταβολικά «μονοπάτια» (κύκλος του Krebs). Στο σταφύλι, απαντάται κυρίως στο φλοιό και σε μικρές ποσότητες (0,3-1 g/L) (Ribereau – Gayon et al., 2006). Η αύξηση της συγκέντρωσής του είναι ένδειξη προσβολής των σταφυλιών από βοτρύτη. Επιπλέον, περαιτέρω αύξηση στην πτητική οξύτητα ενός οίνου μπορεί να δημιουργήσει η διάσπαση του κιτρικού οξέος σε οξικό οξύ από τα γαλακτικά βακτήρια στη διάρκεια της μηλογαλακτικής ζύμωσης (Καλλίθρακα, 2021).



Εικόνα 4: Κιτρικό οξύ (Ribereau – Gayon et al., 2006)

Ασκορβικό οξύ

Το ασκορβικό οξύ (Εικόνα 5) εμπεριέχεται μόνο στο γλεύκος (50-100 mg/L) διότι καταναλώνεται από τους ζυμομύκητες. Το ασκορβικό οξύ προστίθενται σε έναν οίνο, συνήθως, πριν από την εμφιάλωση και δρα ως αντιοξειδωτικό, εμποδίζοντας την οξείδωση του δισθενή σε τρισθενή σιδήρου και την οξείδωση των αρωματικών και φαινολικών συστατικών (Καλλίθρακα, 2021).



Εικόνα 5: Ασκορβικό οξύ (Ribereau – Gayon et al., 2006)

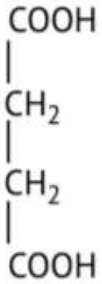
Γαλακτικό οξύ

Το γαλακτικό οξύ (Εικόνα 6) υπάρχει μόνο στους οίνους με δύο ισομερή. Το D(-) γαλακτικό προέρχεται από την αλκοολική ζύμωση, σε συγκεντρώσεις 0,1-0,4 g/L, ενώ το L(+) γαλακτικό προέρχεται από την μηλογαλακτική ζύμωση σε συγκεντρώσεις έως 3 g/L. Η συνεχής αύξηση των δύο ισομερών στον οίνο και κυρίως του D(-), υποδηλώνει προσβολή των ζαχάρων, του τρυγικού οξέος αλλά και της γλυκερίνης από γαλακτικά βακτήρια (Καλλίθρακα, 2021).

Εικόνα 6: Ισομερή γαλακτικού οξέος (Ribereau – Gayon et al., 2006)

Ηλεκτρικό οξύ

Το ηλεκτρικό οξύ (Εικόνα 7) υπάρχει μόνο στους οίνους και αποτελεί ένδειξη πως έχει ξεκινήσει η αλκοολική ζύμωση, αφού αποτελεί ένα από τα προϊόντα της. Βρίσκεται σε συγκεντρώσεις 0,5-1 g/L ενώ προσφέρει μια πικρή και αλμυρή αίσθηση για γευστικό προφίλ του οίνου (Ribereau – Gayon et al., 2006).

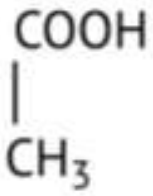


Εικόνα 7: Ηλεκτρικό οξύ (Ribereau – Gayon et al., 2006)

Οξικό οξύ

Το οξικό οξύ (Εικόνα 8) ανήκει στην κατηγορία των οξέων της αλειφατικής σειράς με μικρό αριθμό ατόμων άνθρακα, όπως το μυρμηγκικό το βουτυρικό και το προπιονικό, δρώντας δυσμενώς στον οργανοληπτικό χαρακτήρα και στην ποιότητα του οίνου (Ribereau – Gayon et al., 2006). Στον οίνο, το οξικό οξύ μπορεί να έχει κανονική προέλευση, από την αλκοολική και μηλογαλακτική ζύμωση, σε συγκεντρώσεις έως 0,5 g/L, αλλά και ανεπιθύμητη, από την ενζυμική οξείδωση της αλκοόλης από οξικά βακτήρια ή/και από χημική οξείδωση της αλκοόλης παρουσία οξυγόνου. Η παραγωγή του οξικού οξέος γίνεται στην αρχή της αλκοολικής ζύμωσης, ακολουθεί ένα μέγιστο και στη συνέχεια ελαττώνεται. (Καλλίθρακα, 2021). Το οξικό οξύ, και τα υπόλοιπα

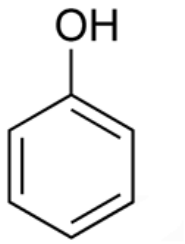
οξέα που βρίσκονται στην ίδια σειρά, αποτελούν την πτητική οξύτητα του οίνου και απαντώνται σε αυτόν ελεύθερα ή/και ως άλατα. Το οξικό οξύ απαρτίζει το 90-95% της πτητικής οξύτητας, ενώ η συγκέντρωσή του σε έναν οίνο αποτελεί ένδειξη υγιεινής και για τις συνθήκες οινοποίησης και διατήρησής του. Επομένως, η πτητική οξύτητα των οίνων εκφράζεται σε γραμμάρια οξικού οξέος ανά λίτρο ($g_{\text{οξικού οξ.}}$/L), παρόλο που ο επίσημος τρόπος έκφρασης της είναι σε χιλιοστόγραμμοϊσοδύναμα ανά λίτρο (meq/L) (Κοτσερίδης & Προξενιά, 2020).



Εικόνα 8: Οξικό οξύ (Ribereau – Gayon et al., 2006)

2.4. Φαινολικές ενώσεις

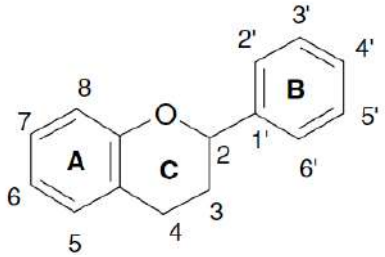
Φαινολικές ενώσεις καλούνται οι ενώσεις (Εικόνα 9) οι οποίες αποτελούνται από έναν αρωματικό δακτύλιο, ο οποίος φέρει ένα ή και περισσότερους υδροξυλικούς υποκαταστάτες, και διακρίνονται σε απλά φαινολικά μόρια ή σε πολυμερισμένες ενώσεις (Balasundram et al., 2006). Διαδραματίζουν έναν σημαντικό ρόλο διότι φαίνεται πως συνδέονται αρκετά με την ποιότητα του οίνου, δηλαδή με τη γεύση, προσφέροντας την αίσθηση της στυπτικότητας (ταννίνες) , με το χρώμα (ανθοκυάνες), μόνο των ερυθρών οίνων, με το άρωμα (πτητικές φαινόλες) και φυσικά τέλος με την αντιοξειδωτική και αντιβακτηριακή τους δράση (Jakabova et al., 2021). Ο διαχωρισμός των φαινολικών ενώσεων βασίζεται στη χημική δομή που έχουν, και χωρίζονται σε δύο κατηγορίες· τις φλαβονοειδείς και τις μη φλαβονοειδείς ενώσεις.



Εικόνα 9: Φαινόλη

2.4.1. Φλαβονοειδείς φαινολικές ενώσεις

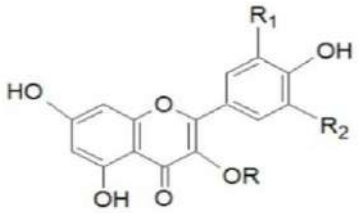
Οι φλαβονοειδείς φαινολικές ενώσεις (Εικόνα 10) περιλαμβάνουν όλες τις ενώσεις οι οποίες φέρουν την αλληλουχία $C_6 – C_3 – C_6$, δηλαδή δύο βενζολικούς δακτυλίους (A & B) οι οποίοι συνδέονται με έναν ετεροκυκλικό δακτύλιο πυρυλίου (C) (Balasundram et al. 2006). Η κατηγοριοποίηση των φλαβονοειδών φαινολικών ενώσεων γίνεται με βάση τον C-δακτύλιο και την οξειδωτική κατάσταση στην οποία βρίσκεται, και χωρίζονται στις φλαβονόλες, φλαβανόνες, φλαβανόλες, ταννίνες, ανθοκυάνες κ.ά. (Moreno-Arribas & Polo,2009). Οι ερυθροί οίνοι έχουν μεγαλύτερη συγκεντρώσεις σε φλαβανοειδή συστατικά συγκριτικά με τους λευκούς, που μπορούν να κυμανθούν μέχρι τα 4000 mg/L (Arnous et al., 2001).



Εικόνα 10: Μορφή φλαβονοειδών ενώσεων (Balasundram et al. 2006)

<u>Φλαβονόλες</u>

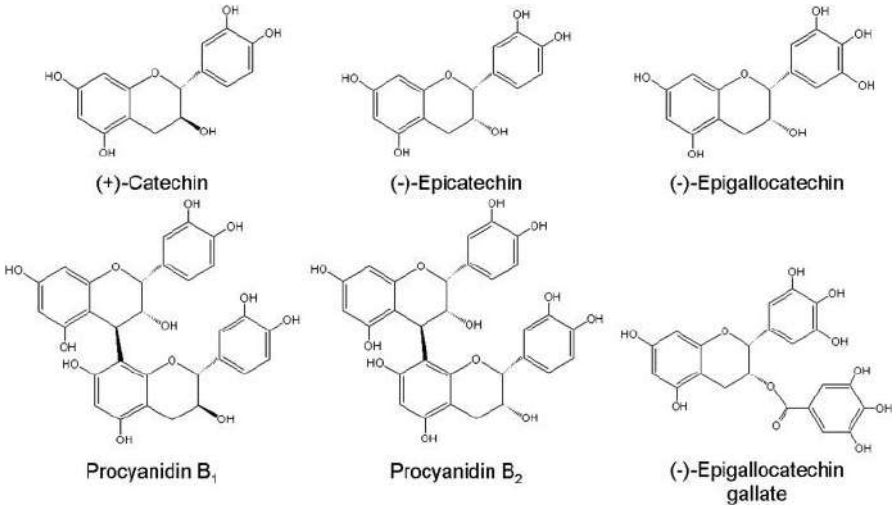
Οι φλαβονόλες του σταφυλιού προέρχονται από το φλοιό και τα φύλλα, ενώ υπάρχουν και αρκετές που έχουν εντοπιστεί στη σάρκα, και ο ρόλος τους είναι η προστασία του καρπού από την έκθεσή του σε UV ακτινοβολία (Pereira et al., 2006). Διαθέτουν έναν 3–υδροξυ-υποκαταστάτη (Εικόνα 11), έχουν κίτρινο χρώμα και η συγκέντρωσή τους κυμαίνεται 1-100 mg/L, σε λευκούς και ερυθρούς αντίστοιχα (Ribereau – Gayon et al., 2006).



Εικόνα 11: Φλαβονόλη (Ribereau – Gayon et al., 2006)

Φλαβανόλες

Οι φλαβανόλες οι οποίες υπάρχουν στο σταφύλι, και είναι γνωστές με την ονομασία φλαβαν-3-όλες, εμφανίζουν υδροξυλομάδα στη θέση 3 του C δακτυλίου. Σε αυτές περιλαμβάνονται μονομερή, ολιγομερή και πολυμερή (Εικόνα 12). Τα κυριότερα μονομερή των φλαβανολών είναι η (+)-κατεχίνη, η (-)-επικατεχίνη (το ισομερές της κατεχίνης) και ο (-)-3-γαλλικός εστέρας της επικατεχίνης (Ribereau – Gayon et al., 2006). Η κατεχίνη και η επικατεχίνη φαίνεται ότι είναι τα μονομερή φλαβονοειδή που εμφανίζονται σε υψηλότερη συγκέντρωση στον οίνο συγκριτικά με όλα τα υπόλοιπα, ενώ έχει παρατηρηθεί πως αυξάνονται κατά την AZ (Kallithraka et al., 2006, Di Lecce et al., 2013). Στην κατηγορία των πολυμερών ανήκουν οι προανθοκυανίδες, που απαρτίζονται από μονομερή των φλαβανολών, συνδεδεμένα με 4-8 ή 4-6 δεσμούς (Fujimaki et al., 2018). Οι προανθοκυανίδες προέρχονται από τα γίγαρτα και από το φλοιό των σταφυλιών. Κατά την ερυθρή οινοποίηση, οι προανθοκυανιδίνες εκχυλίζονται με τη μορφή προκυανιδών και προδελφινιδών, και στη συνέχεια αποσυντίθονται σε κυανιδίνη και δελφινιδίνη αντίστοιχα, σταθεροποιώντας το χρώμα του οίνου (Singleton & Trousdale, 1992).



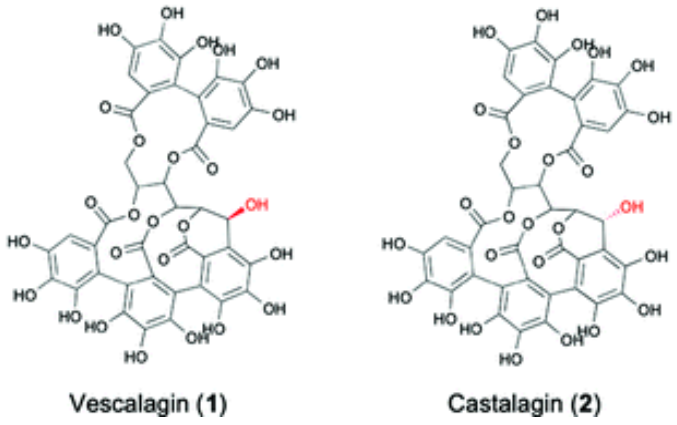
Εικόνα 12: Φλαβανόλες (Ribereau – Gayon et al., 2006)

Ταννίνες

Ταννίνες είναι φαινολικές ενώσεις όπου κατά κύριο λόγο στοχεύουν στη δημιουργία σταθερών συμπλόκων κυρίως με πρωτεΐνες αλλά και πιθανώς με πολυσακχαρίτες. Η ένωσή τους με της γλυκοπρωτεΐνες του σάλιου τους δίνει την ικανότητα να τις καταβυθίζουν, και να επηρεάζουν το οργανοληπτικό προφίλ των ερυθρών, κυρίως,

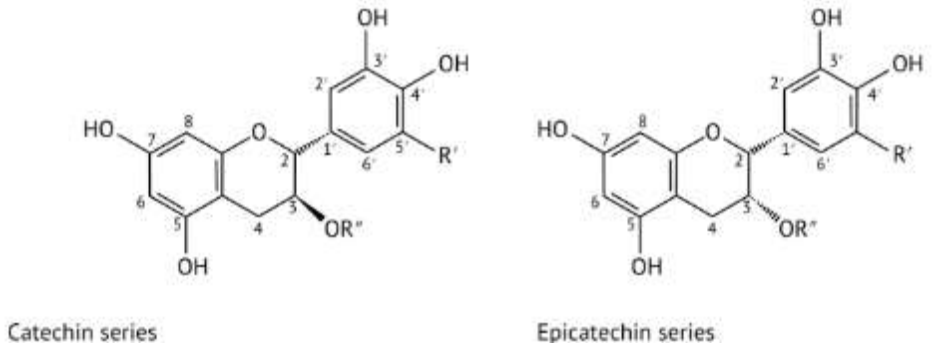
οίνων, προσφέροντας στον καταναλωτή την αίσθηση της στυπτικότητας (Ribereau – Gayon et al., 2006). Άλλες δράσεις των ταννινών στον οίνο, είναι η αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή ικανότητα που μπορούν να του προσφέρουν, με την άμεση οξείδωση των ίδιων και την καταβύθιση τους, ενώ μπορούν παράλληλα να προστατεύουν και τα συστατικά του αρώματος (Καλλίθρακα, 2021). Τέλος, οι ταννίνες μπορούν να βοηθήσουν στην σταθεροποίηση του χρώματος, μέσω των συμπλοκών που δημιουργούν με τις ανθοκυάνες (A-T & T-A) του οίνου (Ribereau – Gayon et al., 2006). Οι ταννίνες διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, τις υδρολυόμενες και τις συμπυκνωμένες ταννίνες.

Η χημική δομή τον υδρολυόμενων ταννινών περιλαμβάνει ένα μόριο σακχάρου (μονοσακχαρίτης ή πολυσακχαρίτης), ενωμένο με είτε γαλλικό οξύ (γαλλοταννίνη) είτε με ελλαγικό οξύ (ελλαγικές ταννίνες). Το κοινό χαρακτηριστικό όλων των υδρολυόμενων ταννινών είναι η ύπαρξη πολλών ομάδων του υδροξυλίου (-OH). Οι συγκεκριμένες ταννίνες δεν παράγονται στο σταφύλι, αλλά εκχυλίζονται στον οίνο μέσου του ξύλου δρυός των βαρελιών (Ribereau – Gayon et al., 2006). Οι κυριότερες ελλαγικές ταννίνες είναι βεσκαλαγίνη και η κασταλαγίνη, όπου είναι διαλυτές στο νερό και εξαιρετικά διαλυτές σε αλκοολικά διαλύματα (Εικόνα 13). Οι ελλαγικές ταννίνες είναι πιο στυφές συγκριτικά με τις γαλλικές, οι οποίες δίνουν μια πιο πικρή και όξινη εντύπωση στη γεύση (Κοτσερίδης, 2022). Τέλος, οι οινολογικές ταννίνες που χρησιμεύουν στην αποδοτικότερη διαύγαση ενός οίνου, με διάφορες μορφές, ανήκουν στην κατηγορία των υδρολυόμενων ταννινών (Ribereau – Gayon et al., 2006).



Εικόνα 13: Βεσκαλαγίνη & Κασταλαγίνη

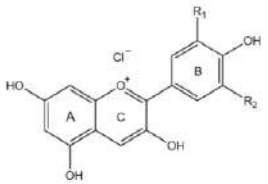
Οι συμπυκνωμένες ταννίνες που υπάρχουν στα σταφύλια και στον οίνο είναι πολυμερή των φλαβαν-3-ολών, με βασικές δομικές μονάδες την (+)-κατεχίνη και την (-)-επικατεχίνη (Εικόνα 14). Ο βαθμός πολυμερισμού των ταννινών αποτελεί και το κριτήριο κατηγοριοποίησης του σε τρεις κατηγορίες, τις ταννίνες που εμπεριέχονται στο φλοιό των ραγών, τις ταννίνες που προέρχονται από τους βόστρυχες κι τις ταννίνες που προέρχονται από τα γίγαρτα (Ribereau – Gayon et al., 2006). Οι διαφορές των ταννινών που προέρχονται από τα γίγαρτα και από τους φλοιούς είναι ότι οι πρώτες εκχυλίζονται, στον οίνο, μόνο με την μορφή προανθοκυανιδινών, έχουν μικρό βαθμό πολυμερισμού (mDP 10) και μεγάλο ποσοστό γαλλικό οξύ (20-40%), ενώ αντίθετα οι ταννίνες που μεταφέρονται στον οίνο μέσω της εκχύλισης από το φλοιό, εκτός από τη μορφή των προανθοκυανιδινών υπάρχουν και με τη μορφή των προδελφινιδινών, έχουν μεγάλο βαθμό πολυμερισμού (mDP 30) και αντίστοιχα μικρό ποσοστό γαλλικού οξέος (3-10%). Επιπλέον, κατά την ερυθρή οινοποίηση, πρώτη εκχυλίζεται η κατεχίνη από τους φλοιούς (μονομοριακή), στη συνέχεια οι κατεχίνες και οι προκυανιδίνες από τα γίγαρτα, ενώ η εκχύλιση των προκυανιδινών από τους φλοιούς παρεμποδίζεται (Καλλίθρακα, 2021). Οι ταννίνες που προέρχονται από τα γίγαρτα προκαλούν την αίσθηση του πικρού, ενώ αυτές που προέρχονται από τους φλοιούς προκαλούν την στυπτικότητα στον οίνο. Ταννίνες υπάρχουν και στους λευκούς (100 mg/L) και στους ερυθρούς οίνους (1-4 g/L) (Ribereau – Gayon et al., 2006). Τέλος, έρευνα των Kyraleou et al.(2017) έδειξε πως η έλλειψη νερού κατά την περίοδο ανάπτυξης των ερυθρών σταφυλιών αύξησε τη συγκέντρωση των ταννινών των φλοιών και μείωσε εκείνων των γιγάρτων.



Εικόνα 14: Συμπυκνωμένες ταννίνες (Ribereau – Gayon et al., 2006)

Ανθοκυανιδίνες & Ανθοκυάνες

Οι ανθοκυάνες είναι οι ενώσεις που παράγονται με τη σταθεροποίηση του μορίου των ανθοκυανιδών (C_6-C_3- C_6) με γλυκόζη (3-μονογλυκοζίτης). Βρίσκονται κυρίως στους φλοιούς των ερυθρών σταφυλιών, και εκχυλίζονται κατά την οινοποίηση προσδίδοντας το χρώμα στους οίνους (Ribereau – Gayon et al., 2006). Η χημική δομή των ανθοκυανών αποτελείται από ένα κατιόν φλαβυλίου, που αποτελείται από δύο βενζολικούς δακτυλίους (A και B), ενωμένοι με έναν ετεροκυκλικό δακτύλιο πυριλίου (C) (Εικόνα 15). Ο δακτύλιος A έχει πάντα δύο ομάδες υδροξυλίου (5,7), ενώ ο B μία (4`). Οι βασικές ανθοκυανιδίνες που υπάρχουν στα σταφύλια και στον οίνο, και έχει επιβεβαιωθεί επιστημονικά η ύπαρξή τους, είναι η κυανιδίνη, η δελφινιδίνη, η παιονιδίνη, η πετουνιδίνη και η μαλβιδίνη (Καλλίθρακα, 2021). Κυρίαρχη ένωση είναι η μαλβιδίνη σε ποσοστό 50-90%, ενώ θεωρείται υπεύθυνη για το έντονο κόκκινο χρώμα των ερυθρών σταφυλιών (Κοτσερίδης & Καλλίθρακα, 2017). Η συγκέντρωσή τους διαφέρει μεταξύ των ερυθρών οινοποιήσιμων ποικιλιών, με άλλες να εμφανίζουν υψηλά ποσοστά ολικών ανθοκυανών και άλλες χαμηλά (Kallithraka et al.,2006). Η χημική μορφή πού μπορούν να βρεθούν μέσα στον οίνο διαμορφώνεται ανάλογα με το pH. Αναλυτικότερα, όταν το pH<2, τότε το κατιόν του φλαβυλίου με ερυθρό χρώμα είναι η επικρατέστερη μορφή και συμβάλλει στις μωβ και ερυθρές αποχρώσεις του οίνου. Σε pH = 2-4, κυριαρχεί η άνυδρη βάση της κινόνης με μπλε χρώμα, ενώ σε pH>5 επικρατούν άχρωμες βάσεις. Στον οίνο υπάρχουν και οι τέσσερεις δομικές μορφές των ανθοκυανών, δηλαδή τα κατιόντα φλαβυλίου με ερυθρό χρώμα, οι άνυδρες βάσεις χρώματος ιώδους, οι άχρωμες ψευδοβάσεις και οι χαλκόνες, ισορροπώντας και δίνοντας το τελικό χρώμα του οίνου. Τέλος, στους οίνους που προέρχονται από σταφύλια Vitis vinifera, έχουν εντοπιστεί ακυλιωμένες μορφές ανθοκυανών οι οποίες θα στερεοποιούνται είτε με p-κουμαρικό είτε με καφεϊκό οξύ (Κοτσερίδης & Καλλίθρακα, 2017).



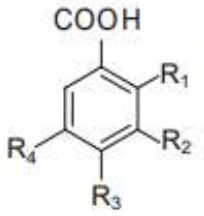
Εικόνα 15: Χημική δομή ανθοκυανών (Ribereau – Gayon et al., 2006)

2.4.2. Μη φλαβανοειδείς φαινολικές ενώσεις

Στις μη φλαβανοειδείς φαινολικές ενώσεις ανήκουν όλες οι ενώσεις που δεν κατατάσσονται σε καμία από τις προαναφερόμενες κατηγορίες φαινολικών ενώσεων (Καλλίθρακα, 2021). Η παρουσία τους στον οίνο οφείλεται κυρίως από την εκχύλιση τους από το βαρέλι που χρησιμοποιήθηκε, ενώ ένα μικρό ποσοστό μπορεί να προέλθει από το ίδιο το σταφύλι (φλοιός & σάρκα) (Ribereau – Gayon et al., 2006). Δύο είναι κατηγορίες των μη φλαβονοειδών φαινολών που μπορούν να βρεθούν στον οίνο, τα φαινολικά οξέα, κυρίως τα βενζοϊκά και υδροξυκινναμωμικά οξέα, και τα στιλβένια (Καλλίθρακα, 2021).

<u>Φαινολικά οξέα</u>

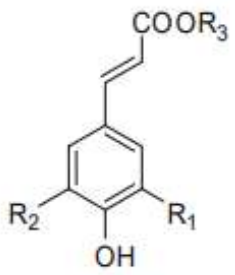
Τα βενζοϊκά οξέα ή αλλιώς υδροξυβενζοϊκά (HBA) έχουν χημική δομή C_6-C_1 (Εικόνα 16). Η συγκέντρωσή τους στον οίνο επηρεάζεται ανάλογα την ποικιλία αλλά και από τις συνθήκες ανάπτυξης του σταφυλιού (Moreno-Arribas & Polo,2009). Η μορφή που έχουν αλλάζει στη διάρκεια του χρόνου και το προϊόν, δηλαδή στα σταφύλια και στο γλεύκος τα βενζοϊκά οξέα έχουν τη μορφή εστέρων με φλαβανόλες ή/και σάκχαρα, ενώ κατά την περίοδό της ωρίμανσης και παλαίωσης του οίνου βρίσκονται ελεύθερα. Το γαλλικό οξύ είναι το πιο γνωστό της κατηγορίας των βενζοϊκών οξέων (Ribereau – Gayon et al., 2006).



Εικόνα 16: Βενζοϊκό οξύ (Moreno-Arribas & Polo,2009)

Τα υδροξυκινναμωμικά οξέα (HCA) έχουν δομική μορφή C_6-C_3 (Εικόνα 17). Στη συγκεκριμένη ομάδα ανήκουν διάφορα φαινολικά οξέα όπως το καφεϊκό, το p-κουμαρικό, κ.ά., τα οποία χωρίζονται σε δύο υποκατηγορίες, τα cis- και trans-, με τη δεύτερη κατηγορία να έχει πιο σταθερή μορφή και άρα να έχει και τα περισσότερα

επικρατέστερα οξέα (Moreno-Arribas & Polo, 2009). Σχετικά με τη μορφή που υπάρχουν τα υδροξυκινναμωμικά οξέα, στα σταφύλια και στο γλεύκος έχουν την μορφή εστέρων με τρυγικό οξύ ενώ στον οίνο μπορούν να βρεθούν και με ελεύθερη μορφή (Ribereau – Gayon et al., 2006).



Εικόνα 17: Υδροξυκινναμωμικό οξύ (Moreno-Arribas & Polo,2009).

Στιλβένια

Οι ενώσεις του στιλβενίου ανήκουν σε μια μεγάλη ομάδα φυσικών αμυντικών πολυφαινολών που υπάρχουν σε πολλά είδη φυτών. Η πιο γνωστή είναι η ρεσβερατρόλη (3,5,4'-τριυδροξυστιλβένιο), η οποία εντοπίζεται κυρίως στον φλοιό των σταφυλιών (Reinisalo, 2015). Το φυτό της αμπέλου τα βιοσυνθέτει έπειτα από έντονο στρες, όπως είναι η μικροβιακή μόλυνση και η υπεριώδης ακτινοβολία (UV). Στη συνέχεια, αυτά μεταφέρονται στο γλεύκος ή/και στον οίνο, και εξαιτίας της αντιοξειδωτικής, αντικαρκινογόνου και αντιμεταλλαξιογόνου δράσης τους, έχουν προσεγγίσει μεγάλο επιστημονικό ενδιαφέρον (Moreno-Arribas & Polo,2009). Οι Bendouguerra et al. (2021), αναλύοντας τη συγκέντρωση των στιλβενίων σε σταφύλια και οίνο, παρατήρησαν πώς βρίσκονται σε μικρές συγκεντρώσεις (0,5-10 mg/L), μόνο σε ερυθρούς οίνους και φέρουν πληθώρα ευεργετικών ιδιοτήτων για τον ανθρώπινο οργανισμό. Όμως, υπάρχει ένα πρόβλημα, εξαιτίας της χαμηλής τους συγκέντρωσης, θα πρέπει να καταναλώνεται μεγάλη ποσότητα σταφυλιών ή οίνων αντίστοιχα, προκειμένου να προσληφθούν οι απαραίτητες ποσότητες για τον άνθρωπο.

2.5. Αζωτούχες ενώσεις

Τη χημική σύσταση του γλεύκους ή/και του οίνου συμπληρώνουν αζωτούχες ενώσεις, οι οποίες χωρίζονται σε 2 βασικές κατηγορίες, τις οργανικές και τις ανόργανες. Συνήθως βρίσκονται σε συγκεντρώσεις 0,5-4 g/L και κύρια πηγή τους είναι το σταφύλι. Αποτελούν το 20% του ξηρού υπολείμματος, εκ των οποίων το 16% είναι καθαρό άζωτο (N_2). Το 5% των αζωτούχων ενώσεων είναι ανόργανες και το 95% οργανικές (Ribereau – Gayon et al., 2006). Οι οργανικές αζωτούχες ενώσεις αποτελούνται από τα αμινοξέα, τα ολιγοπεπτίδια (γλουταθειόνη), τις πρωτεΐνες, τις βιογενείς αμίνες και κάποιες άλλες ενώσεις όπως οι πυραζίνες και η ουρία (Moreno-Arribas & Polo,2009).

<u>Ανόργανες αζωτούχες ενώσεις</u>

Οι ανόργανες αζωτούχες ενώσεις στο σταφύλι υπάρχουν ως αμμωνιακά άλατα ($(NH_4)_3PO_4$). Κατά την περίοδο του περκασμού, τα αμμωνιακά άλατα αποτελούν το 80% του αζώτου του σταφυλιού, προερχόμενο από το έδαφος. Στην ωρίμανση μειώνονται δραματικά σε ποσοστό 10% του συνολικού αζώτου, εξαιτίας της δράσης των τρανσαμινασών και της σύνθεσης οργανικών ενώσεων. Το κατιόν αμμωνίου (NH_4^+) αποτελεί τη μορφή του αζώτου που αφομοιώνεται περισσότερο από τις ζύμες ενώ εξαφανίζεται με την ολοκληρωση της αλκοολικής ζύμωσης (Καλλίθρακα, 2021).

<u>Οργανικές αζωτούχες ενώσεις</u>

<u>Αμινοξέα</u>

Σχεδόν 20 ελεύθερα αμινοξέα έχουν εντοπιστεί στο γλεύκος, αντιπροσωπεύοντας το 28-39% του συνολικού αζώτου, ανεξαρτήτως εάν το γλεύκος προέρχεται από λευκά ή κόκκινα σταφύλια. Στην ωρίμαση τα αμινοξέα μπορούν να φτάσουν και το 90% του συνολικού αζώτου, ενώ την περίοδο του τρύγου, το 70% του οργανικού αζώτου προέρχεται από τα αμινοξέα, το 3% από τις πρωτεΐνες και το 2% από τα πεπτίδια (Moreno-Arribas & Polo,2009). Η συνήθης ποσότητα όπου βρίσκονται στο γλεύκος ή/και στον οίνο είναι 1-4 g/L, ενώ στους οίνους φαίνεται ότι υπάρχουν μόνο τα L-

αμινοξέα (Καλλίθρακα, 2021). Φαίνεται πως η παρουσία των αμινοξέων στον οίνο ενισχύει το αρωματικό προφίλ του, διότι μπορούν να συνθέσουν διάφορες αρωματικές ενώσεις (Ribereau – Gayon et al., 2006). Τα σημαντικότερα αμινοξέα είναι: η αλανίνη, η σερίνη, η αργινίνη, η προλίνη, το γλουταμινικό οξύ και η γλουταμίνη. Η φαινυλαλανίνη, η τυροσίνη και η τρυπτοφάνη έχουν δείξει αρκετές μελέτες, πώς ασκούν ευεργετική επίδραση στην ποιότητα του οίνου (Καλλίθρακα, 2021).

Ολιγοπεπτίδια

Τα πεπτίδια, που υπάρχουν στον οίνο και στο γλεύκος, δεν έχουν ερευνηθεί και κατανοηθεί πλήρως από τους επιστήμονες. Προκύπτουν από την ένωση έως και 4 αμινοξέων και έχουν μοριακό βάρος μικρότερο των 10.000 (Moreno-Arribas & Polo,2009). Η γλουταθειόνη, η οποία είναι τριπεπτίδιο και υπάρχει στα γλεύκη, σε μικρές ποσότητες, φαίνεται ότι δρα σαν αντιοξειδωτικό και προστατεύει από το καφέτιασμα, κυρίως των λευκών οίνων (Καλλίθρακα, 2021).

Πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες που παράγονται στο σταφύλι αλλά και εκείνες που υπάρχουν στον οίνο φαίνεται πως έχουν μεγάλο επιστημονικό ενδιαφέρον, λόγω των προβλημάτων που προκαλούν. Εκτός όμως από τα προβλήματα που προκαλούν, αρκετές μελέτες έχουν δείξει πώς επηρεάζουν το οργανοληπτικό προφίλ των οίνων (Jones et al. 2008), τη διατήρηση των φυσαλίδων στα αφρώδη (Liger-Belair 2005) αλλά και ο συνυπεύθυνες και διάφορες αλλεργίες που προκύπτουν με την κατανάλωση οίνου (Vassilopoulou et al. 2007). Το σταφύλι αποτελεί την κύρια πηγή πρωτεϊνών για τον οίνο, ενώ ένα μικρό ποσοστό προέρχεται από τις ζύμες (Moreno-Arribas & Polo,2009).

Οι πρωτεΐνες οι οποίες υπάρχουν στο σταφύλι είναι κυρίως μικρού μοριακού βάρους (Μ.Β. 12.000-35.000 Da). Το μεγαλύτερο ποσοστό των διαλυτών πρωτεϊνών είναι χιτινάσες και θαυματίνες, οι οποίες αποτελούν αμυντικό μηχανισμό του φυτού στην προσβολή από μύκητες. Οι χιτινάση και η β-1,3-γλυκανάση υδρολύουν την χιτίνη και την β-1,3-γλυκάνη, αντίστοιχα, που είναι συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων των μυκήτων. Οι θαυματίνες διαλυτοποιούν τις μεμβράνες των κυττάρων των μυκήτων. Η συγκέντρωσή τους επηρεάζεται από την ποικιλία, τον τρόπο οινοποίησης και

παράγοντες που επηρεάζουν το συνολικό άζωτο του σταφυλιού. Μικρό μέρος των πρωτεϊνών χάνεται στην αλκοολική ζύμωση, εξαιτίας της δράσης των πρωτεασών των ζυμών και της καταβύθισης λόγω χαμηλού pH. Υπάρχουν όμως και πρωτεΐνες που είναι πιο ανθεκτικές στη δράση των πρωτεασών, καταφέρνοντας να παραμείνουν στον οίνο και πιθανώς να δημιουργήσουν κάποιο πρωτεϊνικό θόλωμα, κυρίως σε λευκούς, διότι στους ερυθρούς οι πρωτεΐνες καταβυθίζονται με τις ταννίνες (Καλλίθρακα, 2021).

<u>Βιογενείς αμίνες</u>

Η παρουσία των βιογενών αμινών μέσα σε έναν οίνο μπορεί να προέρχεται είτε από το είδος της ποικιλίας που ανήκει το σταφύλι, είτε από την αλκοολική ζύμωση, είτε ακόμα και από την αποθήκευση και παλαίωση. Σχηματίζονται με τη δράση του ενζύμου αποκαρβοξυλάσης, που μπορεί να υπάρχει στις ζύμες και στα βακτήρια και είναι κυρίως παραπροϊόντα της μηλογαλακτικής ζύμωσης (Moreno-Arribas & Polo,2009). Η συγκέντρωσή τους εξαρτάται κατά κύριο λόγο από τη συγκέντρωση των προδρόμων αμινοξέων, για αυτό και οι ερυθροί οίνοι περιέχουν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις συγκριτικά με τους λευκούς. Άλλοι παράγοντες που φαίνεται ότι επηρεάζουν την ύπαρξη βιογενών αμινών θεωρούνται η ποικιλία, τα εδάφη με χαμηλή συγκέντρωση καλίου αλλά και η προσθήκη πολλών αζωτούχων λιπασμάτων, τα οποία οδηγούν στην αύξηση της συγκέντρωσης των βιογενών αμινών. Φαίνεται πως η παρουσία αλλά και η ποσότητα των βιογενών αμινών, σύμφωνα με αρκετές έρευνες, συνδέεται άμεσα με διάφορες τοξικότητες αλλά και κινδύνους που μπορούν να προκαλέσουν στον ανθρώπινο οργανισμό. Συγκεκριμένα η ισταμίνη φαίνεται ότι είναι υπεύθυνη για τη διαστολή των αγγείων και υπόταση, οι νιτροζαμίνες, όπως η πουτρεσκίνη και η καδαβερίνη, μπορούν να οδηγήσουν σε προδιάθεση για καρκίνο ενώ η τυραμίνη και η φαινυλαιθυλαμίνη είναι τοξικές πάνω από κάποια συγκέντρωση (25-40 mg/L και 3 mg/L αντίστοιχα). Την πιο σωστή αντιμετώπιση των βιογενών αμινών αποτελεί η σωστή πρόληψη. Συγκεκριμένα, να υπάρχει περιορισμός των αζωτούχων λιπασμάτων στο αμπέλι, να γίνεται εμβολιασμός με στελέχη που δεν παράγουν αποκαρβοξυλάσες, να προστίθεται κατάλληλη ποσότητα θειώδη ανυδρίτη και το ένζυμο της λυσοζύμης που προκαλεί τη λύση των κυτταρικών τοιχωμάτων των βακτηρίων (Καλλίθρακα, 2021).

Άλλες αζωτούχες ενώσεις

Πυραζίνες

Οι πυραζίνες είναι ετεροκυκλικά μόρια που περιέχουν δύο άτομα αζώτου και παράγονται όταν λαμβάνει χώρα ο μεταβολισμός των αμινοξέων. Οι μεθοξυπυραζίνες φαίνεται πως διαμορφώνουν το πρωτογενές άρωμα συγκεκριμένων ποικιλιών του οίνου (Ribereau – Gayon et al., 2006). Η ποσότητά τους μειώνεται κατά την ωρίμανση των σταφυλιών, ενώ έχει αποδειχτεί ότι εκχυλίζονται άμεσα από τα σταφύλια στο γλεύκος. Έχουν βρεθεί ακόμα σε οίνους από λευκά σταφύλια, παρόλο που δεν υπάρχει επαφή φλοιού και γλεύκους, προσδίδοντας χορτώδη αρώματα (Καλλίθρακα, 2022).

Ουρία

Η ουρία παρόλο που οι συγκεντρώσεις που βρίσκεται σε οίνους είναι χαμηλές, είναι αρκετά επικίνδυνες (1mg/L). Προέρχεται από τις ζύμες, που διαθέτουν το γονίδιο να διασπούν την αργινίνη (αργινάση), η οποία είναι πρόδρομος της ουρεθάνης (εστέρας του καρβαμικού οξέως). Η ουρεθάνη είναι καρκινογόνος ουσία και η συγκέντρωσή της επηρεάζεται από την ποικιλία, τα αζωτούχα λιπάσματα, τη θερμοκρασία αλκοολικής ζύμωσης, τη διενέργεια μηλογαλακτικής ζύμωσης και αυξάνεται με την παλαίωση (Moreno-Arribas & Polo,2009, Ribereau – Gayon et al., 2006). Με σκοπό την αντιμετώπισή της υπάρχουν διάφοροι τρόποι όπως: γενετικά τροποποιημένα στελέχη ζυμών, προσθήκη ουρεάσης, έλεγχος λίπανσης και θερμοκρασίας στα μέρη όπου αποθηκεύονται οι οίνοι (Καλλίθρακα, 2021).

2.6.Πτητικές ενώσεις- Άρωμα οίνου

Το άρωμα του οίνου αποτελεί ένα συνδυασμό πολλών πτητικών ενώσεων που βρίσκονται σε αυτόν, και σε διάφορες συγκεντρώσεις. Μπορεί να υπάρχουν ενώσεις που να βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις και να μη συμμετέχουν καθόλου στο άρωμα και αντίστροφα ενώσεις σε μικρές συγκεντρώσεις που παίζουν καθοριστικό ρόλο. Επίσης, σημαντική επιρροή στο άρωμα του οίνου έχουν η ποικιλία, οι καλλιεργητικές τεχνικές στο φυτό της αμπέλου, βιοχημικά φαινόμενα κατά την οινοποίηση, η αλκοολική και μηλογαλακτική ζύμωση, χημικές αλλά και ενζυμικές αντιδράσεις, η ωρίμαση σε βαρέλι και η παλαίωση του οίνου. Για την ευκολία

διάκρισης και κατάταξης των πτητικών ενώσεων του οίνου, το άρωμα του διακρίνεται σε τρεις κατηγορίες: το πρωτογενές, το δευτερογενές και το τριτογενές (Ταραντίλης, 2021).

2.6.1. Πρωτογενές άρωμα

Στην κατηγορία του πρωτογενούς αρώματος του οίνου περιλαμβάνονται ενώσεις που περιέχονται στο σταφύλι, με τη μορφή πρόδρομων αρωματικών ενώσεων. Οι πρόδρομες αρωματικές ενώσεις είναι μη πτητικές, για αυτό και τα περισσότερα σταφύλια που προέρχονται από ποικιλίες Vitis vinfera δεν έχουν κάποιο άρωμα. Παρόλα αυτά, το πρωτογενές άρωμα θεωρείται το ποικιλιακό χαρακτηριστικό κάθε οίνου(Moreno-Arribas & Polo,2009). Η ενώσεις που απαρτίζουν το πρωτογενές άρωμα των οίνων είναι τα τερπένια, οι θειόλες και οι πυραζίνες. Τα τερπένια είναι φυσικές οργανικές ενώσεις που εμπεριέχουν 10 (μονοτερπένια-C_{10}), 15 (σεσκιτερπένια-C_{15}) και γενικά πολλαπλάσια του 5 άτομα άνθρακα, ενώ αποτελούν συστατικά των γεύσεων και αρωμάτων ποικίλων φρούτων και λουλουδιών. Τα μονοτερπένια είναι άκυκλες ενώσεις υδρογονανθράκων, αλκοολών, οξέων και εστέρων, και ονομάζονται ανάλογα σε ποιο φυτό ή φρούτο ανιχνεύονται, όπως οι γερανιόλη, από το γεράνι, το λιμονένιο, από το λεμόνι και άλλα εσπεριδοειδή και η μενθόλη από τη μέντα (Ταραντίλης, 2021). Γενικότερα, τα μονοτερπένια απελευθερώνουν αρώματα ανθικά και εσπεριδοειδή με έντονη την αίσθηση της φρεσκάδας. Έπειτα από τη διέλευση κάποιου χρονικού διαστήματος και κατά συνέπεια την εκκίνηση της παλαίωσης του οίνου, το άρωμα των μονοτερπενίων μεταβάλλεται. Συγκεκριμένα, οξειδώνονται πρώτα σε ενώσεις με πολλά άτομα άνθρακα, τα καροτενοειδή, και στη συνέχεια αποικοδομούνται σε νορισοπρενοειδή (Ribereau – Gayon et al., 2006). Στην τελευταία ομάδα ανήκει η β-δαμασκηνόνη, η οποία εκλύει αρώματα τροπικών φρούτων, έχει μικρό κατώφλι αντίληψης (3-4 mg/L) και βρίσκεται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στους ερυθρούς οίνους συγκριτικά με τους λευκούς. Οι θειόλες ή αλλιώς μερκαπτάνες, αποτελούν παράγωγα με θείο των αλκοολών με αντικατάσταση της -OH με -SH. Η 3-μερκαπτοεξανόλη και η 4-μερκαπτο-4-μεθυλοπενταν-2-όνη συμμετέχουν στο άρωμα του οίνου εκλύοντας αρώματα εσπεριδοειδών, κυρίως γκρέιπφρουτ, χωρίς όμως να είναι σε μεγάλες συγκεντρώσεις. Μπορούν να οξειδωθούν σε δισουλφίδια, προσδίδοντας μη αρεστές οσμές όπως σκόρδο και κρεμμύδι στους οίνους. Τέλος, οι πυραζίνες αποτελούν μια ομάδα πτητικών ενώσεων γνωστές για τα φυτικά αρώματα

που προσδίδουν στους οίνους. Οι πιο γνωστές είναι οι μεθοξυπυραζίνες, με έντονο το άρωμα της πράσινης πιπεριάς και του σπαραγγιού, και οι οποίες αποτελούν το ποικιλιακό χαρακτηριστικό των Sauvignon Blanc και Cabernet Sauvignon (Lacey et al., 1991).

2.6.2. Δευτερογενές άρωμα

Στο δευτερογενές άρωμα ανήκουν πτητικές ενώσεις οι οποίες παράγονται κατά τη διάρκεια, κυρίως, της ΑΖ, αλλά και της ΜΛΖ, εφόσον αυτή λάβει μέρος. Η πιο γνωστή ομάδα που χαρακτηρίζει το δευτερογενές άρωμα είναι αυτή των εστέρων, η οποία αποτελείται από δύο κατηγορίες· τους αιθυλεστέρες των πτητικών οξέων και τους οξικούς εστέρες των ανώτερων αλκοολών. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν εστέρες οι οποίοι έχουν προκύψει έπειτα από την ένωση αιθανόλης με κάποιο πτητικό οξύ, με πιο γνωστούς τον οξικό αιθυλεστέρα, ο οποίος σε συγκέντρωση >150mg/L έχει έντονο άρωμα κολλάς, το βουτυρικό αιθυλεστέρα, του οποίου το άρωμα θυμίζει τσιχλόφουσκα και φράουλα και τον εξανοϊκό αιθυλεστέρα (C_8-C_{12}) με αρώματα μήλου, ανανά και τροπικών φρούτων (Moreno-Arribas & Polo,2009). Οι οξικοί εστέρες των ανώτερων αλκοολών προκύπτουν από την ένωση οξικού οξέος με μια ανώτερη αλκοόλη, με πιο γνωστούς τον ισοαμυλικό αιθυλεστέρα, ο οποίος έχει έντονο άρωμα μπανάνας και τον οξικό φαινεθυλεστέρα, του οποίου το άρωμα θυμίζει τριαντάφυλλο και ροδόνερο. Γενικότερα, οι εστέρες σε χαμηλές συγκεντρώσεις προσδίδουν ανθικά και φρουτώδη αρώματα ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις θυμίζουν κολόνια (Παληογιάννη, 2007). Επιπλέον, εκτός από τους εστέρες, το δευτερογενές άρωμα εμπεριέχει και ανώτερες αλκοόλες, οι οποίες σε μεγάλες συγκεντρώσεις (>400 mg/L) επιδρούν αρνητικά, την ακεταλδεΰδη, η οποία έχει αρνητική οσμή οξείδωσης (σάπιο μήλο) και τις θειούχες ενώσεις (χαλασμένο αβγό) (Καλλίθρακα, 2022).

2.6.3. Τριτογενές άρωμα

Στο τριτογενές άρωμα ανήκουν ενώσεις που έχουν προκύψει μεταζυμωτικά, κατά την παραμονή στο βαρέλι και την παλαίωση στη φιάλη, και καλούνται «μπουκέτο» αρώματος. Κατά την παραμονή των οίνων στα βαρέλια και κατά συνέπεια τη μερική οξυγόνωση και οξείδωση τους, εμφανίζονται διάφορες ενώσεις όπως η φουρφουράλη, που υποδηλώνει θερμική επεξεργασία οίνου(καραμέλα), οι φαινολικές αλδεΰδες από τα βαρέλια (κιναμωμική αλδεΰδη-κανέλλα, βανιλλίνη-βανίλια) και οι κετόνες

(φουντούκι & βούτυρο) (Ribereau – Gayon et al., 2006). Επι προσθέτως, γίνεται εκχύλιση στον οίνο με λακτόνες (cis/trans- whisky lactone) που προσδίδουν ένα έντονο άρωμα καρύδας και φαινόλες (ευγενόλη, γουακόλη, κ.ά.) που θυμίζουν το άρωμα των μπαχαρικών (Κοτσερίδης, 2022).

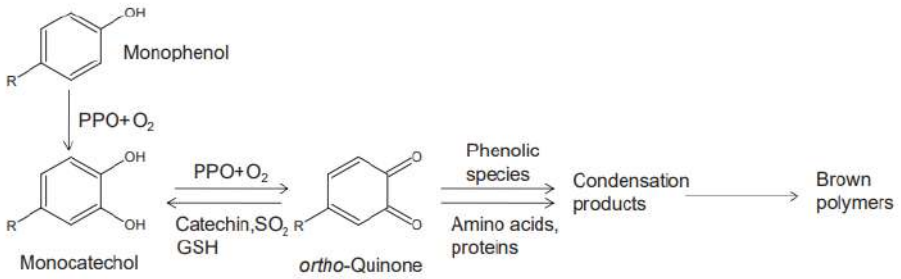
3. Οξείδωση οίνου

Η οξείδωση ενός οίνου, ανεξαρτήτου χρώματος, είναι ένα χρόνιο πρόβλημα στην οινοποίηση, το οποίο οδηγεί στην αλλοίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του τελικού προϊόντος (Voltea et al., 2022). Η διαδικασία της οξείδωσης οφείλεται στην παρουσία ποσότητας οξυγόνου μεγαλύτερης από εκείνη που οίνος μπορεί να εμπεριέχει, χωρίς να μεταβάλλονται, αρνητικά, τα διάφορα χαρακτηριστικά του. Η διαλυτότητα σε οξυγόνο ενός οίνου επηρεάζεται από το ποσοστό της αιθανόλης, των στερεών συστατικών του, τη θερμοκρασία αλλά και από την ποσότητα του οξυγόνου που έρχεται σε επαφή. Σύμφωνα με τον Singleton (1987), η μέση τιμή διαλυτότητας του οξυγόνου σε έναν οίνο κορεσμένο από αέρα, είναι περίπου 8,6 mg/L, σε κανονική θερμοκρασία και σε συγκεκριμένη ατμοσφαιρική πίεση. Στη διαδικασία της οινοποίησης, όπου το γλεύκος μετατρέπεται σε οίνο, το προϊόν εκτίθεται σε ένα σημαντικό ποσοστό οξυγόνου, καθώς οι διάφορες πρακτικές που εκτελούνται όπως έκθλιψη, πίεση, κ.ά. οδηγούν σε κορεσμό (Oliveira et al. 2011). Οι δραστικές μορφές του οξυγόνου (ROS), οι οποίες είναι υπεύθυνες για αλλοιώσεις κι άλλων τροφίμων, εκτός του οίνου, εμπεριέχουν ρίζες του οξυγόνου, όπως το ανιόν υπεροξειδίου (O_2^{*-}), το υδροξύλιο (HO^*) κ.ά., οι οποίες, στη συνέχεια, μετατρέπονται σε δραστικά παράγωγα όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και οδηγούν στην εμφάνιση οξειδωτικών αντιδράσεων (Waterhouse & Laurie, 2006). Επίσης, ο Fenton το 1894 περιέγραψε την αντίδραση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) με τον δισθενή σίδηρο (Fe^{2+}) που οδηγεί στην οξείδωση του δισθενή (Fe^{2+}) σε τρισθενής σίδηρο (Fe^{3+}) και στην απελευθέρωση ρίζας υδροξυλίου. Η κυριότερη μορφή οξείδωσης είναι εκείνη των φαινολικών συστατικών ενός οίνου που οδηγεί στην παραγωγή κινονών (Oliveira et al. 2011). Η δημιουργία των πολυμερισμένων αυτών ενώσεων προκαλεί, κυρίως, στους λευκούς οίνους έναν καφετί χρωματισμό (browning), υποβαθμίζοντας τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του. Αυτό το οξειδωτικό καφέτιασμα μπορεί να προέλθει είτε ενζυμικά (γλεύκος) είτε μη ενζυμικά-χημικά (οίνος).

Όπως προαναφέρθηκε, από τη συμπίεση και έπειτα έκθλιψη των σταφυλιών, την οινοποίηση, την ωρίμανση, την αποθήκευση και παλαίωση του οίνου, η παρουσία του οξυγόνου είναι σημαντική και κατά συνέπεια το προϊόν υφίσταται διάφορες οξειδώσεις, οι οποίες οδηγούν σε αλλοίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του. Από την άλλη μεριά όμως, υπάρχουν περιπτώσεις που είναι επιθυμητή η μικρή ποσότητα οξυγόνου, όπως οι ερυθροί οίνοι, όπου η ελεγχόμενη τεχνητή ή και φυσική εισροή οξυγόνο στον οίνο οδηγεί στη βελτίωση διαφόρων χαρακτηριστικών του, όπως η σταθεροποίηση του χρώματος και η μείωση της στυπτικότητας (Waterhouse & Laurie, 2006). Επομένως, είναι σημαντικό να γίνουν κατανοητοί οι μηχανισμοί οξείδωσης των οίνων, και τα αποτελέσματά τους σε αυτούς μέχρι το τελικό προϊόν να φτάσει στον καταναλωτή.

3.1. Ενζυμική οξείδωση

Η ενζυμική οξείδωση ή αλλιώς το ενζυμικό καφέτιασμα συμβαίνει εξ ολοκλήρου στο γλεύκος, κατά τη συμπίεση των σταφυλιών, όπου γίνεται η ενεργοποίηση των οξειδωτικών ενζύμων τα οποία στοχεύουν στην οξείδωση των φαινολικών ενώσεών του (Oliveira et al. 2011). Οι τρεις βασικές κατηγορίες ενζύμων που οδηγούν στην οξείδωση των φαινολικών συστατικών είναι οι οξειδοαναγωγάσες, που χρησιμοποιούν το οξυγόνο ως δέκτη ηλεκτρονίων, η μονοφαινολική μονοξυγενάση και οι υπεροξειδάσες. Ένας πιθανός μηχανισμός οξείδωσης των φαινολικών ενώσεων είναι υδροξυλίωση στην ορθό-θέση, δίπλα σε μια υπάρχουσα υδροξυλομάδα της φαινολικής ένωσης που θα οδηγήσει στην οξείδωση των ορθο-διυδροξυβενζολίων σε ορθο-βενζοκινόνες (Li et al., 2008) (Εικόνα 18).



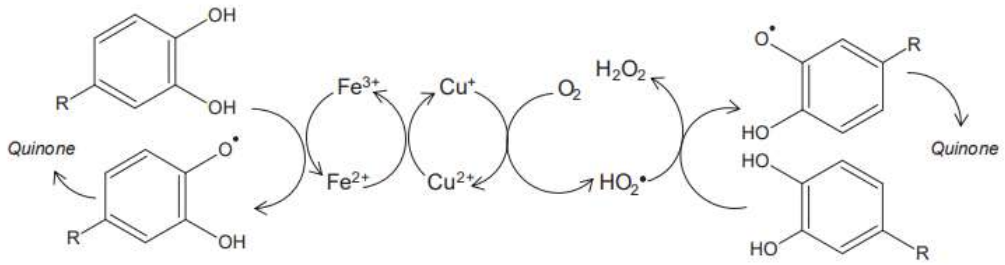
Εικόνα 18: Ο μηχανισμός οξείδωσης την ορθό-διφαινόλης (Li et al., 2008)

Στο γλεύκος των σταφυλιών η ενζυμική οξείδωση συσχετίζεται άμεσα και με τη συγκέντρωση στην οποία βρίσκονται τα υδροξυκινναμωμικά οξέα, όπως το κουταρικό οξύ, το καφταρικό οξύ και τα μονομερή των φλαβαν-3-ολών. Κατά τη σύνθλιψη, γίνεται παράλληλα απελευθέρωση πολυφαινολοοξειδασών (PPO), που ταχέως οξειδώνουν τα υδροξυκινναμωμικά οξέα σε βενζοκινόνες, οι οποίες στη συνέχεια θα υποστούν περαιτέρω αντιδράσεις (Cheynier et al., 1986). Στο σταφύλι βρίσκονται πολλά είδη πολυφαινολοοξειδασών, όπως οι κατεχόλες, οι λακκάσες, οι ορθο-αμινοφαινολοοξειδάσες και οι τυροσινάσες. Τα συγκεκριμένα ένζυμα εμφανίζουν αρκετές διαφορές μεταξύ τους, όπως ότι η λακκάση υπάρχει μόνο σε σταφύλια προσβεβλημένα από βοτρύτη, και οξειδώνει ο- και π-διφαινόλες, ενώ η κατεχόλη ο οξειδώνει μόνο ο-διφαινόλες. Το φαινολικό οξειδωτικό ένζυμο της τυροσινάσης δρα με δύο τρόπους· σαν φαινολορθοξυδολάση, όπου μία μόνο φαινόλη, με την ενσωμάτωση οξυγόνου, μετατρέπεται σε κατεχόλη, και σαν κατεχολάση, όπου η κατεχόλη οξειδώνεται σε καφέ χρωστική (Sanchez-Ferrer et al., 1995). Η αντιμετώπιση των οξειδασών (με εξαίρεση τη λακκάση) και η αποφυγή εκδήλωσης οξειδωτικού καφετιάσματος σε λευκούς οίνους, μπορεί να αποφευχθεί με την έγκαιρη προσθήκη αντιοξειδωτικών (δέσμευση κινονών). Η οξειδωτική δράση της λακκάσης αναστέλλεται με θέρμανση του γλεύκους, αλλά δεν είναι ενδεικτικός τρόπος αντιμετώπισης, λόγω υποβάθμισης παραγόμενου οίνου. Τα οξειδωτικά ένζυμα απενεργοποιούνται με την ολοκλήρωση της ζύμωσης, και επομένως οποιαδήποτε οξείδωση υπάρξει σε οίνο θα είναι μη ενζυμικής φύσεως (Oliveira et al., 2011).

3.2.Χημική οξείδωση (Μη ενζυμική)

Η χημική οξείδωση που μπορεί ένας οίνος να εμφανίσει προέρχεται κυρίως από την παρουσία πολυφαινολών που περιέχουν μια ομάδα (+)-κατεχίνης, (-)-επικατεχίνης, γαλλοκατεχίνης, γαλλικού οξέος, των εστέρων τους και του καφεϊκού οξέος, τα οποία είναι τα πιο ευάλωτα, ως προς οξείδωση, συστατικά του οίνου (Singleton, 2000). Γίνεται η διαδοχική οξείδωση των συγκεκριμένων πολυφαινολών σε ημικινόνες και βενζοκινόνες, ενώ παράλληλα το οξυγόνο ανάγεται σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (Danilewicz et al., 2008). Όλη αυτή η διαδικασία παρεμβαίνει στον κύκλο οξειδοαναγωγής των μετάλλων του Fe και του Cu (Εικόνα 19). Οι Waterhouse and Laurie (2006) εξέτασαν διάφορους μηχανισμούς με τους οποίους το οξυγόνο και τα

ενδιάμεσα αναγωγικά προϊόντα του θα μπορούσαν να οξειδώσουν τις φαινολικές ενώσεις. Κατέληξαν στο συμπέρασμα πως δεν υπάρχει άμεση σύνδεση μεταξύ του οξυγόνου και των φαινολικών συστατικών, σε περιβάλλον που απουσιάζουν τα ιόντα των μετάλλων μεταπτώσεως (Fe & Cu).



Εικόνα 19: Οξειδοαναγωγική αντίδραση των Fe και Cu για παραγωγή κινονών (Danilewicz et al., 2008).

Οι κινόνες που προκύπτουν από πολυφαινόλες που έχουν υποστεί οξείδωση, είναι ασταθή προϊόντα και μπορούν να υποστούν περεταίρω αντιδράσεις, όπως να συνδεθούν με πυρηνόφιλες ενώσεις (φαινόλες, θειόλες και αμίνες), και να αναδιατάξουν τη δομή τους (Waterhouse & Laurie, 2006).

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου μαζί με τα ιόντα σιδήρου δημιουργούν ρίζες υδροξυλίου, με την αντίδραση αυτή είναι γνωστή ως η αντίδραση Fenton (Εικόνα 20). Η ρίζα του υδροξυλίου είναι ένα προϊόν το οποίο οξειδώνει κάθε οργανικό μόριο που υπάρχει μέσα στον οίνο (Li et al., 2008). Η επιλογή των συστατικών όπου θα αντιδράσει είναι τυχαία, και εξαρτάται κυρίως από τη συγκέντρωση αυτών μέσα στον οίνο. Συνήθως αντιδρά με την αιθανόλη, το τρυγικό οξύ, τη γλυκερίνη, τα σάκχαρα και τα οργανικά οξέα (Danilewicz, 2007). Η οξείδωση Fenton της αιθανόλης οδηγεί στην παραγωγή ακεταλδεΰδης ενώ του τρυγικού οξέος σε γλυκοξυλικό οξύ (Es-Safi et al., 1999).

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow HO^{\bullet} + HO^{-}$$

Εικόνα 20: Αντίδραση Fenton (Boulton et al., 2001)

3.3. Αλληλεπίδραση της οξείδωσης με τα χημικά συστατικά οίνου

3.3.1. Σάκχαρα

Εξαιτίας της μεγαλύτερης παραγωγής ξηρών οίνων, τα σάκχαρα δεν ελκύουν μεγάλο επιστημονικό ενδιαφέρον για τη σύνδεσή τους με την οξείδωση των οίνων, λόγω της ελάχιστης ποσότητας που παραμένει μετά την αλκοολική ζύμωση. Παρ όλα αυτά, φαίνεται από μελέτες πώς τα σάκχαρα μπορούν έμμεσα να προστατέψουν έναν οίνο από την οξείδωση του. Τα σάκχαρα αλληλοεπιδρούν με τις φαινολικές ενώσεις που βρίσκονται μέσα στον οίνο, με τη συγκέντρωσή τους να είναι ανάλογη της αντιοξειδωτικής προστασίας που μπορούν να προσφέρουν. Επικρατεί όμως και η άποψη ότι οίνοι με υψηλά ποσοστά σακχάρων, σε υψηλές θερμοκρασίες, θα εμφανίσουν μεγαλύτερο ποσοστό καφετιάσματος συγκριτικά με οίνους που δεν διαθέτουν σημαντικές ποσότητες σακχάρων (Singleton et al., 1999). Η αλληλεπίδραση των πολυφαινολών και των σακχάρων σχετίζεται με το ότι οι πρώτες αναστέλλουν τις ελεύθερες ρίζες να οξειδώσουν συστατικά του οίνου, ενώ τα σάκχαρα εμποδίζουν αντιδράσεις που σχηματίζουν ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου (Peinado et al., 2010). Τέλος, μελέτη των Camara et al. (2006) κατέληξε πως υπάρχει θετική συσχέτιση της συγκέντρωσης των σακχάρων με την εμφάνιση πτητικών ενώσεων σε οίνους, οι οποίοι υπέστησαν οξειδωτική παλαίωση, αυξάνοντας την πολυπλοκότητα του αρώματός τους.

3.3.2. Αλκοόλες

Οι αλκοόλες, κυρίως η αιθανόλη που βρίσκεται σε μεγαλύτερη ποσότητα στον οίνο συνδέεται άμεσα με την οξείδωση και την εμφάνιση καφετιάσματος, με τη μετατροπή της σε ακεταλδεΰδη. Η ακεταλδεϋδή, στη συνέχεια, επηρεάζει το άρωμα, επικαλύπτοντας τις διάφορες πτητικές ενώσεις του οίνου και προσφέροντας μια δυσάρεστη αίσθηση (Tarko et al., 2020). Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει αρκετές μελέτες ώστε να εμποδιστεί η δράση των οξειδωτικών προϊόντων, όπως είναι η ακεταλδεΰδη, με κύριο στόχο να προστίθενται στους οίνους συστατικά που υπάρχουν ήδη σε αυτούς, να έχουν αντιοξειδωτική ικανότητα και να έχουν μεγαλύτερη ικανότητα κατανάλωσης οξυγόνου (Nioi et al., 2022).

3.3.3. Οργανικά οξέα

Τα οργανικά οξέα σχετίζονται άμεσα και έμμεσα με την οξείδωση των οίνων. Η συγκέντρωσή τους σε έναν οίνο καθορίζει την οξύτητά του και κατά συνέπεια οίνοι με χαμηλές οξύτητες είναι πιο ευάλωτοι σε μικροβιακές αλλοιώσεις και εμφάνιση συμπτωμάτων οξείδωσης (Chidi et al., 2018). Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι σε λευκούς οίνους με χαμηλή οξύτητα, η οποία προκάλεσε τον πολυμερισμό των φαινολικών ενώσεων, εμφανίστηκε καφέτιασμα (Darias-Martin et al., 2000). Η έμμεση οξείδωση που μπορούν να προκαλέσουν τα οργανικά οξέα σε ένα λευκό οίνο οφείλεται κυρίως στην ικανότητά τους να συνδέονται με τρισθενή σίδηρο, κάνοντάς τα πιο εύκολα ως προς την οξείδωση, παρουσία οξυγόνου (Grant-Preece et al., 2017).

3.3.4. Αζωτούχες ενώσεις

Οι αζωτούχες ενώσεις, και κυρίως οι πρωτεΐνες, θεωρούνται ευοξείδωτα συστατικά στους οίνους. Η προστασία τους από την οξείδωση οφείλεται στη σύνδεση που προκύπτει με τις φαινολικές ενώσεις. Επομένως, οι ερυθροί οίνοι έχουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική προστασία των πρωτεϊνών συγκριτικά με τους λευκούς (Fernandes-Pachon et al., 2004). Επιπλέον, η επαφή με τις οινολάσπες και κατά συνέπεια η αύξηση των πρωτεϊνών στον οίνο, αυξάνει την πιθανότητα εμφάνισης καφετιάσματος (Ibern-Gomez et al., 2000). Από την άλλη μεριά, μελέτη σε αφρώδεις λευκούς οίνους κατέληξε στο συμπέρασμα πως η προσθήκη μαννοπρωτεϊνών αύξησε κατά πολύ την αντιοξειδωτική ικανότητα των οίνων, χωρίς να προκύψει στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τις φαινολικές ενώσεις (Rodriguez-Nogales et al., 2012).

3.4. Οξείδωση λευκών οίνων

Το φαινόμενο της οξείδωσης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της οινοποίησης, προκαλώντας σημαντικές αλλαγές στη σύνθεση του οίνου. Όπως προαναφέρθηκε, αυτές οι αλλαγές μπορούν να εμφανιστούν πριν, κατά τη διάρκεια της και μετά το πέρας της ΑΖ, δηλαδή στην αποθήκευση, ενώ επηρεάζουν σημαντικά το άρωμα και το χρώμα του οίνου (Singleton et al., 1979). Παρόλο που τις περισσότερες φορές η οξείδωση συνδέεται με κάτι αρνητικό, υπάρχουν περιπτώσεις που γίνεται

εσκεμμένα για κάποιο συγκεκριμένο στυλ οίνου, συγκεκριμένο άρωμα και χρώμα. Τα αποτελέσματα της οξείδωσης γίνονται αντιληπτά σε έναν οίνο πρώτα από την αρωματική αλλοίωση που θα έχει υποστεί και στη συνέχεια από τη χρωματική αλλαγή, το καφέτιασμα που θα εμφανιστεί (Escudero et al., 2000).

Η πιθανότητα της εμφάνισης καφέ χρωματισμού στους λευκούς οίνους εξαρτάται κυρίως από την πολυφαινολική του σύνθεση (Gonzales Cartagena et al., 1994), αλλά και από παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την οξείδωση των φαινολών, όπως τα ιόντα μετάλλων μεταπτώσεως και η παρουσία αντιοξειδωτικών (Danilewicz, 2003). Τα σημαντικότερα φαινολικά συστατικά των λευκών οίνων, τόσο σε ποσότητα όσο και σε ικανότητα να συμμετέχουν στην οξείδωση, είναι το καφεϊκό οξύ, το καφταρικό οξύ, η κατεχίνη, η επικατεχίνη και τα παράγωγά τους (Oszmianski et al., 1996). Επιπλέον, υπάρχουν διαφορές ανάμεσα στις λευκές ποικιλίες συγκριτικά με τη συγκέντρωση των ολικών φαινολικών τους αλλά και την οξειδωτική ευαισθησία τους στο καφέτιασμα. Σύμφωνα με έρευνα των Salacha et al. (2008), σχετικά με το καφέτιασμα ελληνικών λευκών ποικιλιών, τη μεγαλύτερη συγκέντρωση σε φαινολικά και τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική προστασία την είχε η ποικιλία Μαλβάζια, ενώ τη μικρότερη η ποικιλία Μοσχοφίλερο.

Οι Singleton και Kramling (1976) και ο Simpson (1982) ανέπτυξαν ένα τεστ επιταχυνόμενης οξείδωσης, τοποθετώντας τους οίνους σε υψηλές θερμοκρασίες. Συγκεκριμένα, σε μία ποσότητα οίνου προστίθεται μπετονίτης, σε συγκέντρωση 1g/100ml, ώστε να αρχίσει η καθίζηση των πρωτεϊνών και των πολυπεπτιδίων. Στη συνέχεια, ποσότητα του δείγματος διοχετεύεται σε σωλήνες όπου το 25% αυτών θα εμπεριέχει αέρα, για 5 ημέρες στους 55°C. Τέλος, μετριέται η απορρόφηση στα 420 nm και οι διαφορές οδηγούν σε αντίστοιχα συμπεράσματα (Singleton & Kramling, 1976).

Οι Sioumis et al. (2006) εφάρμοσαν το τεστ επιταχυνόμενης οξείδωσης προκειμένου να εξετάσουν το καφέτιασμα, από οξείδωση, λευκών οίνων, με κάποιες μικρές παραλλαγές από το αρχικό τεστ των Singleton και Kramling. Αντίστοιχα, οι El-Horsy et al. (2009), εξέτασαν με την βοήθεια της επιταχυνόμενης οξείδωσης, εάν η προσθήκη γλουταθειόνης θα μπορούσε να καθυστερήσει την οξείδωση 13 Λιβανέζικων λευκών οίνων. Η έρευνα έδειξε ότι η προσθήκη που έγινε γλουταθειόνης αύξησε τις φαινολικές ενώσεις των οίνων, ενώ μετά από τις 8 μέρες επιταχυνόμενης οξείδωσης, οι οίνοι στους οποίους είχε προστεθεί γλουταθειόνη εμφάνισαν λιγότερο ποσοστό καφετιάσματος,

ενώ είχαν και καλύτερο οργανοληπτικό προφίλ συγκριτικά με εκείνους που δεν είχε προστεθεί γλουταθειόνη. Τέλος, οι Kallithraka et al. (2009) εξέτασαν τις αλλαγές στη φαινολική σύσταση και την αντιοξειδωτική ιδιότητα των λευκών οίνων έπειτα από αποθήκευση σε φιάλη και έπειτα από τεστ επιταχυνόμενης οξείδωσης. Παρατήρησαν ότι οι οίνοι που υπέστησαν τεστ επιταχυνόμενης οξείδωσης είχαν μικρότερες συγκεντρώσεις ολικών φαινολικών και (-)-επικατεχίνης και σημαντικά αυξημένες συγκεντρώσεις υδροξυκινναμωμικών οξέων, συγκριτικά με εκείνα που υποβλήθηκαν μόνο σε παλαίωση στη φιάλη.

3.4.1. Καφέτιασμα

Οι οίνοι έχουν την ικανότητα να προσφέρουν πληροφορίες σχετικά με την κατάστασή τους ακόμα και μέσω του χρώματός τους. Πιο συγκεκριμένα, τα φαινολικά συστατικά που περιέχουν, μπορούν να απορροφούνται από συγκεκριμένα μήκη κύματος ακτινοβολιών του ηλιακού φάσματος και να γίνεται μια γρήγορη και απλή αξιολόγηση των οίνων που εξετάζονται. Ειδικότερα, για την ανάλυση και εκτίμηση των λευκών οίνων μέσω του χρώματός τους, εξετάζεται η απορρόφησή τους στα 420 nm (κίτρινο) με το αποτέλεσμα να δείχνει μια πρώτη εικόνα για τον βαθμό οξείδωσης του οίνου. Όσο πιο οξειδωμένος είναι ένας λευκός οίνος, τόσο πιο μεγάλη απορρόφηση εμφανίζει στα 420 nm (Κοτσερίδης & Προξενιά 2017). Η οξείδωση των φαινολικών ενώσεων που περιέχουν στους λευκούς οίνους, οδηγεί στη δημιουργία πολυμερισμένων ενώσεων με χαρακτηριστικό καφετί χρωματισμό. Η μεταβολή του χρώματος ενός λευκού οίνου προς αποχρώσεις του καφέ, μπορεί να αξιολογηθεί είτε οπτικά είτε με τη χρήση φωτόμετρου, με παρατήρηση της μεταβολής της απορρόφησης στα 420 nm. Οι οίνοι οι οποίοι φτάνουν σε τιμή περίπου 0,16, πιθανόν να δείξουν κάποια σημάδια οξείδωσης, ενώ εκείνοι με τιμές μεγαλύτερες του 0,2 εμφανίζουν αισθητή αλλαγή (Κοτσερίδης, Καλλίθρακα & Προξενιά, 2020).

3.4.2. Μέθοδοι προσδιορισμού οξείδωσης

Προκειμένου να γίνει δυνατή η πρόληψη της πιθανής οξείδωσης των οίνων, αλλά και η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας που μπορεί να διαθέτουν, έχουν καθιερωθεί κάποιες μέθοδοι, όπου μέσω της απορρόφησης που πραγματοποιείται σε φασματοφωτόμετρο δίνονται πληροφορίες για την κατάσταση των οίνων. Από τα αποτελέσματα που προκύπτουν με τις συγκεκριμένες μεθόδους και με τη σύγκριση των

αντίστοιχων προτύπων καμπυλών αναφοράς, μπορεί να γίνει η εκτίμηση για το αν κάποιος οίνος χρειάζεται προστασία αλλά και μετά από πόσο χρονικό διάστημα από την εμφιάλωση του θα εμφανίσει συμπτώματα οξείδωσης. Οι πιο γνωστοί μέθοδοι προσδιορισμό της οξείδωσης είναι οι παρακάτω·

Μέθοδος επιταχυνόμενης οξείδωσης (Απορρόφηση στα 420 nm)

Όπως προαναφέρθηκε και παραπάνω, η χημική οξείδωση των οίνων λαμβάνει χώρα κυρίως όταν τα φαινολικά συστατικά τους οξειδώνονται από τις ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου. Αυτή η οξειδωτική αντίδραση μπορεί να οδηγήσει σε γενική αλλαγή του χρώματος των οίνων, προσθέτοντάς τους συνήθως καφέ αποχρώσεις. Με βάση αυτή την αντίληψη, οι Singleton & Kramling (1976) ανέπτυξαν μια μέθοδο όπου με χρήση του φωτόμετρου θα μπορέσει να προσδιοριστεί και να αξιολογηθεί αυτή η μεταβολήτου χρώματος των οίνων. Αναλυτικότερα, παρατήρησαν πως αν μια ποσότητα οίνου μεταφερθεί σε φιαλίδια, αεροστεγώς κλεισμένα, τα οποία θα τοποθετηθούν σε έναν χώρο με υψηλή θερμοκρασία (>30°C), για ένα μικρό χρονικό διάστημα, και μετριέται η απορρόφηση στα 420 nm ενός φιαλιδίου ανά μέρα, είναι πιθανόν να προβλεφθεί η οξείδωση του οίνου ανάλογα με την μεταβολή της απορρόφησης. Από τότε και μέχρι σήμερα η συγκεκριμένη μέθοδος με διάφορες αλλαγές, στον τρόπο διεξαγωγή της, θεωρείται η πιο αποτελεσματική όσον αφορά στην πρόβλεψη πιθανότητας οξείδωσης των οίνων. Σε μελέτη για την εξέταση του καφετιάσματος σε λευκούς οίνους χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της επιταχυνόμενης οξείδωσης για 11 ημέρες και η μέτρηση της μεταβολής στην απορρόφηση στα 420nm. Τα αποτελέσματα έδειξαν μια ποσοστιαία αύξηση εμφάνισης του καφετιάσματος, την ανάλογη μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των οίνων αλλά και ότι οι αυξημένες ποσότητες θειώδη ανυδρίτη βοήθησαν τους οίνους να διατηρήσουν τις αντιοξειδωτικές τους ικανότητες (Sioumis et al., 2005). Οι Deshaies et al. (2020) εξέτασαν τρεις διαφορετικούς τρόπους της μεθόδου της επιταχυνόμενης οξείδωσης στην ποικιλία Syrah, την αύξηση της θερμοκρασίας, η προσθήκη λακκάσης και την προσθήκη οξειδωτικών παραγόντων. Παρατήρησαν πώς η αύξηση της θερμοκρασίας στους 60°C οδήγησε και στην επιτάχυνση της οξείδωσης του οίνου, εξαιτίας της επιτάχυνσης του σχηματισμού της κινόνης, της αποικοδόμησης των ανθοκυανών που οδήγησε και στην εμφάνιση βενζοϊκών οξέων. Τέλος σε μια άλλη μελέτη, σύγκριναν σε φυσιολογικές

θερμοκρασίες αποθήκευσης οίνων (20 & 30ºC), για 12 μήνες, τις μεταβολές στην απορρόφηση των 420 nm που εμφάνισαν 3 λευκές ποικιλίες, η Μαλαγουζιά, το Ασύρτικο και το Sauvignon blanc. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε πως στην υψηλή θερμοκρασία (30ºC) τις μεγαλύτερες μεταβολές στην απορρόφηση έδειξε ποικιλία Sauvignon blanc ενώ τις μικρότερες η ποικιλία Ασύρτικο. Στην χαμηλότερη θερμοκρασία (20ºC) πάλι το Ασύρτικο είχε τη χαμηλότερη μεταβολή στην απορρόφηση μαζί όμως με την ποικιλία Sauvignon blanc. Και στις 2 θερμοκρασίες η ποικιλία Μαλαγουζιά εμφάνιζε σημαντικές μεταβολές στις απορροφήσεις της, κάτι που είναι αναμενόμενο μιας και θεωρείται ευοξείδωτη ποικιλία (Kanavouras et al., 2020).

Αντιοξειδωτική ικανότητα (Μέθοδος DPPH)

Η μέθοδος DPPH θεωρείται η πιο γνωστή και συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος για τον προσδιορισμό των αντιοξειδωτικών σε διάφορα τρόφιμα και ποτά. Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα των αντιοξειδωτικών ουσιών να δεσμεύουν διάφορες ελεύθερες ρίζες που υπάρχουν και να αποτρέπουν έτσι την εμφάνιση της οξείδωσης. Για αυτό το λόγο το αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται, το DPPH, είναι μια ελεύθερη ρίζα ή οποία εμφανίζει κυανές και μωβ αποχρώσεις ενώ μετά τη δέσμευση της από κάποιο αντιοξειδωτικό μετατρέπεται σε κίτρινες αποχρώσεις. η συγκεκριμένη μέθοδος είναι άμεσα εξαρτώμενη από το χρόνο, διότι από τη στιγμή που θα έρθει σε επαφή το αντιδραστήριο με το δείγμα ξεκινάει η δέσμευση του. Η απορρόφηση μετριέται στα 515 nm και πάντα σε 2 χρόνους (Pyrzynska & Pekal, 2013). Σε έρευνα των Paixao et al. (2007) εξέτασαν τη σχέση μεταξύ της αντιοξειδωτικής ικανότητας και του συνόλου των φαινολικών ενώσεων σε ερυθρούς, ροζέ και λευκούς οίνους χρησιμοποιώντας τη μέθοδο DPPH. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όσο μεγαλύτερη ήταν η προσθήκη του αντιοξειδωτικού στους οίνους, τόσο μεγαλύτερη ήταν η μείωση της απορρόφησης στα 515 nm στα δείγματα, ενώ μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα εμφάνιζαν οι ερυθροί με τους ροζέ και λευκούς οίνους να ακολουθούν αντίστοιχα, κάτι που έρχεται σε συμφωνία με τη συγκέντρωση τους σε φαινολικά συστατικά.

Προσδιορισμός ολικών ελεύθερων σουλφυδρυλομάδων (-SH)

Αμινοξέα και πεπτίδια που εμπεριέχονται στον ύμνο και φέρουν σουλφυδρυλομάδες, όπως είναι η γλουταθειόνη, κυστεΐνη και οι θειόλες. Αποτελούν ανασταλτικούς παράγοντες για οξείδωση και εμφάνιση καφετιάσματος. Επιπλέον, η γλουταθειόνη και η κυστεΐνη προστατεύουν και τα πτητικά συστατικά του αρώματος του οίνου από την οξείδωση (Roussis et al., 2009). Οι Kontogeorgos & Roussis (2014) χρησιμοποίησαν τη μέθοδο του Ellman με στόχο να προσδιορίσουν τις ολικές ελεύθερες σουλφυδρυλομάδες, όπου παρατήρησαν πως οι περισσότεροι λευκοί οίνοι εμφάνιζαν μεγαλύτερες ποσότητες συγκριτικά με τους ερυθρούς, το οποίο μπορεί να οφείλεται στην ένωση διαφόρων αμινοξέων με τις ανθοκυάνες. Τέλος, σε μελέτη όπου διερεύνησαν την επιταχυνόμενη οξείδωση έπειτα από προσθήκη οξειδωτικών ουσιών στους οίνους, κατέληξαν ότι όσο μεγαλύτερη είναι η οξείδωση που έχει υποστεί ένας οίνος τόσο μικρότερη είναι η περιεκτικότητά του σε ελεύθερες σουλφυδρυλομάδες και τόσο μικρότερη είναι και η απορρόφηση στα 412 nm. Για αυτό το λόγο θεωρείται σημαντική παρακολούθηση της συγκέντρωσης των ελεύθερων σουλφυδρυλομάδων σε έναν οίνο ώστε να είναι αντιληπτή και η πορεία της οξείδωσης του (Voltea et al., 2022).

4. Αντιοξειδωτική προστασία του οίνου

4.1. Φαινολικές ενώσεις

Οι φαινολικές ενώσεις του οίνου έχουν προσεγγίσει μεγάλο επιστημονικό ενδιαφέρον λόγω των σημαντικών ιδιοτήτων που προσφέρουν στον ανθρώπινο οργανισμό (Duthie et al., 2000). Εκτός όμως από αυτό, φαίνεται πως μπορούν να προσφέρουν αντιοξειδωτική προστασία και στους ίδιους τους οίνους ως φυσικά αντιοξειδωτικά. Η συγκέντρωσή τους στους λευκούς οίνους είναι μικρότερη από ότι στους ερυθρούς, με το καφεϊκό οξύ να έχει την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση ενώ η σύνδεση των υδροξυκινναμωμικών παραγώγων με το τρυγικό οξύ οδηγεί σε αύξηση της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας (Meyer et al., 1998).

Οι φαινολικές ενώσεις έχουν την ικανότητα να μετατρέπουν τις υπεροξειδικές ρίζες σε υδροϋπεροξείδια και οι ίδιες να μετατρέπονται σε φαινόξυ-ρίζες. Οι φαινόξυ-ρίζες μπορούν να αντιδρούν με άλλες υπερόξυ-ρίζες και να παράγουν μη ριζικά προϊόντα,

και ως αποτέλεσμα να αποφευχθεί η οξείδωση. Από την άλλη μεριά, έχουν τη δυνατότητα να αφαιρούν μόρια υδρογόνου από πολυμερισμένες αλυσίδες, και να οδηγούν στη δημιουργία ενός νέου κύκλου οξείδωσης (Kutz, 2012). Επιπλέον, σύμφωνα με τους Brand-Williams, et al., (1995), η παρουσία δεύτερης υδροξυλομάδας στην ορθό- ή παρά- θέση μιας φαινολικής ένωσης αυξάνει την αντιοξειδωτική της δραστηριότητα, εξαιτίας της επιπρόσθετης σταθεροποίησης που της προσφέρει.

4.2. Θειώδης ανυδρίτης

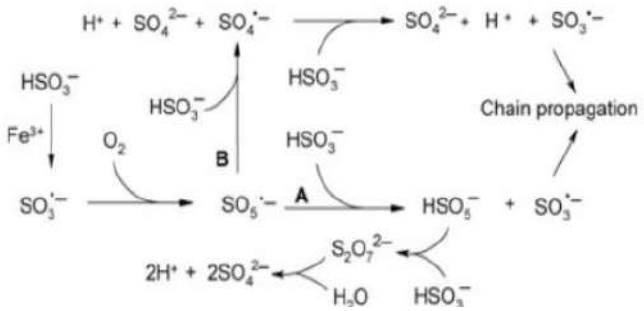
Η χρήση του θειώδη ανυδρίτη (SO_2) στη διαδικασία της οινοποίησης ξεκινάει από το 17^{ο} αιώνα μέχρι και σήμερα, και βασίζεται κυρίως στις αντιοξειδωτικές ιδιότητες που διαθέτει αλλά και στην προστασία των ινών κατά την αποθήκευσή τους (OIV, 2021). Εξαιτίας της τοξικότητας που μπορεί να εμφανίσει σε μεγάλες ποσότητες, έχουν γίνει αρκετές έρευνες με στόχο την ανεύρεση της ορθολογικότερης ποσότητας η οποία θα επωφεληθεί η οινοποίηση και θα είναι η μικρότερη δυνατή. Για αυτό το λόγο πρωταρχικός παράγοντας είναι η επίγνωση των διαφόρων μορφών που μπορεί να εντοπιστεί, στο γλεύκος και στον οίνο, ο θειώδης ανυδρίτης, τις ιδιότητες και τη δραστικότητα της κάθε μορφής αλλά και τους παράγοντες που επηρεάζουν τη συγκέντρωση της κάθε μορφής, όπως είναι το pH, η θερμοκρασία, ο αλκοολικός τίτλος, κ.ά. (Κοτσερίδης & Προξενιά, 2020). Ο θειώδης ανυδρίτης σε pH 3.0-4.0, το σύνηθες pH των γλευκών και των οίνων, διίσταται (Εικόνα 21), και στα προϊόντα υπάρχουν οι μορφές του μοριακού θειώδη ανυδρίτη (SO_2), η οποία είναι και η πιο δραστική μορφή, και των ανιόντων του εξουδετερωμένου θειώδους οξέος (HSO_3^-). Το άθροισμα των δύο μορφών του θειώδη ανυδρίτη ονομάζεται ελεύθερος θειώδης ανυδρίτης, ο οποίος είναι ο μοναδικός που έχει αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική δράση. Ο μοριακός SO_2 έχει αντιμικροβιακή δράση και βρίσκεται σε συγκεντρώσεις 1-7% του συνολικού ελεύθερου SO_2, ενώ αντίστοιχα η ανιοντική μορφή του θειώδη ανυδρίτη έχει αντιοξειδωτική δράση και αποτελεί το υπόλοιπο 90-99%. Η διάσταση αυτή εξαρτάται από δύο παράγοντες, το pH και τη θερμοκρασία. Σε υψηλότερο pH η συγκέντρωση του μοριακού SO_2 είναι μικρότερη, ενώ αντίστοιχα σε αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνεται. Τέλος, για γλεύκη και οίνους με ίδιο pH και ίδια συγκέντρωση ελεύθερου θειώδη ανυδρίτη, η συγκέντρωση του μοριακού SO_2 είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της αλκοόλης του προϊόντος (Κοτσερίδης & Προξενιά, 2020).

$$SO_2 + H_2O \rightleftharpoons HSO_3^- + H^+$$

Εικόνα 21: Διάσταση θειώδη ανυδρίτη (Wilkes, 2018)

Ο θειώδης ανυδρίτης έχει την ικανότητα να ενώνεται με ουσίες που διαθέτουν καρβονυλομάδες, αλδεϋδομάδες ή κετονομάδες και να σχηματίζει σταθερά και ασταθή σύμπλοκα. Έχει δύο αντιοξειδωτικές δράσεις, την άμεση, όπου οξειδώνεται (Εικόνα 22) ο ίδιος προστατεύοντας αλλά ευοξείδωτα συστατικά, και την έμμεση όπου οδηγεί στην απενεργοποίηση των οξειδασών, αποτρέποντάς την εκκίνηση κάποιας ενζυμικής οξείδωσης. Επιπλέον, κατά την εκκίνηση της αλκοολικής ζύμωσης, οι ζύμες παράγουν και εκείνες μια μικρή ποσότητα SO_2. Τέλος, ο SO_2 έχει τη δυνατότητα να συνδέεται με την ακεταλδεΰδη και να εξαλείφει την άσχημη οσμή οξείδωσης που προσφέρει (Godden et al., 2002).

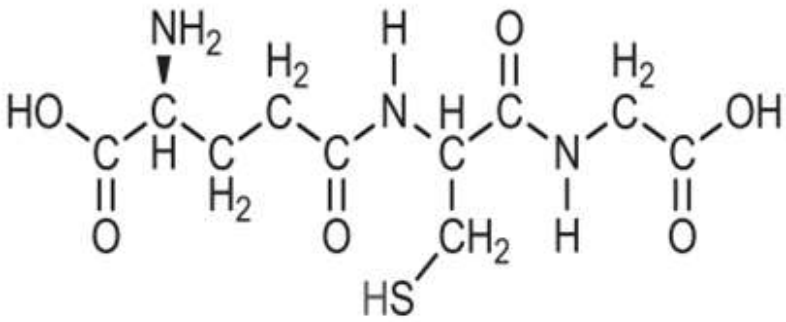
Τα τελευταία χρόνια γενικά επικρατεί μια τάση προς αντικατάσταση του SO_2 από άλλα αντιοξειδωτικά, όπως είναι η γλουταθειόνη, το ασκορβικό, κ.ά. Οι λόγοι που έχουν οδηγήσει σε αυτή την απόφαση είναι ότι η περίσσεια SO_2 σε ένα γλεύκος μπορεί να καθυστερήσει ή να σταματήσει εντελώς την αλκοολική ζύμωση, επιπλέον μπορεί να μην γίνει ποτέ εκκίνηση μηλογαλακτικής ζύμωσης, επηρεάζει οργανοληπτικά το άρωμα του οίνου, προσφέροντας μια αίσθηση καμένου σπίρτου, αλλά και τη γεύση (Sneyd, et al., 1993). Τέλος, επικρατεί και η άποψη διεθνώς ότι τα πρόσθετα για την προστασία του γλεύκους και των οίνων θα πρέπει να είναι συστατικά που υπάρχουν ήδη μέσα σε αυτά.



Εικόνα 22: Οξείδωση των ανιόντων θειώδους οξέος (Danilewicz et al., 2008)

4.3.Γλουταθειόνη

Η γλουταθειόνη (GSH, γ-L-Glutamyl-L-Cysteinyl Glycine) είναι ένα φυσικό αντιοξειδωτικό που παράγεται από ζωικούς και φυτικούς οργανισμούς με στόχο την απομάκρυνση των ελεύθερων ριζών και των αντιδραστικών ενώσεων, οι οποίες θα αντιδρούσαν με το οξυγόνο. Επιπλέον, προσφέρει προστασία έναντι των τοξινών και των βαρέων μετάλλων που επηρεάζουν την κυτταρική γήρανση (Badea & Antoce, 2015). Είναι ένα τριπεπτίδιο, με δεσμούς μεταξύ της καρβοξυλικής ομάδας του γλουταμινικού και την αμινομάδας του από κυστεΐνη (Εικόνα 23). Στην ανηγμένη μορφή της γλουταθειόνης, η ομάδα της θειόλης που υπάρχει στην κυστεΐνη μπορεί να δωρίσει ένα ηλεκτρόνιο και να οξειδωθεί η ίδια (Antoce, 2007).



Εικόνα 23: Γλουταθειόνη (Badea & Antoce, 2015)

Η γλουταθειόνη εμπεριέχεται στα σταφύλια ως φυσικό αντιοξειδωτικό και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην οινοποίηση προστατεύοντας ενώσεις του ποικιλιακού αρώματος, μειώνει τις πιθανότητες εμφάνισης καφέ αποχρώσεων αλλά και την απλούστευση των γευστικών χαρακτηριστικών των οίνων. Κάθε ποικιλία σταφυλιού έχει διαφορετική περιεκτικότητα γλουταθειόνης, και η ποσότητά της στο γλεύκος επηρεάζεται από την επαφή του με το οξυγόνο, τις συνθήκες πίεσης που θα υποστεί αλλά και το χρονικό διάστημα παραμονής του με τα στέμφυλα (Cheynier et al., 1989). Κατά τη διάρκεια της οινοποίησης, η ποσότητα της γλουταθειόνης μπορεί να αλλάξει σημαντικά, είτε λόγω οξείδωσης είτε εξαιτίας της κατανάλωσης της από τους ζυμομύκητες (Kritzinger et al., 2013). Κατά την οξείδωση των φαινολικών ενώσεων στους λευκούς οίνους, όπως είναι οι κινόνες και το καφταρικό οξύ, η

γλουταθειόνη συμμετέχει προσφέροντας προστασία και η ίδια μετασχηματίζεται σε 2-S-γλουταθειονυλο καφταρικό οξύ (GRP) (Singleton et al., 1985). Αυτές οι αντιδράσεις συμβαίνουν όταν οι φαινολικές ενώσεις έρχονται σε επαφή με οξυγόνο και παρουσία της πολυφαινοξειδάσης (PPO) οδηγούνται σε άμεση οξείδωση, ενζυμική ή/και χημική (Sonni et al., 2011). Η γλουταθειόνη μπορεί να δράσει συνεργατικά με άλλα αντιοξειδωτικά ένζυμα στον οίνο, μετατρέποντας τις ορθοκινόνες σε άχρωμα πολυμερή και να αναστείλει το καφέτιασμα τους (Antoce, 2007).

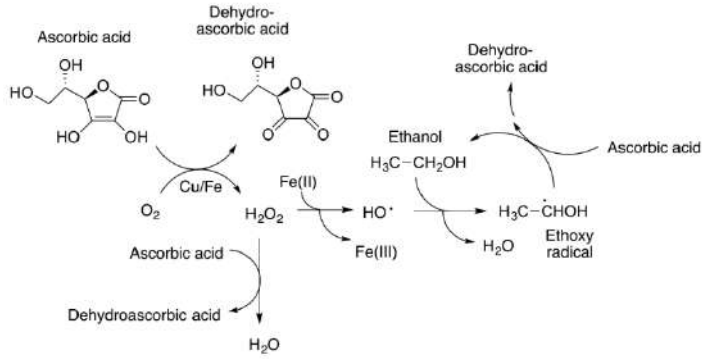
Οι Vaimakis & Roussis (1996) μελετώντας την επιρροή στην οξείδωση λευκών οίνων έπειτα από προσθήκη γλουταθειόνης σε οξειδωμένα γλεύκη, κατέληξαν πως οι οίνοι στους οποίους είχε προστεθεί η γλουταθειόνη είχαν αυξημένη συγκέντρωση φαινολικών συστατικών, είχε μειωθεί η απώλεια πολυμερών, ίσως από την ένωσή της γλουταθειόνης με τις κινόνες, έγινε πιο πολύπλοκο το άρωμα των οίνων, προσφέροντας φρουτώδη χαρακτηριστικά ενώ τέλος, αποδείχθηκε πώς συμβάλλει θετικά σε οξειδωμένα γλεύκη σε αντίθεση με αυτά που δεν είχαν έρθει σε επαφή με οξυγόνο. Αντίστοιχα, μια άλλη έρευνα των Ferreira-Lima et al., (2016), με θέμα τη διερεύνηση των ποσοτήτων γλουταθειόνης σε διάφορες λευκές ποικιλίες από τη Βραζιλία, αποδείχθηκε ότι η αύξηση της πίεσης που δέχονται τα σταφύλια αυξάνει τη συγκέντρωση γλουταθειόνης στο γλεύκος ενώ μετά το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης υπάρχει μείωση της ποσότητας της διότι καταναλώνεται από τις ζύμες, κάτι το οποίο είχαν συμφωνήσει και οι Du Toit et al., (2007) σε αντίστοιχη έρευνα τους. Αντίθετα, οι Webber et al., (2017) εξετάζοντας τα επίπεδα γλουταθειόνης σε αφρώδεις οίνους μετά από κάποιο χρονικό διάστημα παραμονής τους στη φιάλη, κατέληξαν στα συμπεράσματα ότι η συγκέντρωση της γλουταθειόνης δεν επηρεάζει τα φαινολικά συστατικά των οίνων, μειώνει την ένταση του χρώματος αλλά και την συγκέντρωση της ακεταλδεΰδης, αφού τη δεσμεύει. Τέλος, παρατηρήθηκε ότι η συγκέντρωση της γλουταθειόνης σταθεροποιήθηκε έπειτα από παραμονή τον οίνων για 6 μήνες στη φιάλη.

Γενικότερα, η γλουταθειόνη έχει πολύ σημαντικό ρόλο στους οίνους προσφέροντας αντιοξειδωτική προστασία και σταθεροποίηση σε αυτούς, παρέχοντας στους ζυμομύκητες ποσότητες θείου που χρειάζονται αλλά και βοηθώντας στην καλύτερη εξέλιξή του αρώματος. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν αντιοξειδωτικό για μερική αντικατάσταση του θειώδη ανυδρίτη αλλά δεν μπορεί να τον αντικαταστήσει εντελώς (Badea & Antoce, 2015).

4.4. Ασκορβικό οξύ

Το ασκορβικό οξύ είναι ένα φυσικό και ισχυρό αντιοξειδωτικό (Εικόνα 24) το οποίο χρησιμοποιείται κυρίως για τη συντήρηση και προστασία των τροφίμων. Προέρχεται από τα φυτά (D- γλυκόζη), και υπάρχει σε πολλά φρούτα στη φύση όπως και στο σταφύλι. Μετά την πίεση των σταφυλιών, μειώνεται η συγκέντρωση του λόγω της επαφής του γλεύκους με το οξυγόνο, αλλά μπορεί να προστεθεί σαν αντιοξειδωτικό, προστατεύοντας το άρωμα του οίνου και τον οίνο από το να υποστεί θολώματα σιδήρου, ανάγοντάς τον τρισθενή σε δισθενή σίδηρο ($Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+}$) (Singleton, 1987).

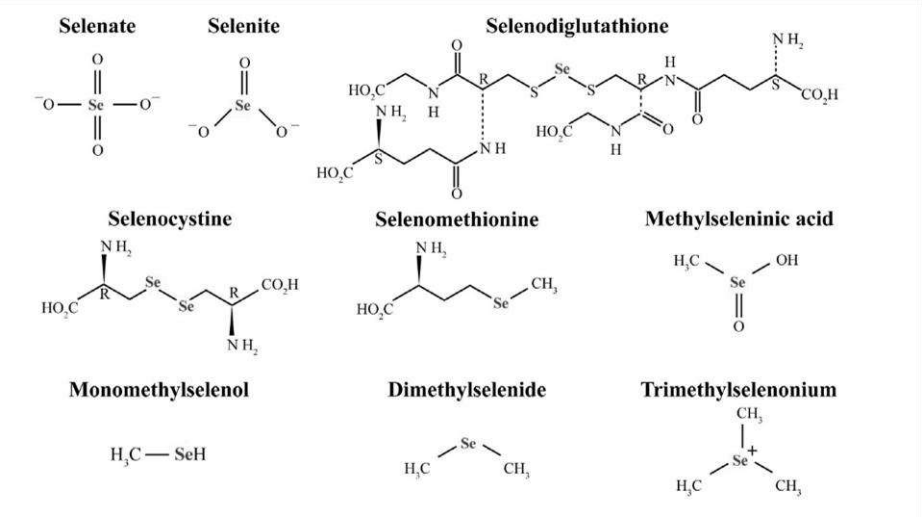
Η προσθήκη του ασκορβικού οξέος ως αντιοξειδωτικό χρησιμοποιείται αρκετά σε οίνους οι οποίοι δεν εμπεριέχουν αρκετή ποσότητα θειώδη ανυδρίτη, ο οποίος φαίνεται ότι οδηγεί σε αποικοδόμηση των κατεχινών, σχηματίζοντας κίτρινες χρωστικές ξανθυλίου. Οι Barril et al. (2012) διαπίστωσαν πως η προσθήκη ασκορβικού οξέος σε λευκούς οίνους συνεισέφερε θετικά στο χρώμα των οίνων, διατηρώντας τις πράσινες και ανοιχτές κίτρινες αποχρώσεις τους, που είναι ενδεικτικές για τη νεότητα των οίνων. Επίσης, σε μια άλλη μελέτη εύρεσης διαφορών αντιοξειδωτικής προστασίας και καθυστάρησης καφετιάσματος έπειτα από προσθήκη διοξειδίου του άνθρακα και ασκορβικού οξέος, απεδείχθη πως η προσθήκη ασκορβικού οξέος είχε μικρότερες πιθανότητες καφετιάσματος, παρόλο που ο συντελεστής του ρυθμού μεταβολής του χρώματος ήταν κάπως υψηλός (Kyraleou et al., 2013). Τέλος, οι Bradshaw et al. (2001) παρατήρησαν πως η προσθήκη ασκορβικού οξέος επιτάχυνε την οξείδωση της κατεχίνης και κατά συνέπεια την αμαύρωση των οίνων, ο οδηγώντας στο ερώτημα ότι ίσως η οξείδωση του ασκορβικού οξέος είναι αυτή που οφείλεται για το καφέτιασμα. Παρόλα αυτά, διάφορες μελέτες που ακολούθησαν κατέληξαν ότι είτε μπορεί η οξείδωση του ασκορβικού οξέος να αυξάνει το δείκτη καστάνωσης, είτε να μην επηρεάζει καθόλου το χρώμα των οίνων (Bradshaw et al., 2003 & Kilmartin, 2010).



Εικόνα 24: Η αντιοξειδωτική αντίδραση του ασκορβικού οξέος παρουσία οξυγόνου (Barril et al., 2016).

4.5.Σελήνιο

Το σελήνιο είναι ένα απαραίτητο μικροθρεπτικό συστατικό για όλους τους έμβιους οργανισμούς, με αντιοξειδωτικές λειτουργίες. Συνήθως, το σελήνιο δεν βρίσκεται μόνο ως στοιχείο αλλά συνδεδεμένο με αμινοξέα και πρωτεΐνες (Thiry et al., 2012). Στα τρόφιμα, η χημική μορφή που έχει εξαρτάται από τη βιοδιαθεσιμότητα του, με τις οργανικές μορφές να είναι πιο βιοδιαθέσιμες και λιγότερο τοξικές από τις ανόργανες (Εικόνα 25). Πιο γνωστή οργανική μορφή του σεληνίου που απαντάται στους οργανισμός είναι η σεληνομεθειονίνη (Tinggy, 2003).



Εικόνα 25: Οργανικές και ανόργανες μορφές σεληνίου (Fernandes et al., 2012).

Η συγκέντρωση το σεληνίου στους οίνους, σύμφωνα με μελέτες, κυμαίνεται από 0,8 έως 2,0 μg/L για ευρωπαϊκές ποικιλίες (Frias et al., 2003), ενώ σε αμερικάνικες ποικιλίες έχει παρατηρηθεί η διπλάσια ποσότητα στους λευκούς από ότι στους ερυθρούς οίνους (5 μg/L και 2 μg/L αντίστοιχα) (USDA, 2004). Σύμφωνα με τους Witkowska et al. (2006) η συγκέντρωση του σεληνίου που μπορεί να εμπεριέχεται στο σταφύλι εξαρτάται από το έδαφος και το γεωγραφικό πλάτος του αμπελώνα. Οι Barbulescu et al. (2012) μελέτησαν την αντίδραση των φαινολικών συστατικών των οίνων έπειτα από προσθήκη σεληνίου, αφού και τα δύο είναι αντιοξειδωτικά συστατικά των οίνων. Παρατήρησαν πως η προσθήκη του σεληνίου κατά τη διάρκεια της ζύμωσης οδήγησε αύξηση όλων των φαινολικών συστατικών, αλλά και το τελικό προϊόν ήταν καλύτερο ποιοτικά συγκριτικά με αυτό που δεν είχε προστεθεί σελήνιο. Επίσης, αποδείχθηκε μια θετική συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης των ανθοκυανών και της προστιθέμενης ποσότητας σεληνίου.

Το σελήνιο διαθέτει τρεις μηχανισμούς για να αποτρέψει την οξείδωση στο περιβάλλον όπου βρίσκεται. Ο πρώτος έχει να κάνει με την εύρεση και την απομάκρυνση των ελεύθερων ριζών (ROS). Ένας άλλος μηχανισμός είναι η δημιουργία της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης, το οποίο βοηθάει στο να διασπαστούν οι ελεύθερες ρίζες από το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Τέλος, ο τρίτος μηχανισμός είναι η σύζευξη του ίδιου του σεληνίου με κάποιο ευοξείδωτο μέταλλο που εμπεριέχεται στον οίνο, αποτρέποντας έτσι την οξείδωση του (Battin & Brumaghim, 2009).

5. Ελληνικές λευκές ποικιλίες

Ο ελληνικός αμπελώνας έχει έκταση γύρω στα 1,1 εκατομμύρια στρέμματα και η παραγωγή του αποτελείται από 89% ελληνικές ποικιλίες και το υπόλοιπο 11% από διεθνείς. Επίσης υπάρχει μια επικράτηση των λευκών ποικιλιών (70%) έναντι των κόκκινων (30%) (Κ.Ε.Ο.Σ.Ο.Ε.).

5.1.Σαββατιανό – Ρετσίνα

Ρετσίνα, σύμφωνα με τον κανονισμό 1308/13 (Παράρτημα VII Μέρος II), της Ε.Ε., καλείται ο οίνος που παράγεται αποκλειστικά στην Ελλάδα, από γλεύκος σταφυλιών της ποικιλίας Σαββατιανό, με ρητίνη Πεύκης Χαλεπίου. Η παραγωγή οίνου Ρετσίνας είναι η μόνη που επιτρέπεται η χρήση της ρητίνης της Πεύκης Χαλεπίου. Η ρετσίνα έχει μεγάλη ιστορία στον ελληνικό οινοπαραγωγικό κλάδο, μιας και υπάρχουν αναφορές ότι παραγόταν από τα αρχαία χρόνια. Υπάρχουν αρκετοί λόγοι που θεωρούνται υπεύθυνοι για τη δημιουργία της ρετσίνας, όπως ότι ο Αττικός αμπελώνας συνορεύει με πολλά πευκοδάση, η ρητίνη βοηθάει στην καλύτερη συντήρηση, έχει ιδιαίτερο άρωμα και βοηθάει στη βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του οίνου. Η διαδικασία παραγωγής της ρετσίνας δεν διαφέρει πολύ με τη λευκή οινοποίηση, μόνο στο ότι κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης προστίθεται συγκεκριμένη ποσότητα ρητίνης. Η κύρια ποικιλία παραγωγής ρετσίνας είναι το Σαββατιανό αλλά μπορεί να παραχθεί και από Ροδίτη (Wine of Greece).

5.2.Μαλαγουζιά

Η Μαλαγουζιά είναι μια λευκή ελληνική ποικιλία η οποία, αφού κατάφερε να διασωθεί τα τελευταία 15 χρόνια από την εξαφάνισή της, έχει φυτευτεί σχεδόν σε όλα τα μήκη και πλάτη της Ελλάδος. Αναφορές δείχνουν πως κατά πάσα πιθανότητα κατάγεται από το νομό της Αιτωλοακαρνανίας, ενώ αμπελουργικά θεωρείται παραγωγική, ανθεκτική στην ξηρασία και με μεγάλη ευαισθησία στο βοτρύτη. Συγκαταλέγεται στις πιο αρωματικές ποικιλίες, με τους οίνους που δίνει να έχουν λουλουδένιες και λεμονάτες νότες, σαντινένια δομή, χαμηλή οξύτητα και υψηλό αλκοόλ (Νέτσικα, 2019).

6. Σκοπός της μελέτης

Η οξείδωση, κυρίως στους λευκούς οίνους, είναι ένα οινολογικό σφάλμα που μπορεί να συμβεί είτε κατά τη διαδικασία της οινοποίησης είτε κατά τη διάρκεια της παραμονής του οίνου στη φιάλη. Το φαινόμενο αυτό προκύπτει έπειτα από εισροή

οξυγόνου στον οίνο και την απουσία ικανής αντιοξειδωτικής προστασίας. Ως αποτέλεσμα, προκύπτει μια υποβάθμιση της ποιότητας του τελικού προϊόντος αλλά και αλλοίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του. Συγκεκριμένα, το χρώμα των λευκών οίνων από πράσινες και κίτρινες αποχρώσεις μετατρέπεται σε καφέ αποχρώσεις (browning-καφέτιασμα) ενώ τα αρώματα φρέσκων ανθών και φρούτων αντικαθίστανται από δυσάρεστες και μη επιθυμητές οσμές.

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής έρευνας είναι η μελέτη του ρυθμού οξείδωσης των λευκών οίνων με ταυτόχρονη παρακολούθηση της μεταβολής της χημικής τους σύστασης. Επίσης η πιθανή αντιοξειδωτική προστασία που προσέφερε στον οίνο η προσθήκη ποσότητας σεληνίου και η σύγκριση της αντιοξειδωτικής του ικανότητας με άλλα αντιοξειδωτικά που χρησιμοποιούνται ευρέως στην οινοποίηση. Το τελευταίο αποτελεί ένα πολύ ενδιαφέρον ερευνητικό ερώτημα και δεν έχει μελετηθεί έως και σήμερα διεθνώς.

7. Υλικά και Μέθοδοι

7.1. Υλικά

7.1.1. Δείγμα οίνου

Οίνοι που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση της παρούσης μεταπτυχιακής ερευνητικής μελέτης ήταν λευκές ελληνικές ποικιλίες, Μαλαγουζιά από αμπελώνες στα Μεσόγεια Αττικής, εσοδείας 2021 και οινοποίησης από το οινοπωλείο Μητρογιάννης Στ. Σπυρίδων (Καλύβια Αττικής) και Ρετσίνα (από Σαββατιανό), από του Αμπελώνες Οινοποιητική Σώκος Α.Ε. (Ερυθρές Αττικής), εσοδείας 2022. Η Μαλαγουζιά είχε ολικό αλκοολικό τίτλο 11,5% vol, pH=3,39 , ολική οξύτητα 4,8 g/L τρυγικού οξέος. Η Ρετσίνα είχε ολικό αλκοολικό τίτλο 11,5% vol, pH= 3,29, ολική οξύτητα 5,3 g/L τρυγικού οξέος. Και στους δύο οίνους είχε προστεθεί θειώδης ανυδρίτης κατά τη διάρκεια της οινοποίησης αλλά και πριν την προσθήκη των επεμβάσεων ώστε να έχουν ολικό θειώδη ανυδρίτη 80 mg SO_2 /L .

7.1.2. Αντιδραστήρια

Για την πραγματοποίηση των αναλύσεων της πειραματικής μελέτης χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντιδραστήρια: η σεληνομεθειονίνη (C5H11NO2Se), το metabisulfite (), το ασκορβικό οξύ (C6H8O6), η γλουταθειόνη (C10H17N3O6S), το καυστικό νάτριο (NaOH), το θειικό οξύ (H2SO4), το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu, το ανθρακικό νάτριο (Na2CO3), το γαλλικό οξύ, το αντιδραστήριο DPPH, η μεθανόλη (≥ 99,8%), το αντιδραστήριο Trolox, το φωσφορικό άλας καλίου (K2HPO4), το φωσφορικό κάλιο (KH2PO4), το 5,5'-dithiobis(2-nitrobezoic acid) (DTNB), αιθανόλη (≥ 99,8%) και τρυγικό οξύ. Η προμήθεια των αντιδραστηρίων έγινε από την εταιρεία Sigma – Aldrich (Darmstadt, Germany).

7.1.3. Όργανα

Φασματοφωτόμετρο

Στις μεθόδους όπου χρειάστηκε να γίνει η μέτρηση των απορροφήσεων ορισμένων κυμάτων του ηλιακού φάσματος χρησιμοποιήθηκε το όργανο UPLAB UV – VIS spectrophotometer της STEROGLASS Company (STEROGLASS S.r.l. Strada Romano di Sopra, 2/C 06132 San Marino in Campo – Perugia, Italy).

Αυτόματος τιτλοδότης

Για τη μέτρηση του ελεύθερου και ολικού θειώδους ανυδρίτη χρησιμοποιήθηκε ο αυτόματος τιτλοδότης OENO 20, από την Oeno Bio SARL (Oeno Bio, Borde Neuve, 11170 Saint Martin le Vieil, France).

Σύστημα Υγρής Χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)

Για την επίτευξη του διαχωρισμού και της αναγνώρισης των φαινολικών ενώσεων των δειγμάτων έγινε χρήση του μοντέλου Waters 2695 HPLC Separations Module (Waters Corporation, 34 Maple Street Milford, MA 01757, U.S.A.) με ανιχνευτή Photodiode array Waters 2996.

7.2. Πειραματική διαδικασία

7.2.1. Δείγματα προς ανάλυση και θερμοκρασία εφαρμογής πειράματος

Τα δείγματα που αναλύθηκαν και για τις δύο ποικιλίες ήταν:

1. Μάρτυρας (control)
2. Το δείγμα με την ελάχιστη συγκέντρωση γλουταθειόνης: 10 mg/L.
3. Το δείγμα με τη μέγιστη συγκέντρωση γλουταθειόνης: 20 mg/L.
4. Το δείγμα με την ελάχιστη συγκέντρωση ασκορβικού οξέος: 100 mg/L.
5. Το δείγμα με τη μέγιστη συγκέντρωση ασκορβικού οξέως: 200 mg/L.
6. Το δείγμα με την ελάχιστη συγκέντρωση ολικού θειώδη ανυδρίτη έπειτα από προσθήκη με Metabisulfite: 20 mg/L.
7. Το δείγμα με τη μέγιστη συγκέντρωση ολικού θειώδη ανυδρίτη έπειτα από προσθήκη με Metabisulfite: 40 mg/L.
8. Το δείγμα με την ελάχιστη συγκέντρωση σεληνίου: 25 μg/L.
9. Το δείγμα με τη μέγιστη συγκέντρωση σεληνίου: 50 μg/L.
10. Το δείγμα με όλες τις ελάχιστες συγκεντρώσεις: γλουταθειόνη = 10 mg/L, ασκορβικό οξύ = 100 mg/L, θειώδης ανυδρίτης (προσθήκη) = 20 mg/L και σελήνιο = 25 μg/L.
11. Το δείγμα με όλες τις μέγιστες συγκεντρώσεις: γλουταθειόνη = 20 mg/L, ασκορβικό οξύ = 200 mg/L, θειώδης ανυδρίτης (προσθήκη) = 40 mg/L και σελήνιο = 50 μg/L.

Η πειραματική διαδικασία της επιταχυνόμενης οξείδωσης και για τις δύο ποικιλίες πραγματοποιήθηκε σε υδατόλουτρο στη θερμοκρασία των 55 ^{o}C.

7.2.2. Προετοιμασία δειγμάτων

Η παρασκευή των δειγμάτων έγινε με τον ίδιο τρόπο και για τις δύο ποικιλίες στο πείραμα. Πραγματοποιήθηκε μια θείωση και των δύο ποικιλιών, πριν την προσθήκη των επεμβάσεων, ώστε όλα τα δείγματα να έχουν ολικό θειώδη ανυδρίτη 80 mg SO_2/L.

Για να παρασκευαστεί ο μάρτυρας, μεταφέρθηκαν 300 ml δείγματος οίνου της ποικιλίας που εξεταζόταν σε ογκομετρικό κύλινδρο των 500 ml. Από αυτά, μεταφέρθηκαν 30 ml, με τη βοήθεια ογκομετρικού κυλίνδρου των 50 ml, σε γυάλινα vials, των 45 ml, και σφραγίστηκαν με βιδωτό καπάκι.

Για την παρασκευή των δειγμάτων με τις δύο συγκεντρώσεις σεληνίου, 25 μg/L και 50 μg/L, χρειάστηκε να παρασκευαστεί πρώτα ένα αρχικό υδατικό διάλυμα με σεληνομεθειονίνη, εξαιτίας ότι είναι υδατοδιαλυτή, με συγκέντρωση 50 mg/L (η απόδοση της σεληνομεθειονίνης σε σελήνιο είναι 40,2%). Στη συνέχεια, σε ογκομετρικούς κυλίνδρους των 500 ml, προστέθηκαν 375 μL του αρχικού διαλύματος για την μικρή συγκέντρωση σεληνίου (25 μg/L σεληνίου = 62,5 μg/L σεληνομεθειονίνης), και 750 μL του αρχικού διαλύματος για την μεγάλη συγκέντρωση σεληνίου (50 μg/L σεληνίου = 125 μg/L σεληνομεθειονίνης), και συμπληρώθηκαν μέχρι τα 300 ml με οίνο. Από αυτά, μεταφέρθηκαν 30 ml, με τη χρήση ογκομετρικού κυλίνδρου των 50 ml, σε γυάλινα vials, των 45 ml, και σφραγίστηκαν με βιδωτό καπάκι.

Παρόμοια διαδικασία με την παραπάνω χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των δύο συγκεντρώσεων γλουταθειόνης (10 mg/L και 20 mg/L). Σε μία ογκομετρική φιάλη των 25 ml προστέθηκαν 25 mg γλουταθειόνης και συμπληρώθηκε μέχρι τη χαραγή με νερό, δημιουργώντας το αρχικό διάλυμα συγκεντρώσεως 1 g/L. Σε ογκομετρικούς κυλίνδρους των 500 ml μεταφέρθηκαν 3 ml του αρχικού διαλύματος (για τη μικρή συγκέντρωση γλουταθειόνης 10 mg/L) και 6 ml του αρχικού διαλύματος (για τη μεγάλη συγκέντρωση γλουταθειόνης 20 mg/L) και συμπληρώθηκαν και οι δύο ογκομετρικοί κύλινδροι μέχρι τα 300 ml με οίνο. Από αυτά, μεταφέρθηκαν 30 ml, με τη χρήση ογκομετρικού κυλίνδρου των 50 ml, σε γυάλινα vials, των 45 ml, και σφραγίστηκαν με βιδωτό καπάκι.

Στην παρασκευή των δειγμάτων με τις συγκεντρώσεις ασκορβικού οξέος δεν χρειάστηκε να δημιουργηθεί αρχικό διάλυμα. Σε δύο ογκομετρικούς κυλίνδρους των 500 ml προστέθηκαν 30 mg ασκορβικού οξέος στον έναν και 60 mg στον άλλον και συμπληρώθηκαν ως τα 300 ml με οίνο, ώστε να δημιουργηθούν οι συγκεντρώσεις 100 mg/L και 200 mg/L αντίστοιχα. Από αυτά, μεταφέρθηκαν 30 ml, με τη χρήση ογκομετρικού κυλίνδρου των 50 ml, σε γυάλινα vials, των 45 ml, και σφραγίστηκαν με βιδωτό καπάκι.

Στα δείγματα με τη συμπλήρωση του ολικού θειώδους ανυδρίτη με 20 mg/L και 40 mg/L χρησιμοποιήθηκε το Potassium metabisulfite. Αρχικά, κατασκευάστηκε αρχικό διάλυμα σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml όπου προστέθηκαν 50 mg/L PMS, και συμπληρώθηκε μέχρι τη χαραγή με οίνο (συγκέντρωση σε PMS 1 g/L). Από αυτό μεταφέρθηκαν 12 ml (+20 mg ολικό SO_2/L) και 24 ml (+40 mg ολικό SO2/L) σε ογκομετρικούς κυλίνδρους των 500 ml, και συμπληρώθηκαν μέχρι τα 300 ml με οίνο. Από αυτά, μεταφέρθηκαν 30 ml, με τη χρήση ογκομετρικού κυλίνδρου των 50 ml, σε γυάλινα vials, των 45 ml, και σφραγίστηκαν με βιδωτό καπάκι.

Τέλος, για την παρασκευή των δειγμάτων που θα έχουν όλες τις μικρές και όλες τις μεγάλες συγκεντρώσεις των αντιοξειδωτικών χρησιμοποιήθηκαν δύο ογκομετρικού κύλινδροι των 500 ml. Στον πρώτο προστέθηκαν 375 μl αρχικού διαλύματος σεληνομεθειονίνης, 3 ml αρχικού διαλύματος γλουταθειόνης, 30 mg ασκορβικού και 12 ml αρχικού διαλύματος PMS, όπου συμπληρώθηκε μέχρι τα 300 ml με οίνο. Από αυτά, μεταφέρθηκαν 30 ml, με τη βοήθεια ογκομετρικού κυλίνδρου των 50 ml, σε γυάλινα vials, των 45 ml, σφραγίστηκαν με βιδωτό καπάκι και αποτελούσαν τα δείγματα με τις μικρές συγκεντρώσεις όλων των αντιοξειδωτικών. Αντίστοιχα, στο δεύτερο ογκομετρικό κύλινδρο προστέθηκαν 750 μl αρχικού διαλύματος σεληνομεθειονίνης, 6 ml αρχικού διαλύματος γλουταθειόνης, 60 mg ασκορβικού και 24 ml αρχικού διαλύματος PMS, όπου συμπληρώθηκε μέχρι τα 300 ml με οίνο. Από αυτά, μεταφέρθηκαν 30 ml, με τη χρήση ογκομετρικού κυλίνδρου των 50 ml, σε γυάλινα vials, των 45 ml, σφραγίστηκαν με βιδωτό καπάκι και αποτελούσαν τα δείγματα με τις μεγάλες συγκεντρώσεις όλων των αντιοξειδωτικών.

Έπειτα, ακολούθησε η μέτρηση της απορρόφησης στα 420 nm, η μέτρηση του ολικού και ελεύθερου θειώδους ανυδρίτη, η ανάλυση ΔΦΟ, Folin, DPPH, η ανάλυση μέτρησης των σουλφυδρυλομάδων, η HPLC και η μέτρηση της οξύτητας για όλα τα δείγματα, και στην συνέχεια τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους 55°C, για 12 ημέρες. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και στη δεύτερη ποικιλία.

7.2.3. Δειγματοληψίες

Για τη μέτρηση της απορρόφησης στα 420 nm στο φασματοφωτόμετρο πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες από την ημέρα 0 έως και την 12η ημέρα, σε κάθε ένα πείραμα ταχείας οξείδωσης στη θερμοκρασία 55°C , και για τις δύο ποικιλίες. Οι δειγματοληψίες για τον προσδιορισμό της ολικής ή ογκομετρούμενης οξύτητας έγιναν την ημέρα 0 και 12 αντίστοιχα. Οι δειγματοληψίες για τον προσδιορισμό του θειώδους ανυδρίτη (ελεύθερου & ολικού), των ολικών φαινολικών συστατικών με τη μέθοδο Follin-Ciocalteu και τη ΔΦΟ (απορρόφηση στα 280nm), της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο DPPH και τον ολικών ελεύθερων σουλφρυδυλομάδων (SH) με τη μέθοδο Ellmann, πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες την ημέρα 0η, την 4η, την 8η και τη 12η κάθε πειράματος επιταχυνόμενης οξείδωσης και για τις δύο ποικιλίες. Τέλος, την 0η και τη 12η ημέρα κάθε πειράματος οξείδωσης και για τις δύο ποικιλίες, πραγματοποιήθηκε η μέτρηση για τον προσδιορισμό των φαινολικών ενώσεων με τη μέθοδο της Υγρής Χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography) αλλά και σε έναν μάρτυρα κάθε ποικιλίας που από την ημέρα 0 έως και την 12η μεταφέρθηκε σε χαμηλή θερμοκρασία για συντήρηση.

7.3.Μέθοδοι ανάλυσης

7.3.1. Απορρόφηση στα 420nm και δείκτης καστάνωσης

7.3.1.1. Προετοιμασία δειγμάτων

Την ημέρα 0 όλα τα δείγματα τοποθετήθηκαν στο υδατόλουτρο, όπου κάθε 24 ώρες αποσύρονταν, για 12 μέρες, προκειμένου να γίνει μέτρηση της απορρόφησης στα 420 nm για το κάθε δείγμα. Μετά την απόσυρση, τα δείγματα παρέμεναν σε θερμοκρασία δωματίου για μια ώρα, ενώ ακολουθούσε η τοποθέτηση της κατάλληλης ποσότητας σε κυψελίδα υάλου του 1 cm και με τη χρήση του φασματοφωτόμετρου πραγματοποιήθηκε καταγραφή της απορρόφησης στα 420 nm. Για το μηδενισμό του οργάνου χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο νερό. Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε για κάθε μία από τις 12 ημέρες του τεστ επιταχυνόμενης οξείδωσης στους 55°C, για κάθε μία από τις ποικιλίες.

Για την εκτίμηση του χρώματος του κάθε δείγματος οίνου υπολογίζεται η επί τοις % μεταβολή του χρώματος ως εξής:

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

A_{420}^{d0}: η αρχική μέτρηση απορρόφησης την ημέρα 0

Μεταβολές >70% δείχνουν πιθανότητα καστάνωσης (Κοτσερίδης, Καλλίθρακα & Προξενιά, 2017).

7.3.1.2. Κατασκευή καμπύλης μεταβολής

Για να γίνει ο προσδιορισμός της οξειδωσιμότητας κάθε δείγματος για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, οι ημέρες επώασης αντιστοιχίζονται με τις ημέρες απορροφήσεως σε ένα σύστημα αξόνων και προκύπτει μια καμπύλη μεταβολής της απορρόφησης στα 420 nm. Η γραμμή τάσης που δημιουργείται περιγράφεται από την εξίσωση της μορφής:

$$A_{420} = A_{420}^{0} + kt$$

A_{420}: η μεταβολή του χρώματος στον οίνο

k: ο συντελεστής του ρυθμού μεταβολής του χρώματος

t: το χρονικό διάστημα

Από την ευθεία υπολογίζεται ο συντελεστής k, ο οποίος υποδηλώνει την ταχύτητα μεταβολής του χρώματος στα 420 nm για κάθε δείγμα. Όσο πιο μικρή είναι η τιμή του συντελεστή k τόσο πιο αργά θα εμφανιστούν οι καφέ αποχρώσεις οξείδωσης (browning) του οίνου (Κοτσερίδης, Καλλίθρακα & Προξενιά, 2017).

7.3.2. Θειώδης ανυδρίτης (ολικός & ελεύθερος)

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του ολικού & ελεύθερου θειώδη ανυδρίτη χρησιμοποιήθηκε ο αυτόματος τιτλοδότης (Iodolyster).

7.3.2.1. Προετοιμασία δείγματος

Ελεύθερος θειώδης ανυδρίτης

Για να επιτευχθεί η μέτρηση του ελεύθερου θειώδους ανυδρίτη 20 ml του οίνου προς εξέταση μεταφέρθηκαν σε ποτήρι ζέσεως στο οποίο έγινε προσθήκη 2 ml H_2SO_4 (πυκνό διάλυμα H_2SO_4 αραιωμένο κατά το 1/3). Ακολούθησε η τοποθέτηση του δείγματος στον αυτόματο τιτλοδότη, όπου έγινε η τιτλοδότησή του με ιώδιο. Έπειτα από το τέλος της τιτλοδότησης, λήφθηκε η ένδειξη της προχοΐδας, και ο όγκος του ιωδίου, σε ml, που καταναλώθηκε στην τιτλοδότηση, αντιστοιχεί στη συγκέντρωση του ελεύθερου θειώδους ανυδρίτη του δείγματος, εκφρασμένη σε χιλιοστογραμμάρια ελεύθερου SO_2 ανά λίτρο (mg/L) (Κοτσερίδης & Προξενιά, 2020).

Ολικός θειώδης ανυδρίτης

Για να επιτευχθεί η μέτρηση του ολικού θειώδη ανυδρίτη χρειάζεται να γίνει η αποδέσμευση του δεσμευμένου SO_2 από την ακεταλδεΰδη που υπάρχει μέσα στον οίνο. Η αποδέσμευση αυτή μπορεί να πετύχει με τη μετατροπή του pH του οίνου σε ισχυρά αλκαλικό, που γίνεται με την προσθήκη συνήθως καυστικού νατρίου (NaOH). Μεταφέρθηκαν 20 ml οίνου σε ποτήρι ζέσεως και 2 ml NaOH (5N) όπου αναδεύτηκαν και παρέμειναν σε ηρεμία για 10 λεπτά. Έπειτα ακολούθησε η προσθήκη 4 ml H_2SO_4 (πυκνό H_2SO_4 αραιωμένο κατά 1/3) και το τελικό διάλυμα μεταφέρθηκε στον αυτόματο τιτλοδότη. Μετά τη λήξη της τιτλοδότησης με ιώδιο, έγινε λήψη της ένδειξης από την προχοΐδα. Ο όγκος του ιωδίου που καταναλώθηκε για την τιτλοδότηση του δείγματος αντικατοπτρίζει τη συγκέντρωση του ολικού θειώδους ανυδρίτη που υπάρχει στο δείγμα του οίνου, εκφρασμένη σε χιλιοστογραμμάρια ολικού SO_2 ανά λίτρο (mg/L) (Κοτσερίδης & Προξενιά, 2020).

7.3.3. Ολική ή ογκομετρούμενη οξύτητα

Ο προσδιορισμός της ολικής ή ογκομετρούμενης οξύτητας βασίζεται στην εξουδετέρωση των όξινων ομάδων που υπάρχουν στο δείγμα με πρότυπο διάλυμα αλκάλεως, παρουσία κάποιου δείκτη (Κοτσερίδης & Προξενιά, 2020).

7.3.3.1. Προετοιμασία δείγματος

Αρχικά, απομακρύνθηκε με αντλία κενού ο αέρας του οίνου ώστε να μην υπάρξει κάποια παρεμβολή στη μέτρηση από το CO_2. Σε μια κωνική φιάλη μεταφέρθηκαν 10 ml δείγματος, 30 ml απεσταγμένου νερού και μερικές σταγόνες δείκτη κυανού της βρωμοθυμόλης. Έπειτα τοποθετήθηκε στην προχοΐδα πρότυπο διάλυμα NaOH 0,1N, και έγινε η τιτλοδότηση με συνεχής ανάδευση του δείγματος. Η λήξη της τιτλοδότησης έγινε με την αλλαγή του χρώματος του δείγματος σε κυανοπράσινη χροιά. Ο αριθμός των καταλωθέντων ml (διαφορά αρχικής και τελικής τιμής) πολλαπλασιασμένος με 10 ορίζει την ολική οξύτητα εκφραζόμενη σε χιλιοστοϊσοδύναμα ανά λίτρο (meq/L), ενώ αν πολλαπλασιαστεί με 0,75 ορίζει την ολική οξύτητα εκφραζόμενη σε γραμμάρια τρυγικού οξέος ανά λίτρο (g/L) (Κοτσερίδης & Προξενιά, 2020).

7.3.4. Δείκτης φαινολικών ουσιών (ΔΦΟ)

7.3.4.1. Προετοιμασία δείγματος

Αρχικά, έγινε φυγοκέντρηση στο δείγμα, στα 4000 rpm για 5 λεπτά. Έπειτα, με ένα σιφώνιο μεταφέρθηκε 1 ml του δείγματος σε ογκομετρική φιάλη των 25 ml, όπου αραιώθηκε με απιονισμένο νερό μέχρι τη χαραγή της φιάλης. Στη συνέχεια, μεταφέρθηκε ποσότητα του αραιωμένου δείγματος σε κυψελίδες χαλαζία μήκους οπτικής διαδρομής 1 cm και μετρήθηκε η απορρόφηση σε μήκος κύματος 280 nm στο φασματοφωτόμετρο (Κοτσερίδης & Προξενιά, 2020). Ο ΔΦΟ προκύπτει από την ακόλουθη σχέση·

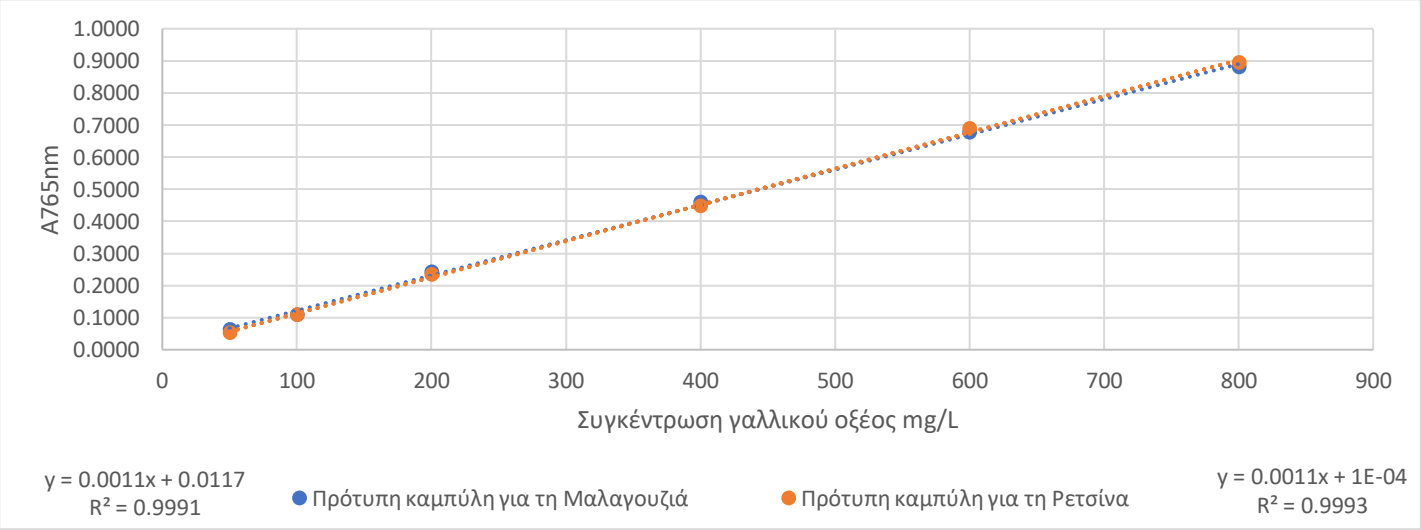
$$\text{ΔΦΟ} = \text{OD} * \text{Αραίωση δείγματος}$$

OD: Ένδειξη φασματοφωτόμετρου

7.3.5. Ολικά φαινολικά συστατικά – Μέθοδος Folin-Ciocalteau

7.3.5.1. Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης χρειάστηκε η αντιστοίχιση των συγκεντρώσεων των προτύπων διαλυμάτων με τις απορροφήσεις τους. Τα πρότυπα διαλύματα προέκυψαν από αραιώσεις του αρχικού πρότυπου διαλύματος γαλλικού οξέος 1 g/L. Συγκεκριμένα πάρθηκαν από το αρχικό πρότυπο διάλυμα 100, 200, 400, 800, 1200 και 1600 μL τα οποία αραιώθηκαν αντίστοιχα με 1900, 1800, 600, 1200, 800 και 400 μL απιονισμένου νερού σε Eppendorf των 2 ml. Σε δοκιμαστικούς σωλήνες τοποθετήθηκαν 2 ml απιονισμένου νερού, 50 μL από κάθε πρότυπο διάλυμα με τις παραπάνω συγκεντρώσεις (Πρότυπο διάλυμα με συγκεκριμένη συγκέντρωση ανά δοκιμαστικό σωλήνα), 250 μL αντιδραστηρίου Folin, 750 μL Na_2CO_3 20% και 1950 μL απιονισμένου νερού. Μετά από αυτές τις προσθήκες, έγινε ανάδευση των δοκιμαστικών σωλήνων στο vortex και παρέμειναν για 30 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος σε ηρεμία, για την ανάπτυξη του χρωμοφόρου. Στη συνέχεια μετρήθηκε η απορρόφησή τους στα 765 nm. Μετά την αντιστοίχιση των συγκεντρώσεων των πρότυπων διαλυμάτων με τις απορροφήσεις τους κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη (Διάγραμμα 3).



Διάγραμμα 3: Πρότυπες καμπύλες γαλλικού οξέος.

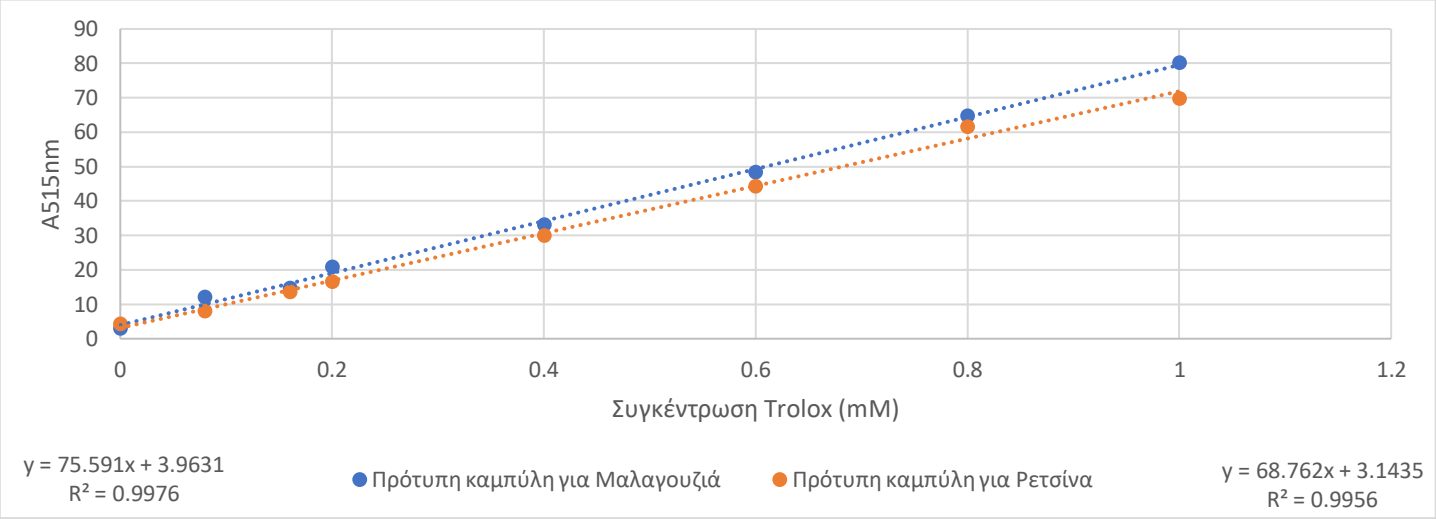
7.3.5.2. Προετοιμασία δείγματος

Σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες, εις διπλούν μεταφέρθηκαν 2 ml απιονισμένο νερό, 50 μL δείγματος, 250 μL αντιδραστηρίου Folin, 750 μL Na_2CO_3 20% και 1950 μL απιονισμένο νερό. Έπειτα από κάθε προσθήκη έγινε ανάδευση στο vortex. Στο τέλος, οι σωλήνες παρέμειναν για 30 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, σε ηρεμία ακόμα για την ανάπτυξη του χρωμοφόρου. Στη συνέχεια ακολούθησε η μέτρηση της απορρόφησης στα 765 nm, με μάρτυρα της μεθόδου να χρησιμοποιηθεί και η παραπάνω διαδικασία όπου αντί για το δείγμα προστέθηκε απιονισμένο νερό. Οι τιμές που ελήφθησαν από τις απορροφήσεις το δείγμα των αντιστοιχήθηκαν στο διάγραμμα με την πρότυπη καμπύλη αναφοράς.

7.3.6. Αντιοξειδωτική ικανότητα – Μέθοδος DPPH

7.3.6.1. Κατασκευή πρότυπης καμπύλης

Αρχικά κατασκευάζεται πρότυπο διάλυμα Trolox με συγκέντρωση 2mM σε αιθανόλη. Στη συνέχεια, σε Eppendorf δημιουργούνται οι συγκεντρώσεις 0, 0,08, 0,16, 0,20, 0,40, 0,60, 0,80 και 1,00 mM έπειτα από προσθήκη 0, 40, 80, 100, 200, 300, 400 και 500 μL από το πρότυπο διάλυμα Trolox και 1000, 960, 920, 900, 800, 700, 600 και 500 μL αιθανόλης αντίστοιχα. Έπειτα κάθε συγκέντρωση μεταφέρεται σε πλαστική κυβέττα φωτομέτρου και μετριέται η απορρόφησή της στα 515 nm. Επαναλαμβάνεται η μέτρηση της απορρόφησης, στο ίδιο μήκος κύματος μετά από μισή ώρα. Υπολογίζεται η ποσοστιαία διαφορά των δύο απορροφήσεων κάθε μίας συγκέντρωσης ($\%\Delta A_{515}$). Αντιστοιχίζοντας τις πρότυπες συγκεντρώσεις με τις απορροφήσεις $\%\Delta A_{515}$ κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη, και από την ευθεία που την περιγράφει υπολογίζεται η αντιοξειδωτική ικανότητα του κάθε δείγματος σε ισοδύναμα Trolox ή TEAC (Διάγραμμα 4).



Διάγραμμα 4: Πρότυπες καμπύλες συγκεντρώσεων σε Trolox (mM).

7.3.6.2. Προετοιμασία δειγμάτων

Τα δείγματα αραιώθηκαν 1:3 με απιονισμένο νερό και στη συνέχεια έγινε προσθήκη διαλύματος DPPH. Έγιναν 2 μετρήσεις απορροφήσεων στα 515 nm στο φωτόμετρο, με 30 λεπτά διαφορά η πρώτη από τη δεύτερη. Από τις ενδείξεις που ελήφθησαν υπολογίστηκε η ποσοστιαία διαφορά των απορροφήσεων ($\%\Delta A_{515}$) με τον εξής τύπο:

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

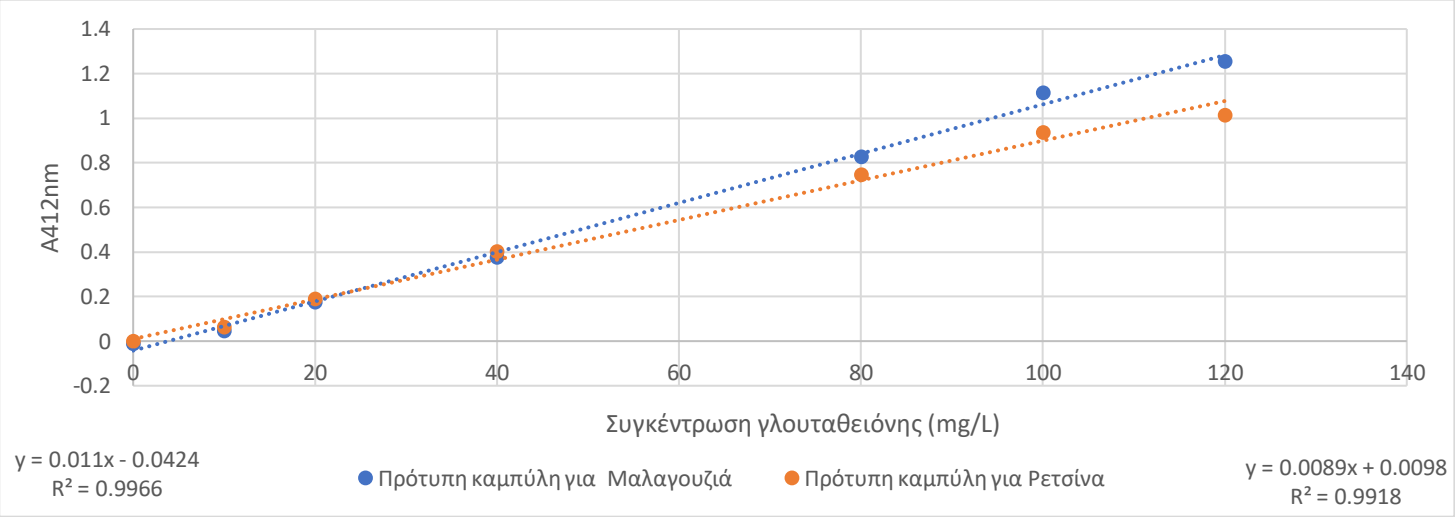
$A_{515}(t=x)$: η απορρόφηση του δείγματος στα 515 nm τον χρόνο t=x.

7.3.7. Ολικές ελεύθερες σουλφυδρυλομάδες (SH) – Μέθοδος Ellman

7.3.7.1. Κατασκευή καμπύλης αναφοράς

Προκειμένου να κατασκευαστεί η καμπύλη αναφοράς, χρειάστηκαν να δημιουργηθούν κάποιες συγκεντρώσεις από το πρότυπο διάλυμα γλουταθειόνης και του model wine (12% αιθανόλη και 5 g/L τρυγικό οξύ). Αναλυτικότερα σε Eppendorf των 2 ml μεταφέρθηκαν 0, 10, 20, 40, 80, 100 και 220 μL από το πρότυπο διάλυμα γλουταθειόνης, και συμπληρώθηκαν με 2000, 1990, 1980, 1960, 1920, 1900 και 1880 μL αντίστοιχα από το model wine. Στη συνέχεια 0,3 ml από κάθε συγκέντρωση

μεταφέρθηκαν σε κυψελίδες στένωσης, όπου έγινε η προσθήκη 0,8 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (K2HPO4/KH2PO4) 0,2M, pH=4, και 0,1 ml του διαλύματος DTNB. Παρέμειναν σε ηρεμία, για μια ώρα, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και έπειτα έγινε η μέτρηση της απορρόφησης στα 412 nm. Αντιστοιχίζοντας τη συγκέντρωση των προτύπων διαλυμάτων με τις απορροφήσεις κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη, και από την ευθεία που προκύπτει υπολογίζεται η συγκέντρωση των ομάδων -SH σε ισοδύναμα γλουταθειόνης (mg/L), λαμβάνοντας υπόψη την αραίωση που προηγήθηκε στο δείγμα (Διάγραμμα 5).



Διάγραμμα 5: Πρότυπες καμπύλες γλουταθειόνης.

7.3.7.2. Προετοιμασία δείγματος

Τα δείγματα, πρώτα, αραιώθηκαν 1:5 με model wine, και μεταφέρθηκαν από αυτά 0,3 ml σε κυψελίδες στένωσης, όπου έγινε η προσθήκη των 0,8 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών και του 0,1 ml του διαλύματος DTNB. Σαν μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν 0,3 ml κάθε δείγμα με 0,9 ml ρυθμιστικού διαλύματος. Μετά τις προσθήκες, και την αναμονή τους για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, μετρήθηκε η απορρόφησή τους στα 412 nm. Τέλος, για να γίνει ο μηδενισμός του οργάνου χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο νερό αντί για δείγμα τόσο στην περίπτωση με το διάλυμα DTNB όσο και για τον μάρτυρα.

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

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) καταφέρνει να πραγματοποιεί το διαχωρισμό του δείγματος με τη βοήθεια υγρής κινητής φάσης αποστείλει γεμάτη με την ακίνητη φάση σε μορφή στερεών κόκκων, με τη βοήθεια αντλίας. Η αλληλεπίδραση που προκύπτει μεταξύ των μορίων κατά τη μεταφορά τους στην κινητή φάση αυξάνεται, επιταχύνοντας το διαχωρισμό και κατά συνέπεια την ανάλυση. Στην παρούσα ερευνητική μελέτη η μέθοδος HPLC για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων των φαινολικών συστατικών, έγινε την ημέρα 0 και τη 12η μέρα της δειγματοληψίας με τη χρήση της HPLC αντίστροφης φάσης (RP-HPLC). Είναι η πιο διαδεδομένη εφαρμογή της HPLC, όπου ως ακίνητη φάση χρησιμοποιείται γέλη πυριτίου, στο οποίο έχουν προστεθεί αλειφατικές ομάδες, μακριάς αλύσου (C4, C8, C18) καθιστώντας την ακίνητη φάση υδρόφοβη. Ως κινητή φάση επιλέγεται ένας πολικός διαλύτης όπως είναι και η μεθανόλη (Kallithraka et al., 2001). Κάθε ένωση του δείγματος, της οποίας επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός από τις υπόλοιπες, ανιχνεύεται σε διαφορετικό χρόνο. Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκε στήλη C18. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η διήθηση των δειγμάτων από φίλτρο σύριγγας 0,22 μm. Ακολούθησε η ταυτοποίηση κι η ποσοτικοποίηση των συγκεντρώσεων φαινολικών συστατικών των δειγμάτων με τη μέθοδο HPLC. Η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών εκφράστηκαν σε χιλιοστογραμμάρια ανά λίτρο (mg/L).

7.3.9. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Σε κάθε πείραμα ταχείας οξείδωσης των δύο ποικιλιών, στη θερμοκρασία των 55ºC και για κάθε μία από τις αντιοξειδωτικές προσθήκες, πραγματοποιήθηκαν διπλές επαναλήψεις και υπολογίστηκαν οι μέσοι όροι των τιμών των αποτελεσμάτων. Επίσης, έγινε υπολογισμός της τυπικής απόκλισης κάθε τιμής.

Η στατιστική ανάλυση και επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος SPSS Statistics 21.0 της IBM. Για την εύρεση τιμών που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους χρησιμοποιήθηκαν η ανάλυση διασποράς με έναν παράγοντα (ANOVA) και η μέθοδος Tukey HSD με επίπεδο

σημαντικότητας 5% (0,05). Επομένως, οι τιμές με p-value < 0,05 χαρακτηρίστηκαν ως στατιστικά σημαντικές διάφορες.

8. Αποτελέσματα και Συζήτηση

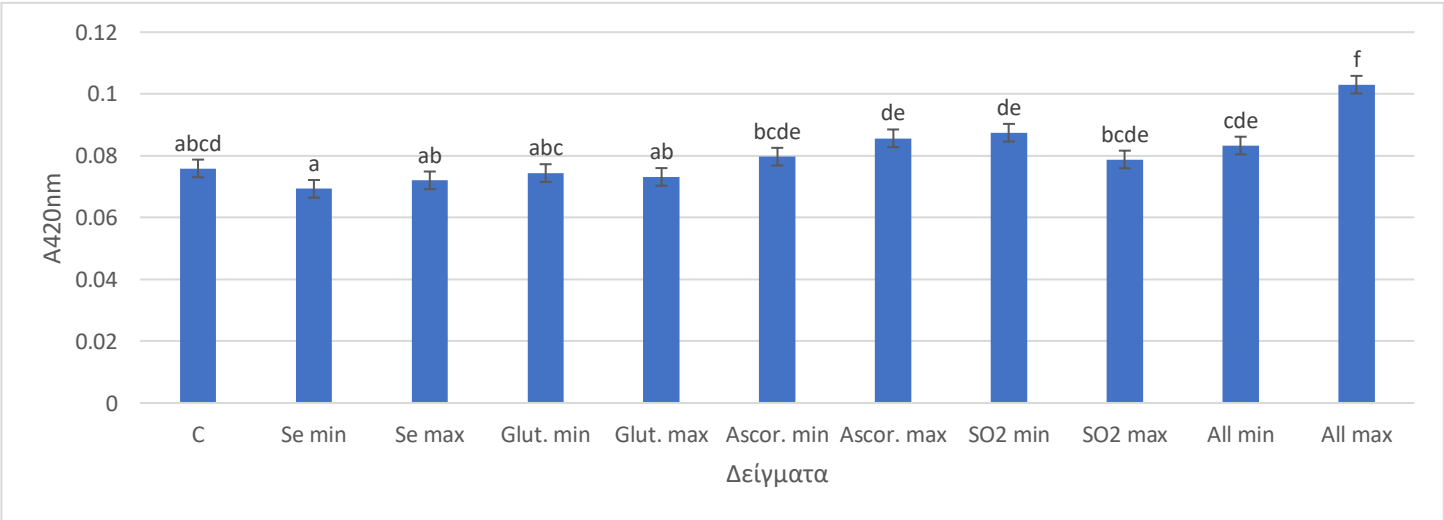
8.1. Απορρόφηση στα 420nm και δείκτης καστάνωσης

Οι οξειδωτικές αντιδράσεις που συμβαίνουν σε έναν οίνο εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες, με κύριο την παρουσία ελεύθερων ριζών OH. οι ελεύθερες ρίζες οξειδώνουν τα φαινολικά συστατικά και έπειτα ακολουθεί μια αλληλουχία αντιδράσεων με ασταθή ενδιάμεσα προϊόντα και σχηματισμό, στο τελικό στάδιο, πολυμερών καστανού χρώματος οδηγώντας σε γενική αλλαγή του χρώματος (καφέτιασμα – browning). Για να επιτευχθεί η οξείδωση και εμφάνιση καφετιάσματος των δειγμάτων και των δύο ποικιλιών, έπειτα από κάθε αντιοξειδωτική προσθήκη, μεταφέρθηκαν όλα τα δείγματα σε θερμοκρασία 55°C, και με τη βοήθεια φωτόμετρου καταγράφηκαν η απορρόφηση στους στα 420 nm ανά 24 ώρες, για 12 ημέρες. Το πείραμα της επιταχυνόμενης οξείδωσης που επιλέχθηκε βασίζεται στο αρχικό μοντέλο των Singleton & Kramling (1976), με κάποιες αλλαγές. Η σημαντικότητα της μέτρησης της απορρόφησης στα 420 nm των οίνων, οφείλεται στο ότι όσο υψηλότερη είναι η απορρόφηση τόσο μεγαλύτερη οξείδωση έχει υποστεί ο οίνος προς εξέταση.

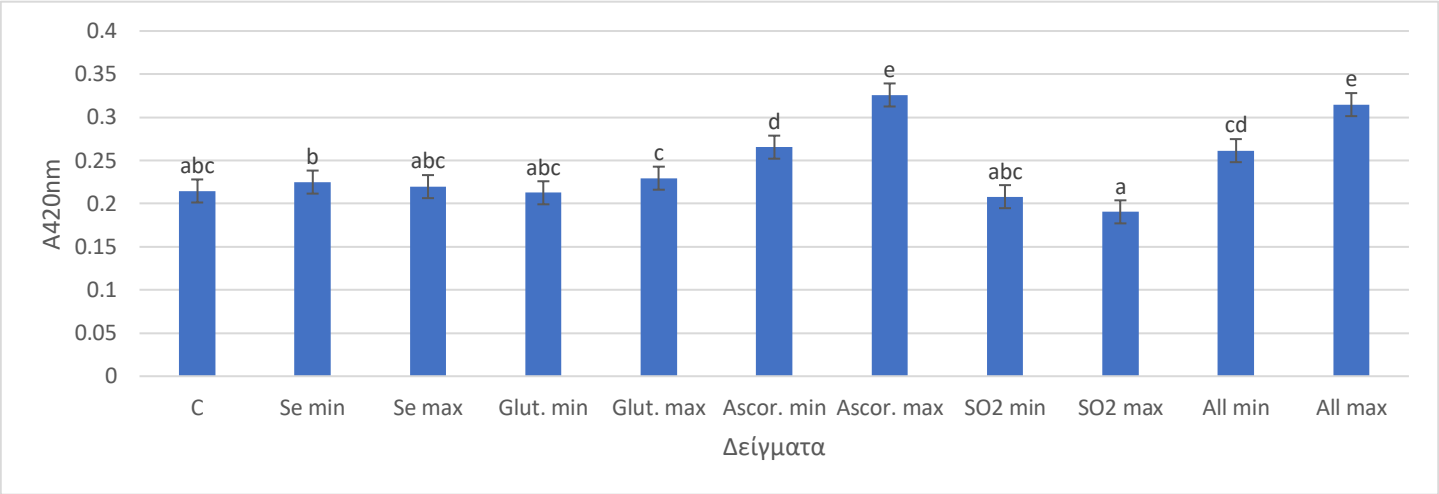
Στους Πίνακες 3 και 4, παρακάτω, καταγράφονται οι τιμές όλων των απορροφήσεων που ελήφθησαν από όλα τα δείγματα, και τις 12 ημέρες, για κάθε ποικιλία. Πρέπει να σημειωθεί ότι η στατιστική ανάλυση που έγινε στις τιμές ήταν σε επίπεδο σημαντικότητας 5% και η σύγκριση έγινε ανά ημέρα.

Πίνακας 3: Αποτελέσματα των απορροφήσεων στα 420 nm από το πείραμα επιταχυνόμενης οξείδωσης της ποικιλίας Μαλαγουζιά σε διάστημα των 12 ημερών. Όλες οι τιμές είναι εκφρασμένες σε nm.
Τιμές με διαφορετικό εκθέτη εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 5% μετά από σύγκριση ανά στήλη.

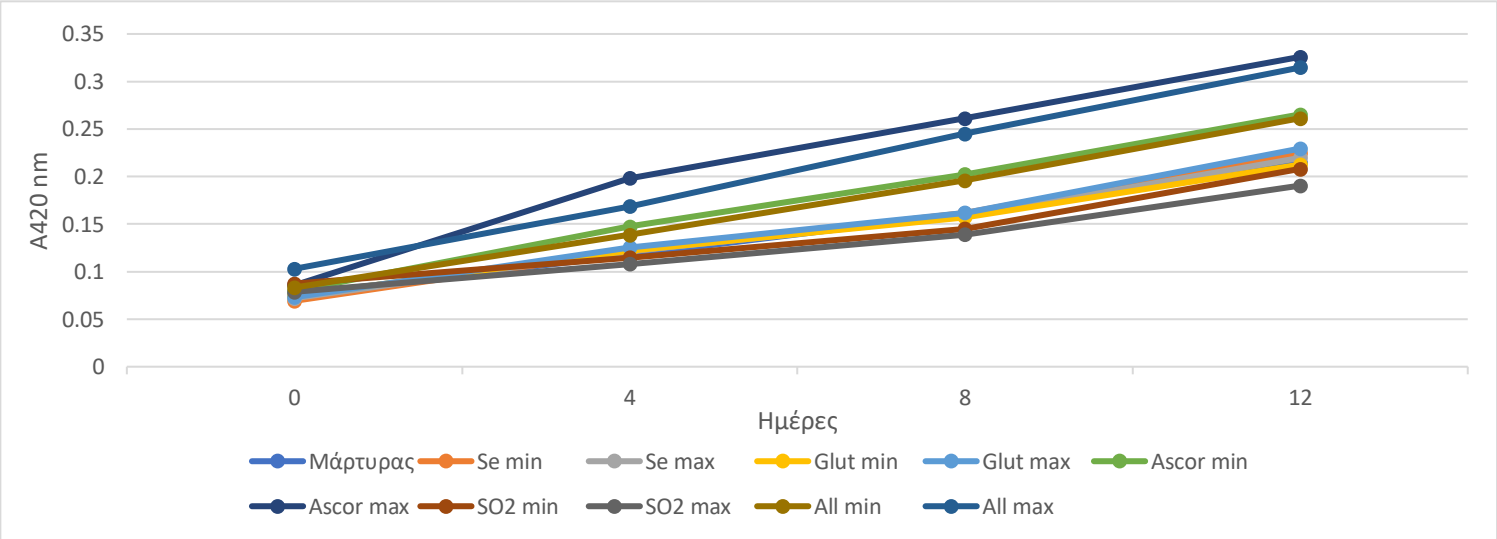
Μαλαγουζιά	Ημέρα 0	Ημέρα 1	Ημέρα 2	Ημέρα 3	Ημέρα 4	Ημέρα 5	Ημέρα 6	Ημέρα 7	Ημέρα 8	Ημέρα 9	Ημέρα 10	Ημέρα 11	Ημέρα 12
Μάρτυρας (Control)	0,07^{abcd} ±0,01	0,10^{bc} ±0,00	0,10^{a} ±0,00	0,11^{a} ±0,00	0,12^{a} ±0,00	0,15^{ab} ±0,01	0,14^{ab} ±0,00	0,26^{a} ±0,02	0,16^{ab} ±0,01	0,17^{a} ±0,01	0,18^{a} ±0,01	0,19^{ab} ±0,01	0,21^{abc} ±0,02
Se min	0,06^{a} ±0,00	0,10^{bc} ±0,00	0,10^{ab} ±0,00	0,11^{a} ±0,01	0,12^{ab} ±0,00	0,15^{b} ±0,00	0,14^{ab} ±0,00	0,26^{a} ±0,00	0,16^{ab} ±0,00	0,17^{a} ±0,00	0,19^{a} ±0,00	0,20^{ab} ±0,00	0,23^{b} ±0,00
Se max	0,07^{ab} ±0,00	0,10^{bc} ±0,00	0,10^{ab} ±0,00	0,12^{ab} ±0,00	0,12^{ab} ±0,00	0,15^{b} ±0,00	0,14^{ab} ±0,01	0,26^{a} ±0,00	0,16^{a} ±0,00	0,17^{a} ±0,00	0,19^{a} ±0,00	0,20^{ab} ±0,00	0,22^{abc} ±0,00
Glut. min	0,07^{abc} ±0,00	0,09^{ab} ±0,00	0,10^{a} ±0,00	0,12^{ab} ±0,00	0,12^{ab} ±0,00	0,15^{ab} ±0,00	0,14^{ab} ±0,00	0,26^{a} ±0,00	0,16^{a} ±0,00	0,17^{a} ±0,00	0,18^{a} ±0,00	0,19^{ab} ±0,00	0,21^{abc} ±0,00
Glut. max	0,07^{ab} ±0,00	0,09^{ab} ±0,00	0,11^{cd} ±0,01	0,13^{b} ±0,01	0,13^{b} ±0,00	0,16^{b} ±0,00	0,15^{b} ±0,00	0,27^{ab} ±0,00	0,16^{ab} ±0,00	0,18^{a} ±0,00	0,19^{a} ±0,01	0,21^{b} ±0,01	0,23^{c} ±0,00
Ascor. min	0,08^{bcde} ±0,00	0,10^{bc} ±0,00	0,12^{bc} ±0,00	0,14^{c} ±0,00	0,15^{c} ±0,00	0,18^{c} ±0,00	0,17^{c} ±0,00	0,30^{b} ±0,00	0,20^{c} ±0,00	0,22^{b} ±0,00	0,24^{b} ±0,01	0,25^{c} ±0,00	0,27^{d} ±0,01
Ascor. max	0,09^{de} ±0,00	0,10^{c} ±0,00	0,14^{e} ±0,01	0,18^{e} ±0,00	0,20^{e} ±0,01	0,24^{e} ±0,01	0,23^{d} ±0,01	0,36^{c} ±0,01	0,26^{d} ±0,01	0,28^{c} ±0,01	0,30^{c} ±0,02	0,31^{d} ±0,01	0,33^{e} ±0,02
SO_2 min	0,09^{de} ±0,00	0,09^{a} ±0,00	0,11^{ab} ±0,00	0,12^{ab} ±0,00	0,11^{a} ±0,00	0,14^{a} ±0,00	0,13^{ab} ±0,00	0,25^{a} ±0,00	0,14^{a} ±0,00	0,16^{a} ±0,00	0,18^{a} ±0,00	0,18^{ab} ±0,00	0,21^{abc} ±0,00
SO_2 max	0,08^{bcde} ±0,00	0,09^{a} ±0,00	0,10^{a} ±0,00	0,11^{a} ±0,00	0,11^{a} ±0,00	0,13^{a} ±0,00	0,13^{a} ±0,00	0,25^{a} ±0,00	0,14^{a} ±0,00	0,15^{a} ±0,00	0,17^{a} ±0,00	0,17^{a} ±0,00	0,19^{a} ±0,00
All min	0,08^{cde} ±0,00	0,10^{bc} ±0,00	0,12^{cd} ±0,00	0,14^{c} ±0,00	0,14^{c} ±0,00	0,17^{c} ±0,00	0,17^{c} ±0,00	0,29^{b} ±0,00	0,20^{c} ±0,00	0,22^{b} ±0,00	0,24^{b} ±0,00	0,24^{c} ±0,00	0,26^{cd} ±0,00
All max	0,10^{f} ±0,00	0,10^{abc} ±0,00	0,12^{cde} ±0,01	0,16^{d} ±0,00	0,17^{d} ±0,00	0,22^{d} ±0,00	0,22^{d} ±0,00	0,35^{c} ±0,00	0,24^{d} ±0,00	0,27^{c} ±0,01	0,29^{c} ±0,01	0,30^{d} ±0,01	0,31^{e} ±0,01



Διάγραμμα 6: Απορρόφηση στα 420 nm την ημέρα 0 για τη ποικιλία Μαλαγουζιά.



Διάγραμμα 7: Απορρόφηση στα 420 nm την ημέρα 12 για τη ποικιλία Μαλαγουζιά.



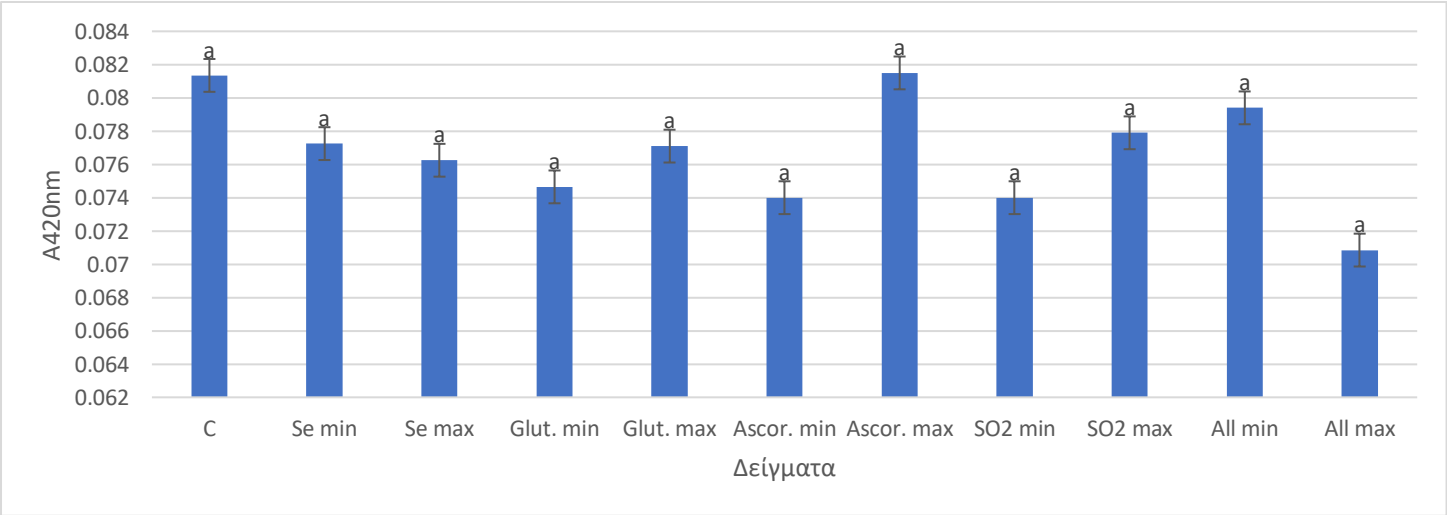
Διάγραμμα 8: Μεταβολή των απορροφήσεων από την ημέρα 0 έως τη 12 για τη ποικιλία Μαλαγουζιά.

Στον Πίνακα 3 αλλά και στα Διαγράμματα 6,7 και 8 παρατηρείται μία αύξηση της απορρόφησης στα 420 nm, καθ` όλη τη διάρκεια του πειράματος, κάτι που είναι αναμενόμενο εξαιτίας της έκθεσης του οίνου στη θερμοκρασία των 55°C, που οδηγεί αναπόφευκτα σε οξείδωση και εμφάνιση καφετιάσματος, ανεξαρτήτου του είδους αντιοξειδωτικής προστασίας που έχει προστεθεί (Milat et al., 2019). Τα αποτελέσματα συμφωνούν με τη μελέτη των Kanavouras et al. (2020), στην οποία και εκείνοι χρησιμοποίησαν την ποικιλία της Μαλαγουζιάς σε πείραμα επιταχυνόμενης οξείδωσης, απλά σε μικρότερη θερμοκρασία.

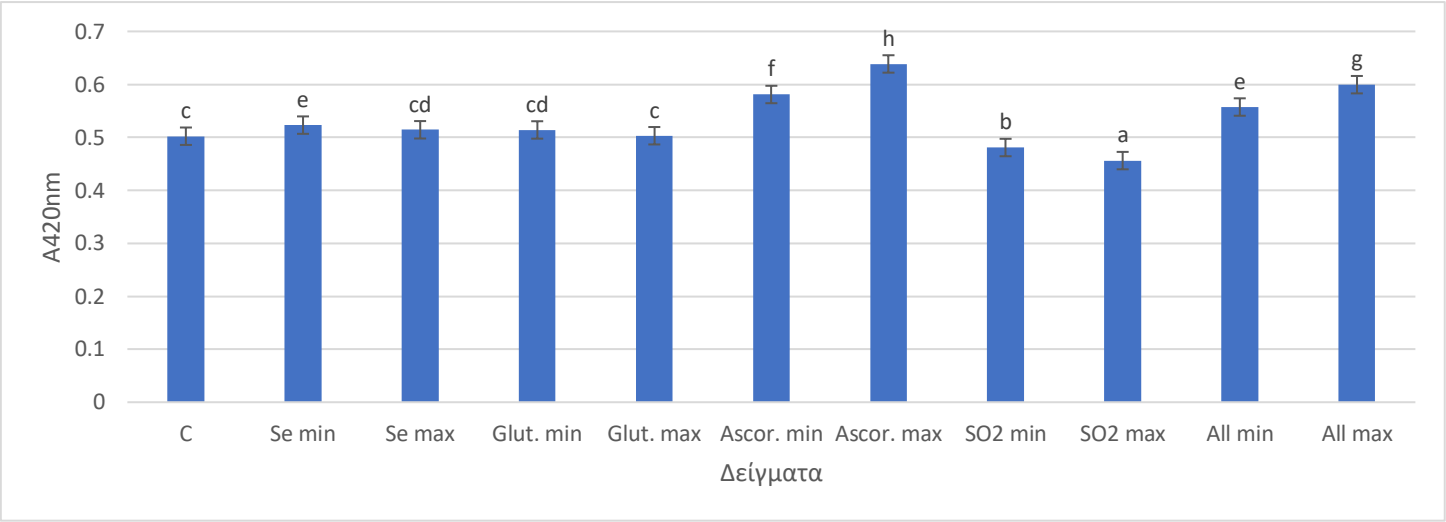
Αναλυτικότερα, σύμφωνα με τα στοιχεία από τον Πίνακα 3, τα δείγματα που τους είχε προστεθεί Potassium Metabisulfite, κυρίως εκείνο με τη μεγαλύτερη προσθήκη (SO_2 max) εμφάνισαν την μικρότερη αύξηση της απορρόφησης, συγκριτικά με τα υπόλοιπα δείγματα. Μία μεγαλύτερη αύξηση στην απορρόφηση, κατά αύξουσα τιμή, παρουσίασαν τα δείγματα Glut min, Μάρτυρας, Se min, Se max και Glut max. Τέλος, τα δείγματα με τη μικρή και μεγάλη συγκέντρωση του ασκορβικού οξέος αλλά και εκείνα με όλες τις προσθήκες των αντιοξειδωτικών εμφάνισαν τη μεγαλύτερη αύξηση στην απορρόφηση. Από την ημέρα 1, όπως φαίνεται στον Πίνακα 3, τα δείγματα SO_2 min και SO_2 max άρχισαν να εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά, σε επίπεδο σημαντικότητας 5%, από τα περισσότερα δείγματα, ενώ τη $12^{η}$ ημέρα (Διάγραμμα 7) δεν διέφεραν από τα δείγματα Μάρτυρας Se max και Glut min. Από την άλλη μεριά,m παρατηρήθηκε μια στατιστική συσχέτιση μεταξύ των δειγμάτων Ascror min και All min αλλά και μεταξύ των Ascor max και All max (Διάγραμμα7).

Πίνακας 4: Αποτελέσματα των απορροφήσεων στα 420 nm από το πείραμα επιταχυνόμενης οξείδωσης της ποικιλίας Ρετσίνα σε διάστημα των 12 ημερών. Όλες οι τιμές είναι εκφρασμένες σε nm.
Τιμές με διαφορετικό εκθέτη εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 5% μετά από σύγκριση ανά στήλη.

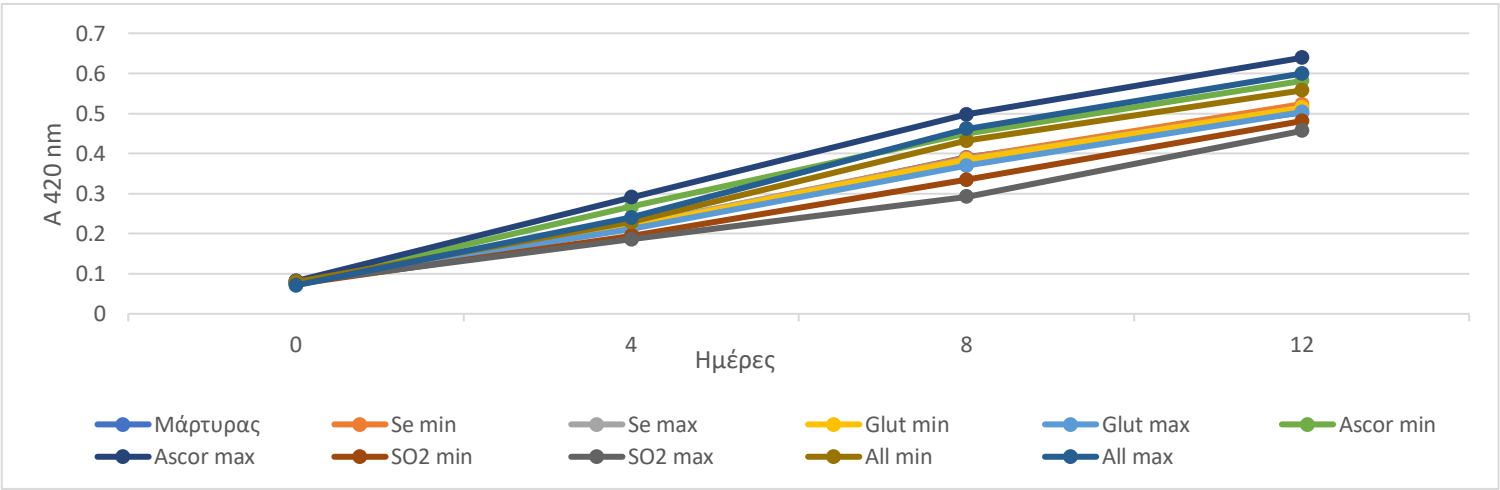
Ρετσίνα	Ημέρα 0	Ημέρα 1	Ημέρα 2	Ημέρα 3	Ημέρα 4	Ημέρα 5	Ημέρα 6	Ημέρα 7	Ημέρα 8	Ημέρα 9	Ημέρα 10	Ημέρα 12
Μάρτυρας (Control)	0,08^{a} ±0,00	0,13^{bc} ±0,00	0,15^{de} ±0,01	0,19^{cde} ±0,00	0,21^{bc} ±0,02	0,25^{c} ±0,005	0,28^{c} ±0,00	0,36^{b} ±0,01	0,39^{c} ±0,01	0,44^{de} ±0,00	0,46^{a} ±0,00	0,50^{c} ±0,00
Se min	0,08^{a} ±0,00	0,14^{d} ±0,00	0,15^{e} ±0,00	0,19^{cde} ±0,00	0,22^{c} ±0,00	0,25^{c} ±0,00	0,28^{c} ±0,00	0,36^{bc} ±0,00	0,39^{c} ±0,00	0,43^{de} ±0,00	0,47^{a} ±0,00	0,52^{e} ±0,00
Se max	0,08^{a} ±0,00	0,14^{cd} ±0,01	0,15^{e} ±0,00	0,19^{cde} ±0,00	0,22^{c} ±0,00	0,25^{c} ±0,00	0,27^{c} ±0,00	0,36^{bc} ±0,00	0,39^{c} ±0,01	0,44^{e} ±0,00	0,46^{a} ±0,00	0,51^{dc} ±0,00
Glut. min	0,07^{a} ±0,00	0,13^{cd} ±0,00	0,15^{de} ±0,00	0,19^{cde} ±0,00	0,22^{c} ±0,00	0,25^{c} ±0,00	0,26^{bc} ±0,01	0,35^{b} ±0,00	0,38^{c} ±0,00	0,44^{de} ±0,01	0,47^{a} ±0,00	0,51^{dc} ±0,00
Glut. max	0,08^{a} ±0,00	0,12^{b} ±0,00	0,14^{cd} ±0,00	0,18^{bc} ±0,00	0,21^{bc} ±0,00	0,24^{c} ±0,00	0,25^{b} ±0,00	0,34^{b} ±0,00	0,37^{c} ±0,00	0,42^{cd} ±0,00	0,45^{a} ±0,00	0,50^{c} ±0,00
Ascor. min	0,07^{a} ±0,00	0,12^{ab} ±0,00	0,14^{d} ±0,00	0,2^{de} ±0,01	0,27^{e} ±0,00	0,34^{f} ±0,00	0,35^{e} ±0,00	0,43^{e} ±0,01	0,45^{d} ±0,00	0,50^{fg} ±0,00	0,54^{a} ±0,00	0,58^{f} ±0,01
Ascor. max	0,08^{a} ±0,00	0,11^{a} ±0,00	0,14^{de} ±0,00	0,21^{e} ±0,00	0,29^{f} ±0,01	0,35^{g} ±0,00	0,38^{f} ±0,00	0,47^{f} ±0,00	0,50^{e} ±0,00	0,56^{e} ±0,00	0,59^{a} ±0,00	0,64^{h} ±0,00
SO_2 min	0,07^{a} ±0,00	0,11^{a} ±0,00	0,13^{bcd} ±0,00	0,16^{ab} ±0,00	0,19^{ab} ±0,00	0,23^{b} ±0,00	0,21^{a} ±0,01	0,29^{a} ±0,01	0,33^{b} ±0,01	0,40^{b} ±0,01	0,43^{a} ±0,00	0,48^{b} ±0,00
SO_2 max	0,08^{a} ±0,00	0,11^{a} ±0,00	0,12^{ab} ±0,01	0,16^{a} ±0,00	0,19^{a} ±0,00	0,22^{a} ±0,00	0,20^{a} ±0,00	0,27^{a} ±0,00	0,29^{a} ±0,01	0,37^{a} ±0,01	0,41^{a} ±0,00	0,46^{a} ±0,01
All min	0,08^{a} ±0,00	0,11^{a} ±0,00	0,11^{a} ±0,00	0,18^{bcd} ±0,00	0,23^{cd} ±0,001	0,30^{d} ±0,00	0,31^{d} ±0,01	0,39^{cd} ±0,02	0,43^{d} ±0,01	0,48^{f} ±0,01	0,50^{a} ±0,01	0,56^{e} ±0,01
All max	0,07^{a} ±0,01	0,11^{a} ±0,00	0,12^{ab} ±0,01	0,17^{abc} ±0,02	0,24^{d} ±0,01	0,33^{e} ±0,00	0,35^{e} ±0,01	0,42^{de} ±0,01	0,46^{d} ±0,01	0,51^{g} ±0,01	0,54^{a} ±0,01	0,60^{g} ±0,00



Διάγραμμα 9: Απορρόφηση στα 420 nm την ημέρα 0 για τη ποικιλία Ρετσίνα.



Διάγραμμα 10: Απορρόφηση στα 420 nm την ημέρα 12 για τη ποικιλία Ρετσίνα.



Διάγραμμα 11: Μεταβολή των απορροφήσεων από την ημέρα 0 έως τη 12 για τη ποικιλία Ρετσίνα.

Στον Πίνακα 4 παρατίθενται τα αποτελέσματα των απορροφήσεων στα 420 nm από το πείραμα της επιταχυνόμενης οξείδωσης στην ποικιλία της Ρετσίνας. Παρατηρείται μια συνεχώς ανοδική αύξηση των τιμών των απορροφήσεων, ανεξάρτητα από τις προσθήκες των αντιοξειδωτικών, από την ημέρα 1 μέχρι και την ημέρα 12. Μία αιτία που πιθανώς οδήγησε στην τόση άμεση εμφάνιση καφετιάσματος όλων των δειγμάτων, μπορεί να είναι η παρουσία του ρετσινιού μες τα δείγματα, το οποίο επιβεβαιώνεται και από έρευνα που είχε κάνει ο Κουτσούρης (2018), όπου κατέληξε πως τα δείγματα που εξέταζε, στα οποία είχε γίνει προσθήκη ρετσινιού, εμφάνισαν μεγαλύτερο βαθμό

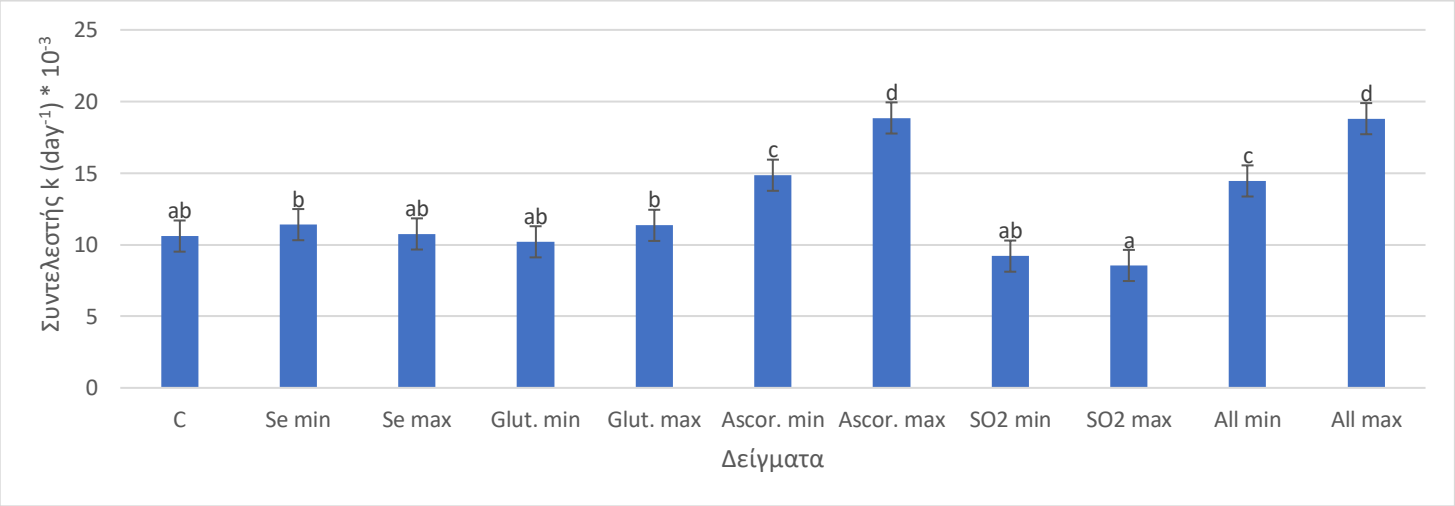
οξείδωσης, και κατά συνέπεια καφέτιασμα. Στο Διάγραμμα 9 απεικονίζονται οι απορροφήσεις την ημέρα 0 όλων των δειγμάτων, η οποίες δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5%. Στο Διάγραμμα 10, καταγράφονται οι απορροφήσεις των δειγμάτων την τελευταία μέρα του πειράματος. Τα δείγματα SO_2 max και SO_2 min ήταν εκείνα με τις μικρότερες τιμές, με το πρώτο να διαφέρει στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5%, από όλα τα υπόλοιπα δείγματα του πειράματος. Επιπλέον, τα δείγματα Ascor min, Ascor max, Se min, All min και All max ήταν εκείνα με τις μεγαλύτερες απορροφήσεις, τα οποία και αυτά διέφεραν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5% μεταξύ τους (όχι το Se min με το All min) αλλά και από τα υπόλοιπα δείγματα. Τις αμέσως μεγαλύτερες τιμές απορροφήσεων, μετά από εκείνες των δειγμάτων στα οποία είχε γίνει προσθήκη θειώδους, είχε ο μάρτυρας (C) και το δείγμα Glut max. Στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδο σημαντικότητας 5% δεν εμφάνισαν μεταξύ τους τα δείγματα Glut min και Se max. Τέλος, γίνεται κατανοητό από το Διάγραμμα 11 ότι κατά τη διάρκεια του πειράματος τη μεγαλύτερη μεταβολή στο χρώμα και κατά συνέπεια την μεγαλύτερη κλίση είχε το δείγμα Ascor max ενώ αντίστοιχα τη μικρότερη το δείγμα SO_2 max.

Για να μπορέσει να γίνει εκτίμηση της οξειδωσιμότητας για κάθε δείγμα χρειάζεται να γίνει αντιστοίχιση μεταξύ των απορροφήσεων και των ημερών επώασης ώστε να μπορέσει να υπολογιστεί ο συντελεστής του ρυθμού μεταβολής του χρώματος (k). Ο συγκεκριμένος συντελεστής χαρακτηρίζει την ταχύτητα μεταβολής του χρώματος στα 420 nm και όσο μικρότερη τιμή έχει συντελεστής τόσο πιο αργά θα εμφανιστούν οι καφέ αποχρώσεις οξείδωσης του οίνου που είναι προς εξέταση.

Στους Πίνακες 5 και 6 παρατίθονται οι συντελεστές k για κάθε προσθήκη και για κάθε ποικιλία μετά τον υπολογισμό τους από τις απορροφήσεις των 12 ημερών. Επιπλέον στους Πίνακες 7 και 8 αναφέρονται οι επί τις εκατό μεταβολές του χρώματος των δειγμάτων ($\%\Delta A_{420}$).

Πίνακας 5: Αποτελέσματα από την εκτίμηση του συντελεστή του ρυθμού μεταβολής του χρώματος (k) στο πείραμα της επιταχυνόμενης οξείδωσης της ποικιλίας Μαλαγουζιά για 12 ημέρες.
Τιμές με διαφορετικό εκθέτη εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 5% μετά από σύγκριση ανά στήλη.

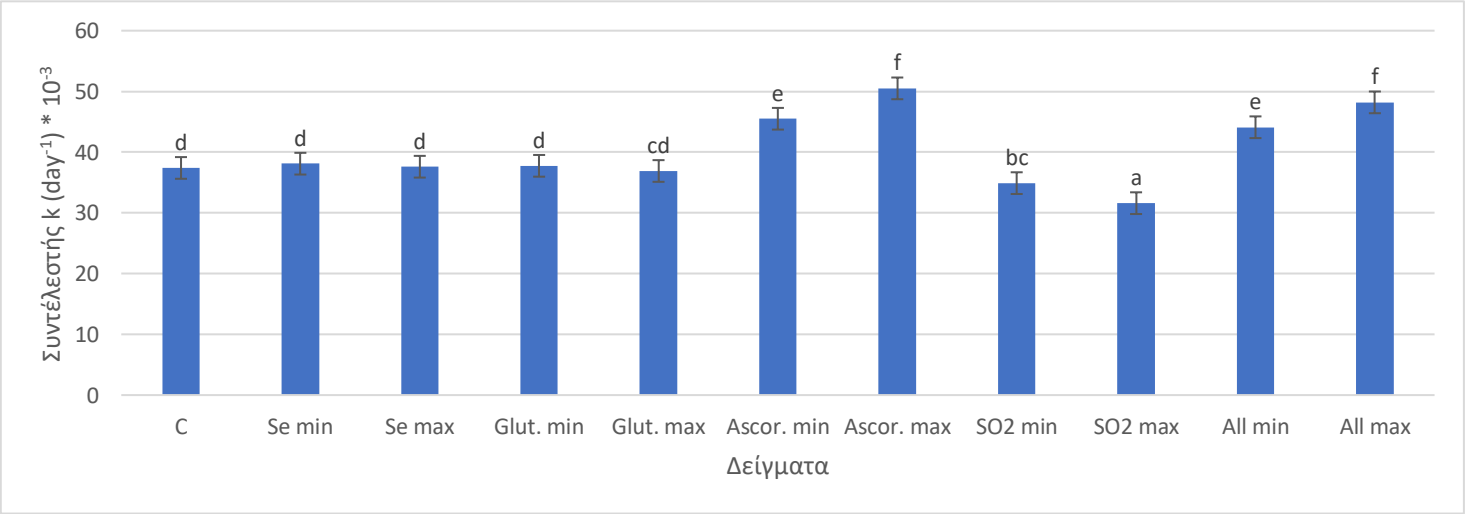
Δείγματα Μαλαγουζιάς	**Συντελεστής ρυθμού μεταβολής χρώματος (k)** $k\ (day^{-1}) * 10^{-3}$
Μάρτυρας	$10{,}60^{ab} \pm 0{,}00$
Se min	$11{,}40^{b} \pm 0{,}00$
Se max	$10{,}75^{ab} \pm 0{,}00$
Glut min	$10{,}20^{ab} \pm 0{,}00$
Glut max	$11{,}35^{b} \pm 0{,}00$
Ascor min	$14{,}85^{c} \pm 0{,}00$
Ascor max	$18{,}85^{d} \pm 0{,}00$
SO_2 min	$9{,}20^{ab} \pm 0{,}00$
SO_2 max	$8{,}55^{a} \pm 0{,}00$
All min	$14{,}45^{c} \pm 0{,}00$
All max	$18{,}80^{d} \pm 0{,}00$



Διάγραμμα 12: Συντελεστής ρυθμού μεταβολής χρώματος (k) στο πείραμα της επιταχυνόμενης οξείδωσης της ποικιλίας Μαλαγουζιά για 12 ημέρες.

Πίνακας 6: Αποτελέσματα από την εκτίμηση του συντελεστή του ρυθμού μεταβολής του χρώματος (k) στο πείραμα της επιταχυνόμενης οξείδωσης της ποικιλίας Ρετσίνα για 12 ημέρες.
Τιμές με διαφορετικό εκθέτη εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 5% μετά από σύγκριση ανά στήλη.

Δείγματα Ρετσίνας	**Συντελεστής ρυθμού μεταβολής χρώματος (k)** $k\ (day^{-1}) * 10^{-3}$
Μάρτυρας	$37{,}40^{d} \pm 0{,}00$
Se min	$38{,}10^{d} \pm 0{,}00$
Se max	$37{,}60^{d} \pm 0{,}00$
Glut min	$37{,}75^{d} \pm 0{,}00$
Glut max	$36{,}90^{cd} \pm 0{,}00$
Ascor min	$45{,}50^{e} \pm 0{,}00$
Ascor max	$50{,}50^{f} \pm 0{,}00$
SO_2 min	$34{,}90^{bc} \pm 0{,}00$
SO_2 max	$31{,}60^{a} \pm 0{,}00$
All min	$44{,}10^{e} \pm 0{,}00$
All max	$48{,}20^{f} \pm 0{,}00$

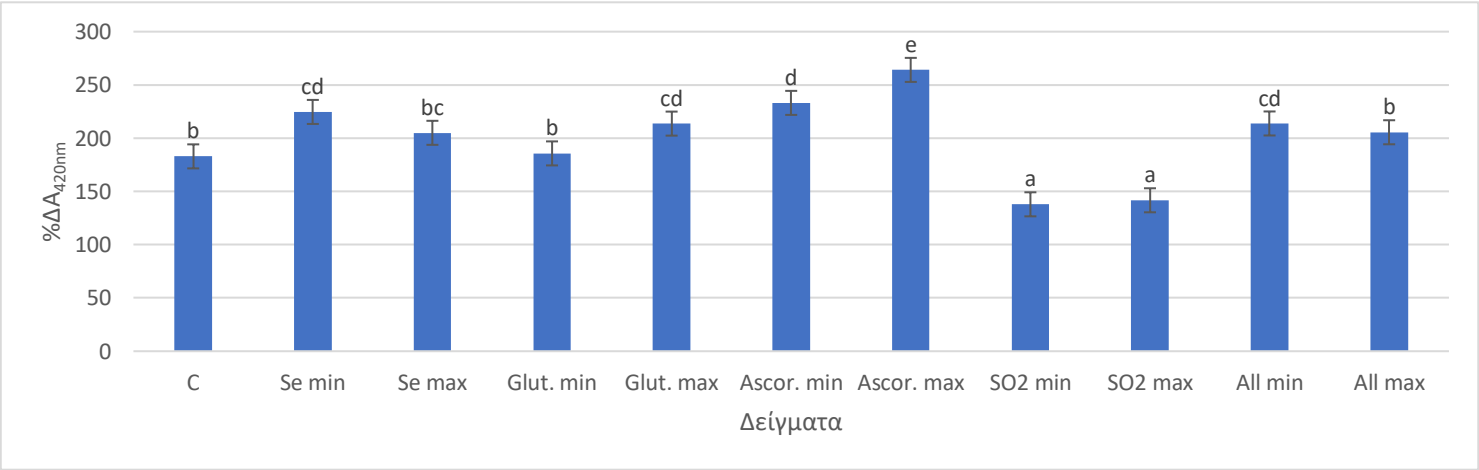


Διάγραμμα 13: Συντελεστής ρυθμού μεταβολής χρώματος (k) στο πείραμα της επιταχυνόμενης οξείδωσης της ποικιλίας Ρετσίνα για 12 ημέρες.

Πίνακας 7: Αποτελέσματα από την εκτίμηση της επί τις εκατό μεταβολής του χρώματος (***%ΔΑ*$_{420\ nm}$**)στο πείραμα της επιταχυνόμενης οξείδωσης της ποικιλίας Μαλαγουζιά για 12 ημέρες.

Τιμές με διαφορετικό εκθέτη εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 5% μετά από σύγκριση ανά στήλη.

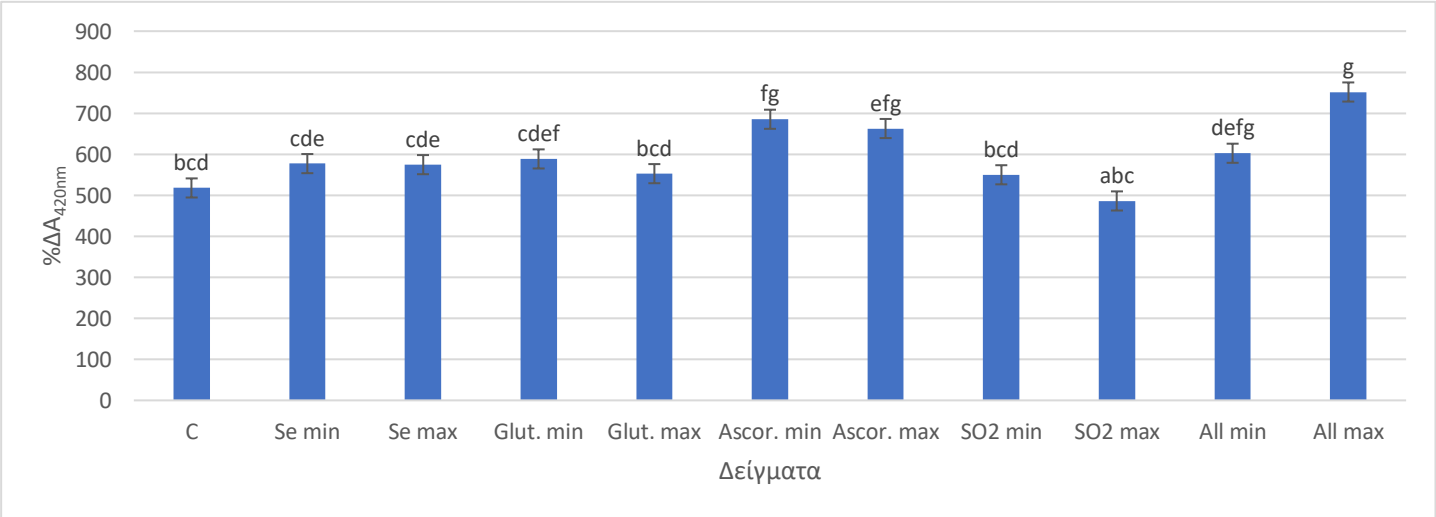
Δείγματα Μαλαγουζιάς	**%ΔΑ$_{420\ nm}$**
Μάρτυρας	$182{,}90^{b} \pm 2{,}10$
Se min	$224{,}63^{cd} \pm 6{,}07$
Se max	$205{,}01^{bc} \pm 9{,}22$
Glut min	$185{,}70^{b} \pm 8{,}59$
Glut max	$213{,}67^{cd} \pm 5{,}79$
Ascor min	$233{,}11^{d} \pm 14{,}01$
Ascor max	$264{,}10^{e} \pm 4{,}02$
SO_2 min	$137{,}91^{a} \pm 1{,}20$
SO_2 max	$141{,}69^{a} \pm 2{,}57$
All min	$213{,}80^{cd} \pm 3{,}49$
All max	$205{,}55^{b} \pm 1{,}39$



Διάγραμμα 14: Επί τις εκατό μεταβολής του χρώματος (***%ΔΑ*$_{420\ nm}$**) στο πείραμα της επιταχυνόμενης οξείδωσης της ποικιλίας Μαλαγουζιά για 12 ημέρες.

Πίνακας 8: Αποτελέσματα από την εκτίμηση της επί τις εκατό μεταβολής του χρώματος (***%ΔΑ420 nm***)στο πείραμα της επιταχυνόμενης οξείδωσης της ποικιλίας Ρετσίνα για 12 ημέρες.
Τιμές με διαφορετικό εκθέτη εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 5% μετά από σύγκριση ανά στήλη.

Δείγματα Ρετσίνας	**%ΔΑ420 nm**
Μάρτυρας	$517{,}81^{bcd} \pm 27{,}73$
Se min	$577{,}17^{cde} \pm 8{,}41$
Se max	$574{,}61^{cde} \pm 11{,}84$
Glut min	$588{,}57^{cdef} \pm 4{,}12$
Glut max	$552{,}66^{bcd} \pm 17{,}39$
Ascor min	$685{,}22^{fg} \pm 23{,}03$
Ascor max	$662{,}67^{efg} \pm 54{,}04$
SO_2 min	$549{,}91^{bcd} \pm 16{,}34$
SO_2 max	$486{,}10^{abc} \pm 22{,}10$
All min	$602{,}40^{defg} \pm 32{,}66$
All max	$751{,}71^{g} \pm 19{,}75$



Διάγραμμα 15: Επί τις εκατό μεταβολής του χρώματος (***%ΔΑ420 nm***)στο πείραμα της επιταχυνόμενης οξείδωσης της ποικιλίας Ρετσίνα για 12 ημέρες.

Για τον υπολογισμό των συντελεστών k αλλά και των επί τις εκατό μεταβολών του χρώματος (%ΔΑ420 nm), όλων των δειγμάτων και για τις 2 ποικιλίες χρησιμοποιήθηκαν οι τύποι υπολογισμού που παρατέθηκαν στο Κεφάλαιο 7. 3.1..

Όσον αφορά τα αποτελέσματα τον υπολογισμό των συντελεστών k, για την ποικιλία της Μαλαγουζιάς, φαίνεται πως συμφωνούν με τα αποτελέσματα των απορροφήσεων. Συγκεκριμένα, τα δείγματα SO_2 min και SO_2 max εμφανίζουν τις μικρότερες τιμές, και κατά συνέπεια τη μικρότερη μεταβολή στο χρώμα, ενώ δεν διαφέρουν στατιστικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5% από τους συντελεστές των δειγμάτων Μάρτυρα, Se max

και Glut min (Πίνακας 5). Επιπλέον, εμφανίζεται πάλι και στο Διάγραμμα 12, η στατιστική συσχέτιση σε επίπεδο σημαντικότητας 5%, μεταξύ των δειγμάτων Ascor min και All min αλλά και μεταξύ των δειγμάτων Ascor max και All max. Στις επί τις εκατό μεταβολές του χρώματος (%ΔA_{420} nm), τα δείγματα SO_2 min και SO_2 max είχαν το μικρότερο ποσοστό, όμως παρατηρήθηκε ότι το δείγμα All max δεν διαφέρει στατιστικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5% από τα δείγματα C, Se max και Glut min. Τέλος, όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 14, το δείγμα Acor max έχει τη μεγαλύτερη επί τις εκατό μεταβολή του χρώματος (%ΔA_{420} nm) στο πείραμα. Τέλος, σε όλα τα δείγματα η επί τις εκατό μεταβολή του χρώματος είναι > του 70% άρα εμφανίζουν πιθανότητα καστάνωσης (Κοτσερίδης, Καλλίθρακα & Προξενιά, 2017).

Αντίστοιχα, οι συντελεστές k των δειγμάτων της Ρετσίνας (Πίνακας 7) φαίνεται πως και εκείνοι συμφωνούν με τα αποτελέσματα των απορροφήσεων παραπάνω. Αναλυτικότερα, τους μικρότερους συντελεστές καστάνωσης έχουν τα δείγματα SO_2 max και SO_2 min, με το SO_2 max να διαφέρει στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5% από όλα τα υπόλοιπα δείγματα. Το δείγμα Glut max είναι εκείνο με τον αμέσως μεγαλύτερο συντελεστή k, ενώ τα δείγματα C, Se min, Se max και Glut min δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Τέλος, όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 13, τα δείγματα Ascor max και All max έχουν τις μεγαλύτερες τιμές των συντελεστών k και διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5% με όλα τα υπόλοιπα δείγματα, αλλά όχι μεταξύ τους. Το ίδιο συμβαίνει και με τα δείγματα Ascor min και All min. Στις επί τις εκατό μεταβολές του χρώματος (%ΔA_{420} nm) όλα τα δείγματα εμφάνισαν πολύ υψηλές τιμές, με το δείγμα SO_2 max να έχει και πάλι τη μικρότερη. Η μόνη αλλαγή που παρατηρήθηκε συγκριτικά με τις απορροφήσεις και το υπολογισμό του συντελεστή k, είναι πως η επί τις εκατό μεταβολή του χρώματος (%ΔA_{420} nm) του δείγματος C ήταν μικρότερη από εκείνη του δείγματος SO_2 min. Τα δείγματα C, Se min, Se max, Glut min, Glut max και SO_2 min δεν διέφεραν μεταξύ τους στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5%. Τέλος, τη μεγαλύτερη επί τις εκατό μεταβολή του χρώματος (%ΔA_{420} nm) την είχε το δείγμα All max, το οποίο διέφερε στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5% από όλα τα δείγματα, εκτός των Ascor min, Ascor max και All max. Και στη Ρετσίνα, σε όλα τα δείγματα, η επί τις εκατό μεταβολή του χρώματος είναι > του 70% άρα εμφανίζουν πιθανότητα καστάνωσης (Κοτσερίδης, Καλλίθρακα & Προξενιά, 2017).

Συμπερασματικά, και οι δύο ποικιλίες εμφάνισαν καφέτιασμα κατά τη διάρκεια του πειράματος της επιταχυνόμενης οξείδωσης, με την ποικιλία της Μαλαγουζιάς να είναι εκείνη με τις μικρότερες τιμές, τους μικρότερους συντελεστές k και τις μικρότερες επί τις εκατό μεταβολές του χρώματος (%ΔA_{420} nm), συγκριτικά με τη Ρετσίνα. Παρ `όλα αυτά, πρέπει να συνυπολογιστεί και ο παράγοντας του ρετσινιού, το οποίο κατά τη θέρμανση αυξάνει τις κίτρινες αποχρώσεις στους οίνους και κατά συνέπεια την εμφάνιση καφετιάσματος (Pavon et al., 2021). Εν κατακλείδι, παρατηρήθηκε και στις δύο ποικιλίες πώς τα δείγματα τα οποία είχαν προσθήκη ασκορβικού οξέος, μόνο του ή και με άλλα αντιοξειδωτικά, εμφάνισαν πιο γρήγορα και σε μεγαλύτερο βαθμό οξειδωτικό καφέτιασμα, συγκριτικά με τα υπόλοιπα δείγματα.

8.2. Θειώδης ανυδρίτης (ολικός & ελεύθερος)

Η παρουσία του θειώδη ανυδρίτη σε ένα υδατο αλκοολικό διάλυμα όπως είναι ο οίνος οδηγεί στην αντίδραση του με το νερό και στην εμφάνιση νέων ενώσεων όπως τα ανιόντα του εξουδετερωμένου θειώδους οξέος. Οι δύο μορφές που επικρατούν κυρίως σε έναν οίνο είναι η μοριακή μορφή, η οποία έχει αντιμικροβιακή ικανότητα, και η μορφή των ανιόντων, σε μεγαλύτερο ποσοστό και η οποία έχει την αντιοξειδωτική ικανότητα (Wilkes et al., 2018). Η αντιοξειδωτική του δράση μπορεί να είναι είτε άμεση, δημιουργώντας ενώσεις με τις φαινολικές ενώσεις και προφυλάσσοντας τες από οξείδωση, είτε έμμεση απενεργοποιώντας τις οξειδάσες. Κατά την ένωση του με τα φαινολικά συστατικά, και άλλα ευοξείδωτα συστατικά, αναστέλλεται προσωρινά ή μόνιμα η αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή του ικανότητα. Το ποσοστό του θειώδη ανυδρίτη που έχει ενωθεί ονομάζεται δεσμευμένος. Από την άλλη μεριά υπάρχει ένα μικρότερο ποσοστό το οποίο δεν έχει δεσμευθεί και μπορεί να προσφέρει αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική προστασία σε έναν οίνο. Αυτός ονομάζεται ελεύθερος θειώδης ανυδρίτης και το άθροισμα του ελεύθερου και του δεσμευμένου ορίζει τον ολικό θειώδη ανυδρίτη ενός οίνου (Κοτσερίδης & Προξενιά, 2020).

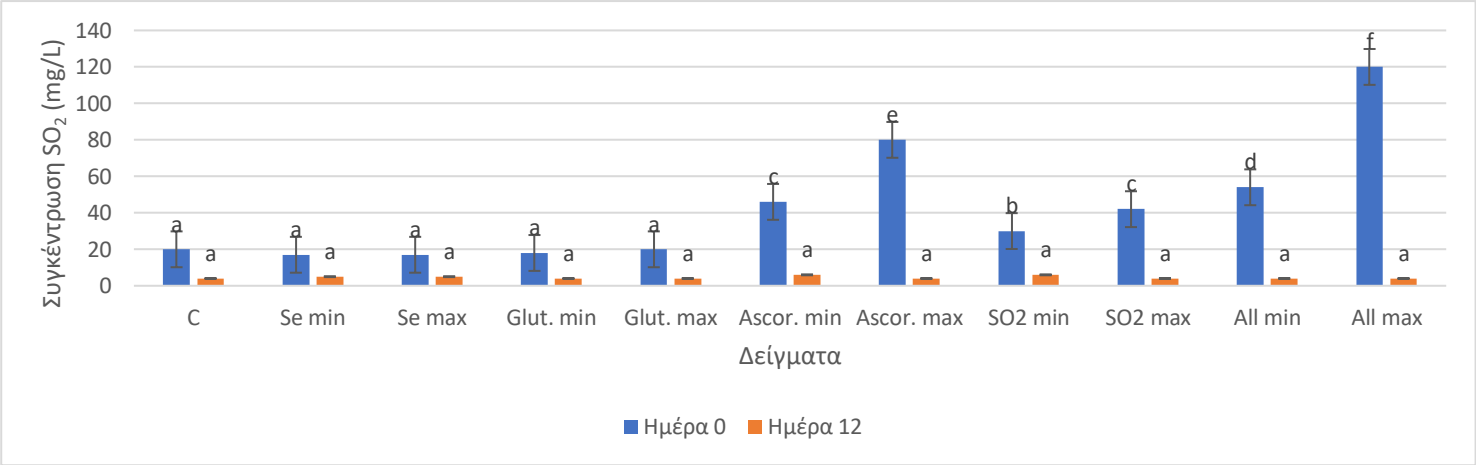
Στο πείραμα έγινε η μέτρηση και η καταγραφή του ολικού και του ελεύθερου θειώδους ανυδρίτη τις ημέρες δειγματοληψίας 0, 4, 8 και 12, σε όλες τις επεμβάσεις και για τις 2 ποικιλίες.

Ελεύθερος θειώδης ανυδρίτης

Παρακάτω καταγράφονται στους Πίνακες 9 και 10 οι τιμές που ελήφθησαν έπειτα από μέτρηση του ελεύθερου θειώδη ανυδρίτη τις ημέρες 0, 4, 8 και 12, και για τις 2 ποικιλίες, με τις τιμές που εμφανίζουν διαφορετικό εκθέτη ναι υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδο σημαντικότητας 5%. Τέλος, να σημειωθεί ότι όλες οι τιμές και στους δύο πίνακες εκφράζονται σε χιλιοστογραμμάρια θειώδη ανυδρίτη ανά λίτρο (SO_2 mg/L).

Πίνακας 9: Αποτελέσματα εκτίμησης ελεύθερου θειώδη ανυδρίτη στο πείραμα επιταχυνόμενης οξείδωσης της ποικιλίας Μαλαγουζιά. Όλες οι τιμές είναι εκφρασμένες σε mg SO_2 /L.
Τιμές με διαφορετικό εκθέτη εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 5% μετά από σύγκριση ανά στήλη.

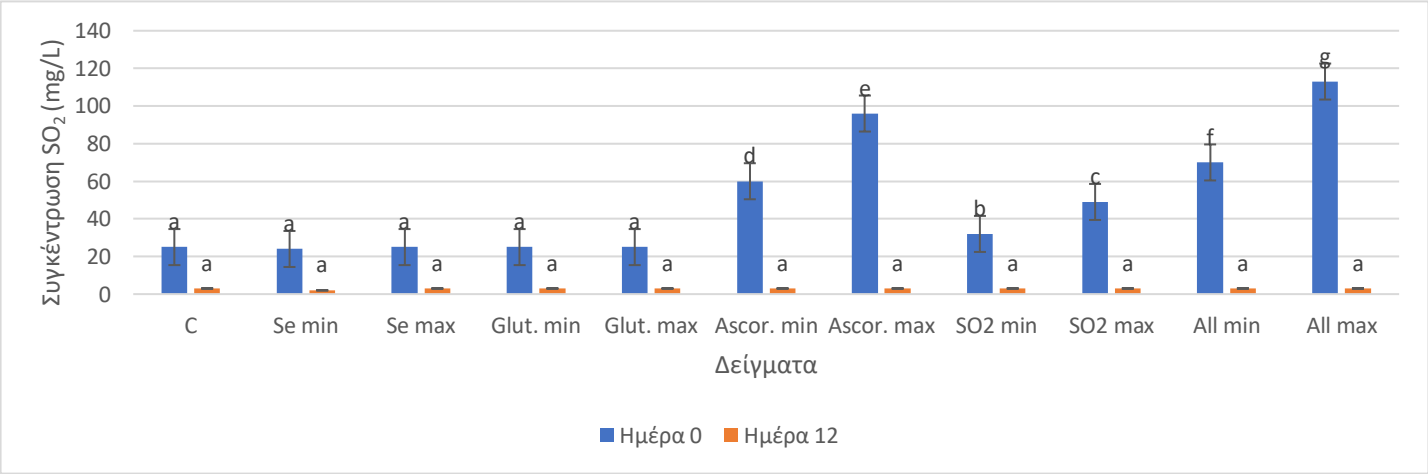
Μαλαγουζιά	**Ημέρα 0**	**Ημέρα 4**	**Ημέρα 8**	**Ημέρα 12**
Μάρτυρας (Control)	$20{,}00^{a} \pm 1{,}41$	$2{,}00^{a} \pm 1{,}41$	$2{,}00^{a} \pm 1{,}41$	$4{,}00^{a} \pm 1{,}41$
Se min	$17{,}00^{a} \pm 1{,}41$	$8{,}00^{b} \pm 1{,}41$	$3{,}00^{a} \pm 1{,}41$	$5{,}00^{a} \pm 1{,}41$
Se max	$17{,}00^{a} \pm 1{,}41$	$10{,}00^{b} \pm 1{,}41$	$3{,}00^{a} \pm 1{,}41$	$5{,}00^{a} \pm 1{,}41$
Glut min	$18{,}00^{a} \pm 1{,}41$	$7{,}00^{ab} \pm 1{,}41$	$3{,}00^{a} \pm 1{,}41$	$4{,}00^{a} \pm 1{,}41$
Glut max	$20{,}00^{a} \pm 1{,}41$	$3{,}00^{a} \pm 1{,}41$	$4{,}00^{a} \pm 1{,}41$	$4{,}00^{a} \pm 1{,}41$
Ascor min	$46{,}00^{c} \pm 1{,}41$	$5{,}00^{ab} \pm 1{,}41$	$2{,}00^{a} \pm 1{,}41$	$6{,}00^{a} \pm 1{,}41$
Ascor max	$80{,}00^{e} \pm 1{,}41$	$8{,}00^{b} \pm 1{,}41$	$2{,}00^{a} \pm 1{,}41$	$4{,}00^{a} \pm 1{,}41$
SO_2 min	$30{,}00^{b} \pm 1{,}41$	$5{,}00^{ab} \pm 1{,}41$	$2{,}00^{a} \pm 1{,}41$	$6{,}00^{a} \pm 1{,}41$
SO_2 max	$42{,}00^{c} \pm 1{,}41$	$9{,}00^{b} \pm 1{,}41$	$2{,}00^{a} \pm 1{,}41$	$4{,}00^{a} \pm 1{,}41$
All min	$54{,}00^{d} \pm 1{,}41$	$7{,}00^{ab} \pm 1{,}41$	$2{,}00^{a} \pm 1{,}41$	$4{,}00^{a} \pm 1{,}41$
All max	$120{,}00^{f} \pm 1{,}41$	$9{,}00^{b} \pm 1{,}41$	$3{,}00^{a} \pm 1{,}41$	$4{,}00^{a} \pm 1{,}41$



Διάγραμμα 16: Συγκέντρωση ελεύθερου θειώδη ανυδρίτη στα δείγματα την ημέρα 0 και 12 στο πείραμα επιταχυνόμενης οξείδωσης της ποικιλίας Μαλαγουζιά.

Πίνακας 10: Αποτελέσματα εκτίμησης ελεύθερου θειώδη ανυδρίτη στο πείραμα επιταχυνόμενης οξείδωσης της ποικιλίας Ρετσίνα. . Όλες οι τιμές είναι εκφρασμένες σε mg SO_2 /L.
Τιμές με διαφορετικό εκθέτη εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 5% μετά από σύγκριση ανά στήλη.

Ρετσίνα	**Ημέρα 0**	**Ημέρα 4**	**Ημέρα 8**	**Ημέρα 12**
Μάρτυρας (Control)	$25{,}00^{a}$ ±1,41	$2{,}00^{a}$ ±1,41	$5{,}00^{a}$ ±1,41	$3{,}00^{a}$ ±1,41
Se min	$24{,}00^{a}$ ±1,41	$5{,}00^{ab}$ ±1,41	$3{,}00^{a}$ ±1,41	$2{,}00^{a}$ ±1,41
Se max	$25{,}00^{a}$ ±1,41	$10{,}00^{b}$ ±1,41	$3{,}00^{a}$ ±1,41	$3{,}00^{a}$ ±1,41
Glut min	$25{,}00^{a}$ ±1,41	$5{,}00^{ab}$ ±1,41	$3{,}00^{a}$ ±1,41	$3{,}00^{a}$ ±1,41
Glut max	$25{,}00^{a}$ ±1,41	$6{,}00^{ab}$ ±1,41	$4{,}00^{a}$ ±1,41	$3{,}00^{a}$ ±1,41
Ascor min	$60{,}00^{d}$ ±1,41	$4{,}00^{a}$ ±1,41	$4{,}00^{a}$ ±1,41	$3{,}00^{a}$ ±1,41
Ascor max	$96{,}00^{e}$ ±1,41	$4{,}00^{a}$ ±1,41	$3{,}00^{a}$ ±1,41	$3{,}00^{a}$ ±1,41
SO_2 min	$32{,}00^{b}$ ±1,41	$5{,}00^{ab}$ ±1,41	$4{,}00^{a}$ ±1,41	$3{,}00^{a}$ ±1,41
SO_2 max	$49{,}00^{c}$ ±1,41	$5{,}00^{ab}$ ±1,41	$4{,}00^{a}$ ±1,41	$3{,}00^{a}$ ±1,41
All min	$70{,}00^{f}$ ±1,41	$5{,}00^{ab}$ ±1,41	$3{,}00^{a}$ ±1,41	$3{,}00^{a}$ ±1,41
All max	$113{,}00^{g}$ ±1,41	$7{,}00^{ab}$ ±1,41	$3{,}00^{a}$ ±1,41	$3{,}00^{a}$ ±1,41



Διάγραμμα 17: Συγκέντρωση ελεύθερου θειώδη ανυδρίτη στα δείγματα την ημέρα 0 και 12 στο πείραμα επιταχυνόμενης οξείδωσης της ποικιλίας Ρετσίνα.

Στα αποτελέσματα στον Πίνακα 9, του υπολογισμού του ελεύθερου θειώδους ανυδρίτη για την ποικιλία της Μαλαγουζιάς, φαίνεται πως τα δείγματα, όπου έγινε προσθήκη θειώδη ανυδρίτη ή/και ασκορβικού οξέως (SO_2 min, SO_2 max, Ascor min, Ascro max, All min και All max), εμφανίζουν τις μεγαλύτερες συγκέντρωση στην ημέρα 0, αλλά και διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους, και με τα υπόλοιπα δείγματα που δεν έγινε η προσθήκη των συγκεκριμένων αντιοξειδωτικών (C, Se min, Se max,

Glut min και Glut max), σε επίπεδο σημαντικότητας 5%. Την 4η ημέρα, υπήρξε μια απότομη πτώση στη συγκέντρωση του ελεύθερου θειώδη ανυδρίτη σε όλα τα δείγματα, με τα δείγματα C και Glut max να έχουν τη μικρότερη συγκέντρωση. Την 12η ημέρα όλα τα δείγματα εμφάνισαν σχεδόν την ίδια συγκέντρωση ελεύθερου ανυδρίτη και όπως φαίνεται και από το Διάγραμμα 16 δεν διαφέρει κανένα στατιστικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

Στα δείγματα της Ρετσίνας, όπως φαίνονται στον Πίνακα 10, την ημέρα 0 παρουσίασαν λίγο υψηλότερες συγκεντρώσεις ελεύθερου θειώδη ανυδρίτη συγκριτικά με εκείνα της Μαλαγουζιάς, ενώ και σε αυτή την ποικιλία τα δείγματα με τις προσθήκες του θειώδη ανυδρίτη ή/και του ασκορβικού οξέος (SO_2 min, SO_2 max, Ascor min, Ascro max, All min και All max) εμφάνισαν τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αλλά και στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους αλλά και με τα υπόλοιπα δείγματα (C, Se min, Se max, Glut min και Glut max) σε επίπεδο σημαντικότητας 5%. Την 4η ημέρα υπήρξε πτώση της συγκέντρωσης του ελεύθερου ανυδρίτη, με μόνο το δείγμα Se max να έχει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση και να διαφέρει στατιστικά από τα υπόλοιπα, σε επίπεδο σημαντικότητας 5% (Πίνακας 10). Την ημέρα 8 όλα τα δείγματα εμφάνισαν την ίδια σχεδόν συγκέντρωση ελεύθερου θειώδη ανυδρίτη, με κανένα να διαφέρει στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο της σημαντικότητας 5% . Τα ίδια αποτελέσματα υπήρξαν και την ημέρα 12, με ελάχιστη μειωμένη συγκέντρωση από την ημέρα 8, και με κανένα δείγμα να διαφέρει στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5% από τα υπόλοιπα. Στο Διάγραμμα 17 γίνεται η σύγκριση των συγκεντρώσεων του ελεύθερου θειώδους ανυδρίτη την ημέρα 0 και την ημέρα 12. Παρόλο που την ημέρα 0 τα δείγματα SO_2 min, SO_2 max, Ascor min, Ascro max, All min και All max εμφάνισαν τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις και στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδο σημαντικότητας 5% από τα υπόλοιπα, φαίνεται πως την ημέρα 12 όλα τα δείγματα, ανεξαρτήτου αντιοξειδωτικής προσθήκης που μπορεί να είχαν, κατέληξαν με την ίδια συγκέντρωση ελεύθερου θειώδους ανυδρίτη.

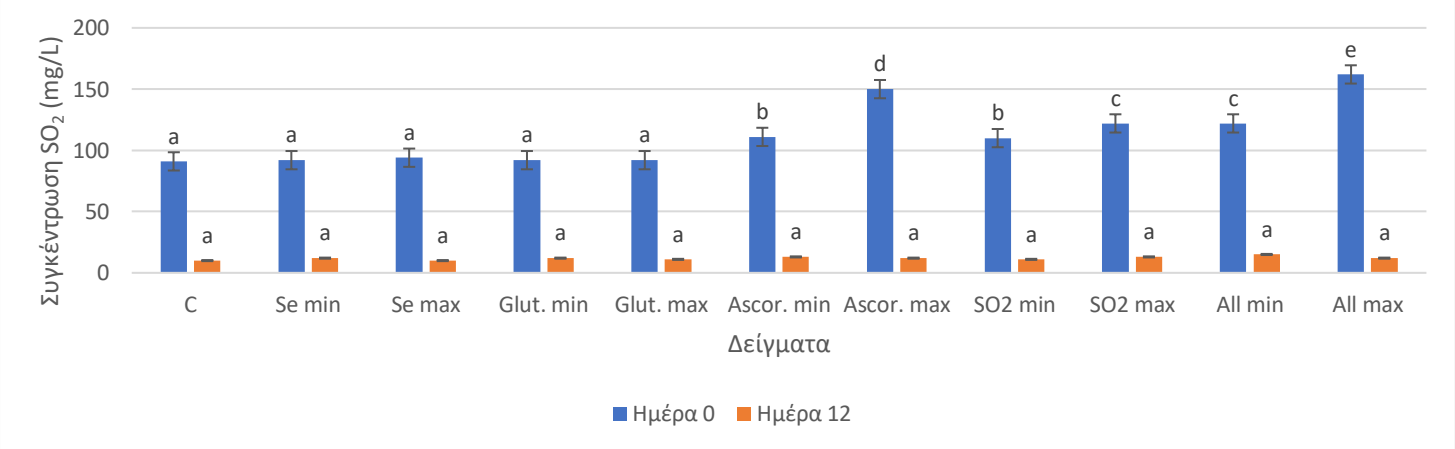
Ανάμεσα στις δύο ποικιλίες αλλά και στις προσθήκες με αντιοξειδωτικά που έγινε στην κάθε μία, με εξαίρεση την ημέρα 0 και για τις δύο ποικιλίες, δεν παρατηρήθηκε για καμία ποικιλία και για κανένα αντιοξειδωτικό κάποια διαφορετική διακύμανση της συγκέντρωσης του ελεύθερου θειώδους ανυδρίτη καθ’ όλη τη διάρκεια του πειράματος της επιταχυνόμενης οξείδωσης.

Ολικός θειώδης ανυδρίτης

Αντίστοιχα, στους παρακάτω Πίνακες 11 και 12 καταγράφονται οι τιμές που ελήφθησαν έπειτα από μέτρηση του ολικού θειώδη ανυδρίτη τις ημέρες 0, 4, 8 και 12, και για τις 2 ποικιλίες, με τις τιμές που εμφανίζουν διαφορετικό εκθέτη ναι υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδο σημαντικότητας 5%. Τέλος, να σημειωθεί ότι όλες οι τιμές και στους δύο πίνακες εκφράζονται σε χιλιοστογραμμάρια θειώδη ανυδρίτη ανά λίτρο (SO2 mg/L).

Πίνακας 11: Αποτελέσματα εκτίμησης ολικού θειώδη ανυδρίτη στο πείραμα επιταχυνόμενης οξείδωσης της ποικιλίας Μαλαγουζιά. . Όλες οι τιμές είναι εκφρασμένες σε mg SO_2 /L.
Τιμές με διαφορετικό εκθέτη εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 5% μετά από σύγκριση ανά στήλη.

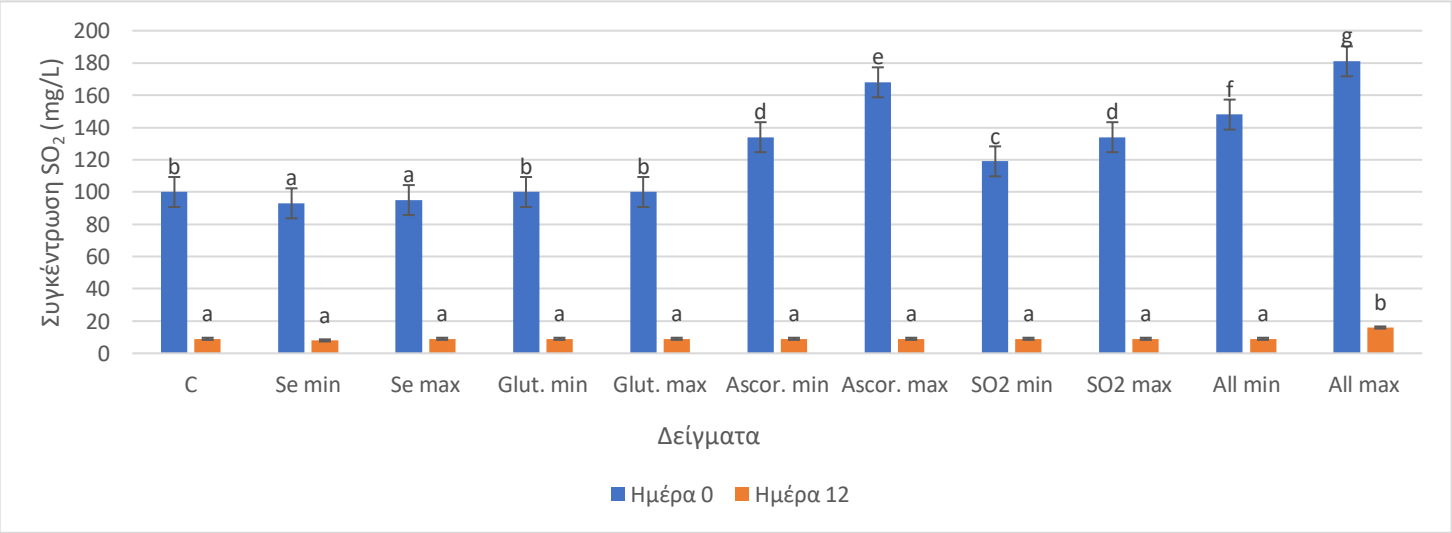
Μαλαγουζιά	**Ημέρα 0**	**Ημέρα 4**	**Ημέρα 8**	**Ημέρα 12**
Μάρτυρας (Control)	$91{,}00^{a} \pm 1{,}41$	$29{,}00^{c} \pm 1{,}41$	$15{,}00^{ab} \pm 1{,}41$	$10{,}00^{a} \pm 1{,}41$
Se min	$92{,}00^{a} \pm 1{,}41$	$41{,}00^{d} \pm 1{,}41$	$16{,}00^{abc} \pm 1{,}41$	$12{,}00^{a} \pm 1{,}41$
Se max	$94{,}00^{a} \pm 1{,}41$	$49{,}00^{e} \pm 1{,}41$	$17{,}00^{b} \pm 1{,}41$	$10{,}00^{a} \pm 1{,}41$
Glut min	$92{,}00^{a} \pm 1{,}41$	$45{,}00^{c} \pm 1{,}41$	$18{,}00^{b} \pm 1{,}41$	$12{,}00^{a} \pm 1{,}41$
Glut max	$92{,}00^{a} \pm 1{,}41$	$41{,}00^{d} \pm 1{,}41$	$17{,}00^{b} \pm 1{,}41$	$11{,}00^{a} \pm 1{,}41$
Ascor min	$111{,}00^{b} \pm 1{,}41$	$10{,}00^{a} \pm 1{,}41$	$11{,}00^{a} \pm 1{,}41$	$13{,}00^{a} \pm 1{,}41$
Ascor max	$150{,}00^{d} \pm 1{,}41$	$20{,}00^{b} \pm 1{,}41$	$15{,}00^{ab} \pm 1{,}41$	$12{,}00^{a} \pm 1{,}41$
SO_2 min	$110{,}00^{b} \pm 1{,}41$	$52{,}00^{ef} \pm 1{,}41$	$20{,}00^{b} \pm 1{,}41$	$11{,}00^{a} \pm 1{,}41$
SO_2 max	$122{,}00^{c} \pm 1{,}41$	$57{,}00^{f} \pm 1{,}41$	$21{,}00^{c} \pm 1{,}41$	$13{,}00^{a} \pm 1{,}41$
All min	$122{,}00^{c} \pm 1{,}41$	$37{,}00^{d} \pm 1{,}41$	$11{,}00^{a} \pm 1{,}41$	$15{,}00^{a} \pm 1{,}41$
All max	$162{,}00^{e} \pm 1{,}41$	$21{,}00^{b} \pm 1{,}41$	$11{,}00^{a} \pm 1{,}41$	$12{,}00^{a} \pm 1{,}41$



Διάγραμμα 18: Συγκέντρωση ολικού θειώδη ανυδρίτη στα δείγματα την ημέρα 0 και 12 στο πείραμα επιταχυνόμενης οξείδωσης της ποικιλίας Μαλαγουζιά.

Πίνακας 12: Αποτελέσματα εκτίμησης ολικού θειώδη ανυδρίτη στο πείραμα επιταχυνόμενης οξείδωσης της ποικιλίας Ρετσίνα. . Όλες οι τιμές είναι εκφρασμένες σε mg SO_2 /L.
Τιμές με διαφορετικό εκθέτη εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 5% μετά από σύγκριση ανά στήλη.

Ρετσίνα	**Ημέρα 0**	**Ημέρα 4**	**Ημέρα 8**	**Ημέρα 12**
Μάρτυρας (Control)	$100,00^{b}$ ±1,41	$30,00^{bcd}$ ±1,41	$10,00^{a}$ ±1,41	$9,00^{a}$ ±1,41
Se min	$93,00^{a}$ ±1,41	$30,00^{bcd}$ ±1,41	$10,00^{a}$ ±1,41	$8,00^{a}$ ±1,41
Se max	$95,00^{a}$ ±1,41	$31,00^{bcd}$ ±1,41	$10,00^{a}$ ±1,41	$9,00^{a}$ ±1,41
Glut min	$100,00^{b}$ ±1,41	$32,00^{de}$ ±1,41	$11,00^{a}$ ±1,41	$9,00^{a}$ ±1,41
Glut max	$100,00^{b}$ ±1,41	$26,00^{b}$ ±1,41	$11,00^{a}$ ±1,41	$9,00^{a}$ ±1,41
Ascor min	$134,00^{d}$ ±1,41	$17,00^{a}$ ±1,41	$10,00^{a}$ ±1,41	$9,00^{a}$ ±1,41
Ascor max	$168,00^{e}$ ±1,41	$19,00^{a}$ ±1,41	$10,00^{a}$ ±1,41	$9,00^{a}$ ±1,41
SO_2 min	$119,00^{c}$ ±1,41	$43,00^{f}$ ±1,41	$11,00^{a}$ ±1,41	$9,00^{a}$ ±1,41
SO_2 max	$134,00^{d}$ ±1,41	$54,00^{g}$ ±1,41	$15,00^{a}$ ±1,41	$9,00^{a}$ ±1,41
All min	$148,00^{f}$ ±1,41	$30,00^{bcd}$ ±1,41	$12,00^{a}$ ±1,41	$9,00^{a}$ ±1,41
All max	$181,00^{g}$ ±1,41	$37,00^{e}$ ±1,41	$14,00^{a}$ ±1,41	$16,00^{b}$ ±1,41



Διάγραμμα 19: Συγκέντρωση ολικού θειώδη ανυδρίτη στα δείγματα την ημέρα 0 και 12 στο πείραμα επιταχυνόμενης οξείδωσης της ποικιλίας Ρετσίνα.

Όσον αφορά τα αποτελέσματα της εκτίμησης του ολικού θειώδη ανυδρίτη στα δείγματα της Μαλαγουζιάς, όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 11, φαίνεται πως την ημέρα 0 ακολουθούν την ίδια τάση με τη συγκέντρωση του ελεύθερου θειώδη ανυδρίτη, δηλαδή τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις παρουσιάζουν τα δείγματα που έγινε προσθήκη θειώδη ανυδρίτη ή/και ασκορβικό οξύ (SO_2 min, SO_2 max, Ascor min, Ascor max, All min, All max), και τα οποία διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους και με τα υπόλοιπα δείγματα, σε επίπεδο σημαντικότητας 5%. Την 4η ημέρα παρατηρήθηκε (Πίνακας 11) πως τα δείγματα Se min, Se max, Glut min, Glut max SO_2 min και SO_2 max είχαν τη μικρότερη πτώση στη συγκέντρωση ολικού θειώδη ανυδρίτη, συγκριτικά με τα υπόλοιπα. Επίσης, τη μεγαλύτερη συγκέντρωση την είχε το δείγμα SO_2 max ενώ τη μικρότερη το δείγμα Ascor min, και σχεδόν όλα τα δείγματα μεταξύ τους διέφεραν στατιστικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5%. Τέλος, όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 18, την 12η ημέρα όλα τα δείγματα εμφάνισαν πολύ μικρές συγκεντρώσεις ολικού θειώδη ανυδρίτη και κανένα δεν διέφερε στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5%, από τα υπόλοιπα.

Στα δείγματα της Ρετσίνας, στον Πίνακα 12, φαίνεται η διαφοροποίηση στις συγκεντρώσεις ολικού θειώδη ανυδρίτη μεταξύ των δειγμάτων SO_2 min, SO_2 max, Ascor min, Ascor max, All min, All max και των υπολοίπων δειγμάτων. Επιπλέον, όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 19, δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά, σε επίπεδο σημαντικότητας 5%, μεταξύ των δειγμάτων Se min και Se max, και μεταξύ των δειγμάτων Glut min και Glut max. Συνολικά, όμως, διαφέρουν στατιστικά όλα μεταξύ τους, σε επίπεδο σημαντικότητας 5%. Την 4η ημέρα παρατηρήθηκε πτώση της συγκέντρωσης του ολικού θειώδη ανυδρίτη με τα δείγματα SO_2 min και SO_2 max να διατηρούν τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Η στατιστική ανάλυση έδειξε πως υπάρχουν στατιστικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων, σε επίπεδο σημαντικότητας 5%, όχι όμως μεταξύ των C, Se min, Se max και All min (Πίνακας 12). Την ημέρα 8, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 12, παρατηρήθηκε μια πτώση στη συγκέντρωση του ολικού θειώδη ανυδρίτη σε όλα τα δείγματα, χωρίς όμως να υπάρξει κάποια στατιστική σημαντική διαφορά σε επίπεδο σημαντικότητας 5%. Την ημέρα 12 συνεχίστηκε η μείωση της συγκέντρωσης του ολικού θειώδη ανυδρίτη για όλα τα δείγματα, με εξαίρεση το δείγμα All max, το οποίο κράτησε σταθερή τη συγκέντρωσή του. Το δείγμα All max ήταν και το μοναδικό που διέφερε στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5% από όλα τα υπόλοιπα. Στη σύγκριση των συγκεντρώσεων ολικού

θειώδους ανυδρίτη όλων των δειγμάτων, την ημέρα 0 και την ημέρα 12 (Διάγραμμα 19), είναι προφανής η μείωση της συγκέντρωσης όλων των δειγμάτων κατά τη διάρκεια του πειράματος, με εξαίρεση το δείγμα All max που την ημέρα 12 είχε τη μεγαλύτερη, και σχεδόν διπλάσια, συγκέντρωση από όλα τα υπόλοιπα.

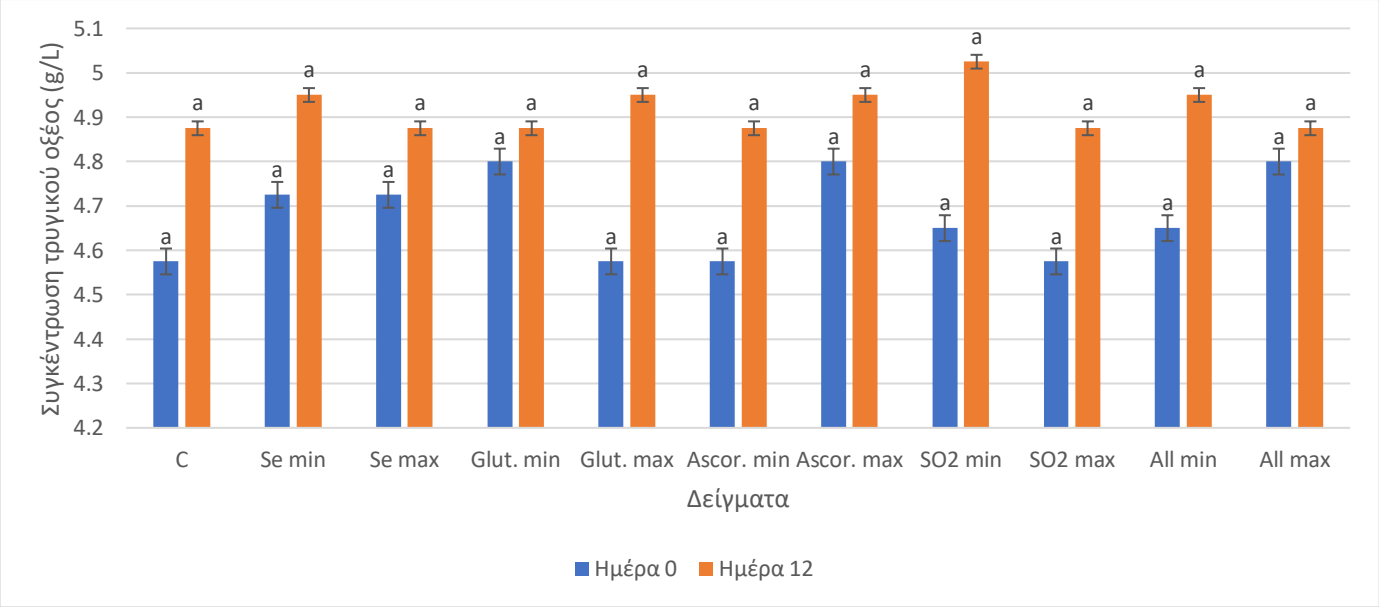
Οι δύο ποικιλίες την ημέρα 0 του πειράματος είχαν τις ίδιες συγκεντρώσεις ολικού θειώδους ανυδρίτη, με τα δείγματα Ascor min, Ascor max, All min και All max της Ρετσίνας να παρουσιάζουν λίγο υψηλότερες. Την 12η ημέρα παρουσίασαν πάλι παρόμοιες αλλά μειωμένες τιμές, με το δείγμα All max της Ρετσίνας να έχει την υψηλότερη από όλα, και από τις δύο ποικιλίες. Πρέπει όμως να σημειωθεί, ότι το συγκεκριμένο δείγμα την ημέρα 0 είχε τη μεγαλύτερη συγκέντρωση ολικού θειώδους ανυδρίτη από όλα τα υπόλοιπα δείγματα και από τις δύο ποικιλίες.

8.3.Ολική ή ογκομετρούμενη οξύτητα

Η ολική οξύτητα δεν φαίνεται να έχει κάποια άμεση σχέση με την οξείδωση των οίνων. Παρόλα αυτά, επειδή καθορίζει το pH του οίνου, και επειδή η οξείδωση εξαρτάται από το pH, δηλαδή όσο μεγαλύτερο είναι το pH του οίνου τόσο πιο πιθανό είναι νέα εμφάνιση οξείδωση άμεσα (Κοτσερίδης & Προξενιά, 2020). Για αυτό το λόγο αποφασίστηκε να γίνει η μέτρηση της ολικής οξύτητας την ημέρα 0 και 12 του πειράματος, και για τις 2 ποικιλίες και στους Πίνακες 13 και 14 καταγράφονται τα αποτελέσματα. Οι τιμές και στους 2 πίνακες είναι εκφρασμένες σε χιλιοστοϊσοδύναμα ανά λίτρο (meq/L), και εκείνες που φέρουν διαφορετικό εκθέτη υποδηλώνουν στατιστική σημαντική διαφορά σε επίπεδο 5%.

Πίνακας 13: Αποτελέσματα εκτίμησης ολικής ογκομετρούμενης οξύτητας στο πείραμα επιταχυνόμενης οξείδωσης της ποικιλίας Μαλαγουζιά. Όλες οι τιμές είναι εκφρασμένες σε meq/L.
Τιμές με διαφορετικό εκθέτη εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 5% μετά από σύγκριση ανά στήλη.

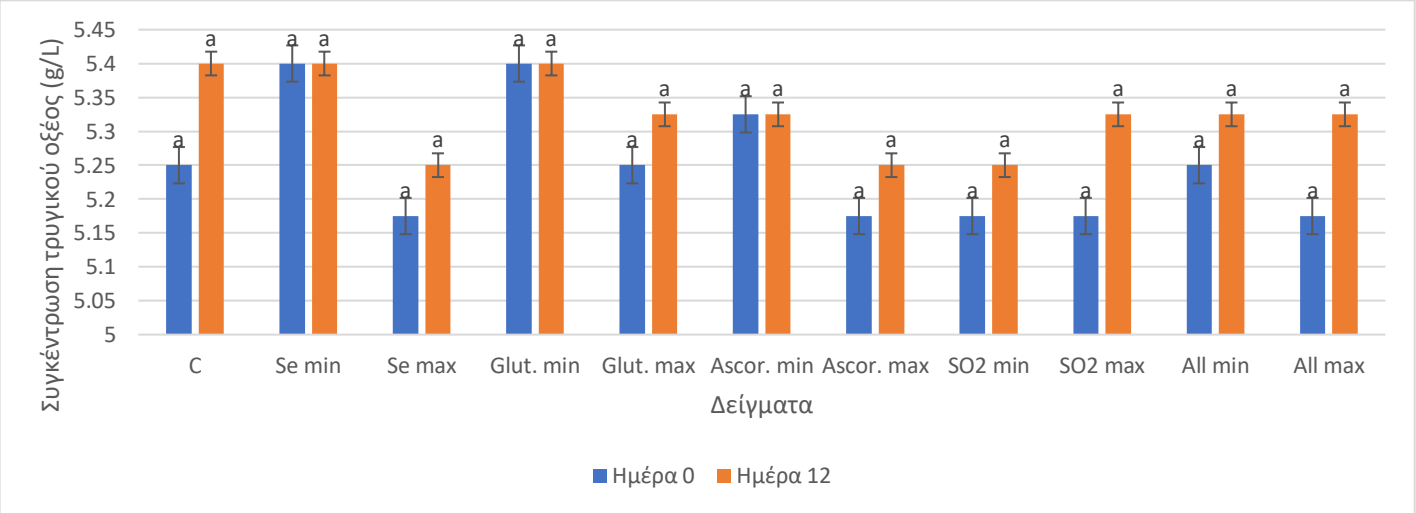
Μαλαγουζιά	**Ημέρα 0**	**Ημέρα 12**
Μάρτυρας (Control)	61,00^{a} ±0,14	65,00^{a} ±0,14
Se min	63,00^{a} ±0,14	66,00^{a} ±0,14
Se max	63,00^{a}±0,14	65,00^{a} ±0,14
Glut min	64,00^{a} ±0,14	65,00^{a} ±0,14
Glut max	61,00^{a} ±0,14	66,00^{a} ±0,14
Ascor min	61,00^{a} ±0,14	65,00^{a} ±0,14
Ascro max	64,00^{a} ±0,14	66,00^{a} ±0,14
SO_2 min	62,00^{a} ±0,14	67,00^{a} ±0,14
SO_2 max	61,00^{a} ±0,14	65,00^{a} ±0,14
All min	62,00^{a} ±0,14	66,00^{a} ±0,14
All max	64,00^{a} ±0,14	65,00^{a} ±0,14



Διάγραμμα 20: Συγκέντρωση τρυγικού οξέος στα δείγματα την ημέρα 0 και 12 στο πείραμα επιταχυνόμενης οξείδωσης της ποικιλίας Μαλαγουζιά.

Πίνακας 14: Αποτελέσματα εκτίμησης ολικής ογκομετρούμενης οξύτητας στο πείραμα επιταχυνόμενης οξείδωσης της ποικιλίας Ρετσίνα. Όλες οι τιμές είναι εκφρασμένες σε meq/L.
Τιμές με διαφορετικό εκθέτη εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 5% μετά από σύγκριση ανά στήλη.

Ρετσίνα	**Ημέρα 0**	**Ημέρα 12**
Μάρτυρας (Control)	70,00^{a} ±0,14	72,00^{a} ±0,14
Se min	72,00^{a} ±0,14	72,00^{a} ±0,14
Se max	69,00^{a} ±0,14	70,00^{a} ±0,14
Glut min	72,00^{a} ±0,14	71,00^{a} ±0,14
Glut max	70,00^{a} ±0,14	72,00^{a} ±0,14
Ascor min	71,00^{a} ±0,14	71,00^{a} ±0,14
Ascro max	69,00^{a} ±0,14	70,00^{a} ±0,14
SO_2 min	69,00^{a} ±0,14	70,00^{a} ±0,14
SO_2 max	69,00^{a} ±0,14	71,00^{a} ±0,14
All min	70,00^{a} ±0,14	71,00^{a} ±0,14
All max	69,00^{a} ±0,14	71,00^{a} ±0,14



Διάγραμμα 21: Συγκέντρωση τρυγικού οξέος στα δείγματα την ημέρα 0 και 12 στο πείραμα επιταχυνόμενης οξείδωσης της ποικιλίας Ρετσίνα.

Όσον αφορά τη μέτρηση της ολικής ογκομετρούμενης οξύτητας στα δείγματα της Μαλαγουζιάς την ημέρα 0 και 12 του πειράματος, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 13, παρατηρήθηκε μια μικρή, αλλά συνολική, αύξηση της οξύτητας σε όλα τα δείγματα. Επιπλέον, σε κανένα από τα δείγματα, η συγκέντρωση του τρυγικού οξέος, δεν διέφερε στατιστικά σημαντικά, σε επίπεδο σημαντικότητας 5%, ούτε την ημέρα 0 ούτε την ημέρα 12 (Διάγραμμα 20).

Τα δείγματα της Ρετσίνας εμφάνισαν μεγαλύτερη ολική ογκομετρούμενη οξύτητα την ημέρα 0 (Πίνακας 14), από εκείνα της Μαλαγουζιάς, παρόλα αυτά οι συγκεντρώσεις του τρυγικού οξέος εμφάνισαν στατιστική συσχέτιση μεταξύ τους, σε επίπεδο σημαντικότητας 5% (Διάγραμμα 21). Την ημέρα 12 όλα τα δείγματα της Ρετσίνας εμφάνισαν σχεδόν την ίδια συγκέντρωση τρυγικού οξέος, μεταξύ τους αλλά και με την ημέρα 0. Κανένα δείγμα ούτε την ημέρα 12 δεν διέφερε στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5% (Διάγραμμα 21).

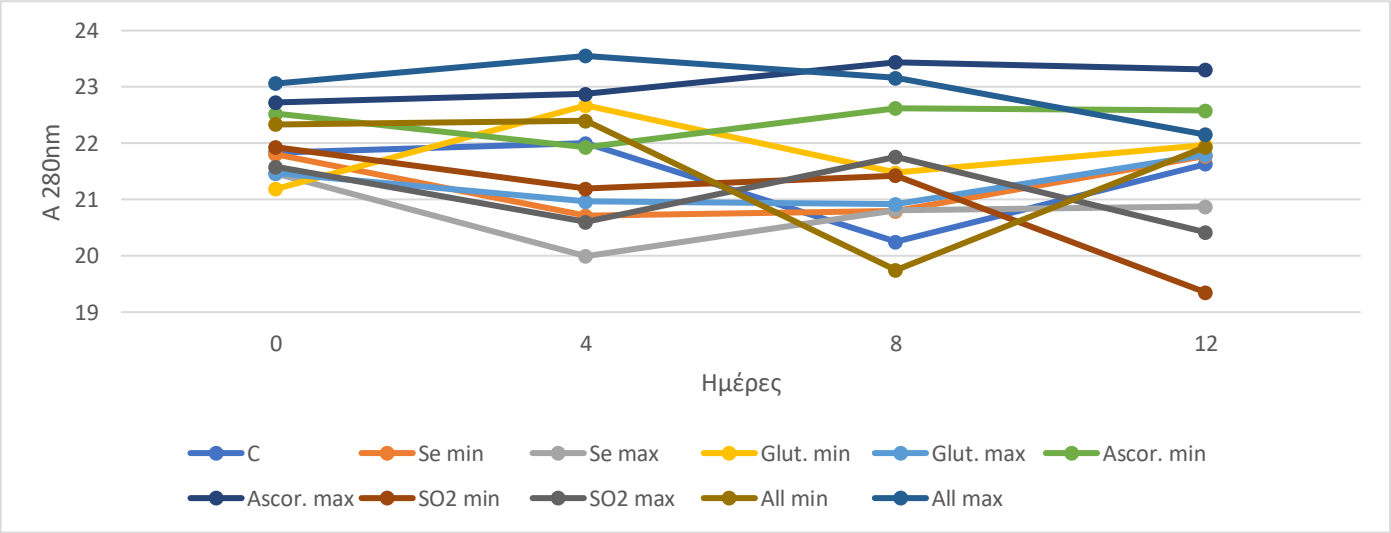
Από τις μετρήσεις που έγιναν την ημέρα 0 και 12 και στις δύο ποικιλίες, σε όλα τα δείγματα, παρατηρήθηκε πως η ολική ογκομετρούμενη οξύτητα δεν επηρεάζεται από την οξείδωση των οίνων, ούτε από την προσθήκη αντιοξειδωτικών.

8.4.Δείκτης φαινολικών ουσιών (ΔΦΟ)

Ο δείκτης των φαινολικών ενώσεων αποτελεί μια εύκολη και γρήγορη μέθοδος για μια αρχική εκτίμηση των φαινολικών ενώσεων. Είναι απαραίτητη η εκτίμηση της συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων του οίνου διότι προσφέρουν αντιοξειδωτική προστασία αλλά και ευθύνονται για την εμφάνιση καφετιάσματος, σε περίπτωση οξείδωσης του. Λόγω της ικανότητας των βενζολικών δακτυλίων των φαινολικών ενώσεων να εμφανίζουν ισχυρή απορρόφηση στα 280 nm, μπορεί να γίνει μια εκτίμηση της περιεκτικότητας του οίνου σε φλαβονοειδείς φαινόλες, μη φλαβονοειδείς και κάποιες μη φαινολικές ουσίες (Κοτσερίδης & Προξενιά, 2020). Στους πίνακες 15 και 16 καταγράφονται οι τιμές που ελήφθησαν από τα δείγματα και στις δύο ποικιλίες, τις ημέρες 0, 4, 8 και 12 του πειράματος. Οι τιμές υποδηλώνουν την τιμή απορρόφησης που έδειξε το φωτόμετρο πολλαπλασιασμένη με την αραίωση του δείγματος, και εκείνες με διαφορετικό δείκτη εμφανίζουν στατιστική σημαντική διαφορά σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

Πίνακας 15: Αποτελέσματα εκτίμησης δείκτη φαινολικών ενώσεων με απορρόφηση στα 280 nm στο πείραμα επιταχυνόμενης οξείδωσης της ποικιλίας Μαλαγουζιά. Όλες οι τιμές είναι εκφρασμένες σε nm πολλαπλασιασμένες με 25 όπου ήταν η αραίωση των δειγμάτων.
Τιμές με διαφορετικό εκθέτη εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 5% μετά από σύγκριση ανά στήλη.

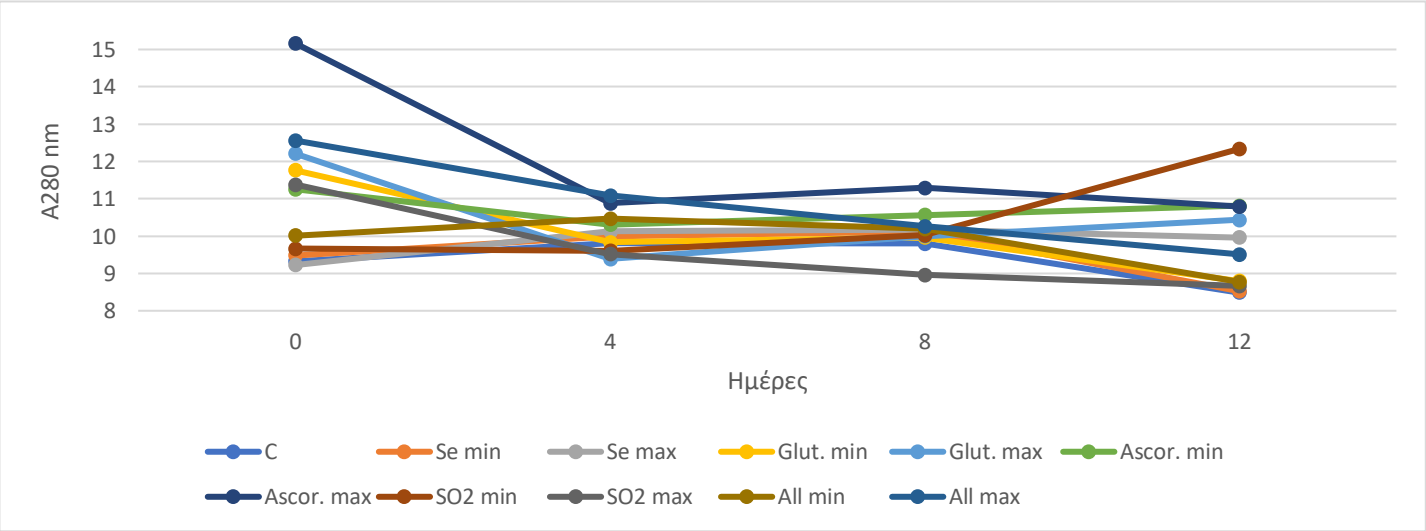
Μαλαγουζιά	**Ημέρα 0**	**Ημέρα 4**	**Ημέρα 8**	**Ημέρα 12**
Μάρτυρας (Control)	$21,84^{e} \pm 0,00$	$22,00^{cd} \pm 0,53$	$20,25^{b} \pm 0,01$	$21,63^{a} \pm 0,00$
Se min	$21,80^{d} \pm 0,01$	$20,71^{b} \pm 0,00$	$20,80^{c} \pm 0,01$	$21,77^{b} \pm 0,01$
Se max	$21,46^{b} \pm 0,01$	$19,99^{a} \pm 0,01$	$20,81^{c} \pm 0,01$	$20,88^{c} \pm 0,01$
Glut min	$21,19^{a} \pm 0,00$	$22,67^{d} \pm 0,07$	$21,48^{f} \pm 0,00$	$21,97^{d} \pm 0,00$
Glut max	$21,47^{b} \pm 0,00$	$20,96^{b} \pm 0,01$	$20,92^{d} \pm 0,02$	$21,79^{e} \pm 0,01$
Ascor min	$22,52^{h} \pm 0,00$	$21,93^{c} \pm 0,00$	$22,62^{h} \pm 0,00$	$22,58^{f} \pm 0,00$
Ascor max	$22,72^{i} \pm 0,01$	$22,88^{d} \pm 0,01$	$23,44^{j} \pm 0,01$	$23,31^{g} \pm 0,00$
SO_2 min	$21,93^{f} \pm 0,01$	$21,19^{b} \pm 0,00$	$21,43^{e} \pm 0,00$	$19,35^{h} \pm 0,01$
SO_2 max	$21,58^{c} \pm 0,00$	$20,60^{a} \pm 0,01$	$21,76^{g} \pm 0,01$	$20,42^{i} \pm 0,00$
All min	$22,36^{g} \pm 0,01$	$22,40^{d} \pm 0,01$	$19,75^{a} \pm 0,01$	$21,93^{j} \pm 0,01$
All max	$23,07^{j} \pm 0,00$	$23,55^{e} \pm 0,01$	$23,16^{i} \pm 0,00$	$22,15^{k} \pm 0,00$



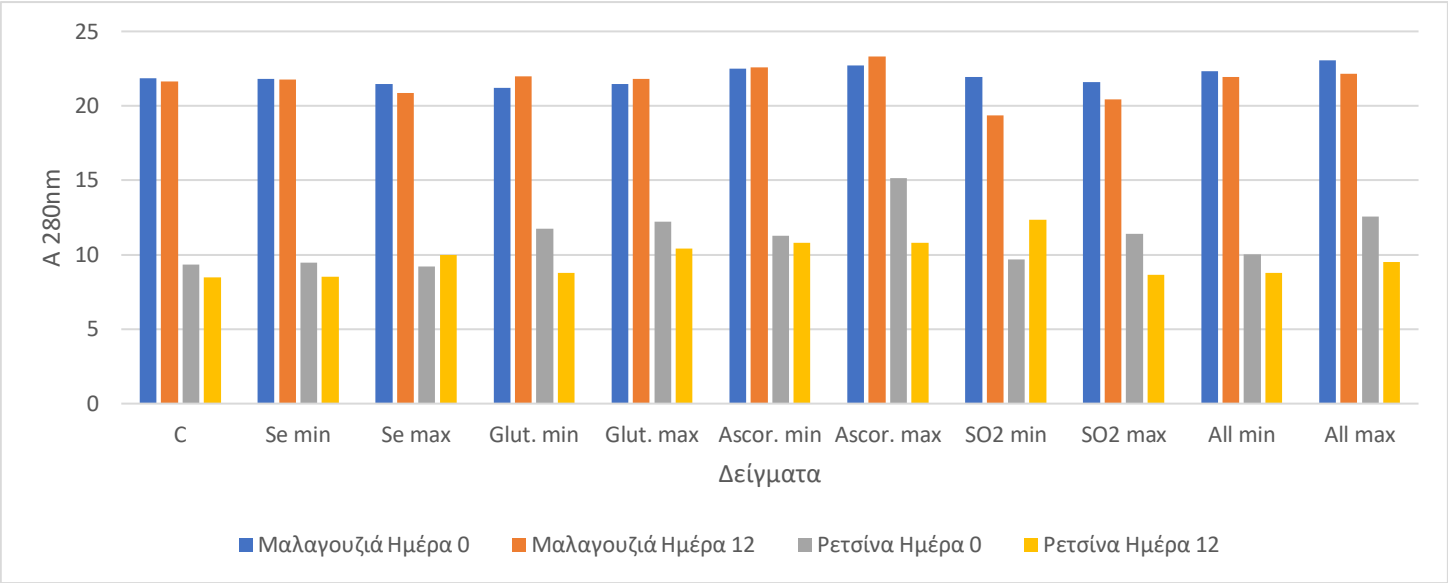
Διάγραμμα 22: Μεταβολή των απορροφήσεων από την ημέρα 0 έως τη 12 για τη ποικιλία Μαλαγουζιά.

Πίνακας 16: Αποτελέσματα εκτίμησης δείκτη φαινολικών ενώσεων με απορρόφηση στα 280 nm στο πείραμα επιταχυνόμενης οξείδωσης της ποικιλίας Ρετσίνα. Όλες οι τιμές είναι εκφρασμένες σε nm πολλαπλασιασμένες με 25 όπου ήταν η αραίωση των δειγμάτων.
Τιμές με διαφορετικό εκθέτη εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 5% μετά από σύγκριση ανά στήλη.

Ρετσίνα	**Ημέρα 0**	**Ημέρα 4**	**Ημέρα 8**	**Ημέρα 12**
Μάρτυρας (Control)	$9{,}33^{b}$ ±0,01	$9{,}81^{d}$ ±0,01	$9{,}80^{b}$ ±0,00	$8{,}49^{a}$ ±0,00
Se min	$9{,}48^{c}$ ±0,01	$9{,}99^{f}$ ±0,00	$10{,}12^{f}$ ±0,01	$8{,}53^{b}$ ±0,01
Se max	$9{,}23^{a}$ ±0,00	$10{,}13^{g}$ ±0,01	$10{,}17^{g}$ ±0,00	$9{,}96^{g}$ ±0,00
Glut min	$11{,}77^{h}$ ±0,00	$9{,}83^{e}$ ±0,00	$9{,}96^{c}$ ±0,01	$8{,}80^{e}$ ±0,00
Glut max	12,21 ±0,01	$9{,}39^{a}$ ±0,01	$9{,}99^{d}$ ±0,00	$10{,}44^{h}$ ±0,00
Ascor min	$11{,}26^{f}$ ±0,01	$10{,}31^{h}$ ±0,01	$10{,}56^{j}$ ±0,01	$10{,}81^{g}$ ±0,00
Ascor max	$15{,}16^{j}$ ±0,03	$10{,}88^{j}$ ±0,00	$11{,}29^{k}$ ±0,01	$10{,}79^{i}$ ±0,00
SO_2 min	$9{,}67^{d}$ ±0,00	$9{,}60^{c}$ ±0,00	$10{,}02^{e}$ ±0,01	$12{,}34^{k}$ ±0,00
SO_2 max	$11{,}38^{g}$ ±0,00	$9{,}51^{b}$ ±0,00	$8{,}96^{a}$ ±0,00	$8{,}67^{c}$ ±0,00
All min	$10{,}02^{e}$ ±0,00	$10{,}47^{i}$ ±0,00	$10{,}20^{h}$ ±0,01	$8{,}78^{d}$ ±0,00
All max	$12{,}56^{i}$ ±0,00	$11{,}09^{k}$ ±0,01	$10{,}27^{i}$ ±0,00	$9{,}51^{f}$ ±0,00



Διάγραμμα 23: Μεταβολή των απορροφήσεων από την ημέρα 0 έως τη 12 για τη ποικιλία Ρετσίνα.



Διάγραμμα 24: Απορροφήσεις στα 280nm την ημέρα 0 και 12 για τις ποικιλίες Μαλαγουζιά και Ρετσίνα.

Τα αποτελέσματα από τη μέτρηση του ΔΦΟ των δειγμάτων της Μαλαγουζιάς, την ημέρα 0, όπως φαίνονται στον Πίνακα 15, δείχνουν πως όλα τα δείγματα είχαν σχεδόν τον ίδιο δείκτη με εξαίρεση το δείγμα All max . Η στατιστική ανάλυση έδειξε πως όλοι οι ΔΦΟ, την ημέρα 0, διέφεραν στατιστικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5%. Κατά τη διάρκεια του πειράματος όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 22, υπήρξαν κάποιες μεταβολές στους ΔΦΟ των δειγμάτων, με την ημέρα 4 να έχει τις λιγότερες στατιστικές σημαντικά διαφορές, σε επίπεδο σημαντικότητας 5%, συγκριτικά με την ημέρα 8. Αναλυτικότερα, η ανάλυση έδειξε ότι τα δείγματα Se max και SO_2 max δεν διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους, σε επίπεδο σημαντικότητας 5%, έχοντας όμως και τη μικρότερη τιμή ΔΦΟ. Ενώ, τη μεγαλύτερη τιμή ΔΦΟ την είχε το δείγμα All max, το οποίο διέφερε στατιστικά από όλα τα υπόλοιπα δείγματα. Τη $12^{η}$ μέρα τα δείγματα συνολικά φαίνεται πως δεν εμφάνισαν μεγάλη διαφορά στην τιμή του ΔΦΟ συγκριτικά με τη μέτρηση της ημέρας 0 (Πίνακας 15). Παρόλα αυτά, όλα τα δείγματα διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

Αντίστοιχα, τα αποτελέσματα από τη μέτρηση του ΔΦΟ των δειγμάτων της Ρετσίνας, όπως φαίνεται στον Πίνακα 16, δεν παρουσίασαν μεγάλες διακυμάνσεις μεταξύ τους την ημέρα 0. Επιπλέον, διέφεραν όλα τα δείγματα στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους σε επίπεδο σημαντικότητας 5%. Εντύπωση προκαλεί το γεγονός ότι τα δείγματα της Ρετσίνας, τα οποία προέρχονται από την ποικιλία Σαββατιανό, η οποία έχει μεγαλύτερη συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων από ότι η Μαλαγουζιά αλλά και το ρετσίνι

εμπεριέχει αρκετούς βενζολικούς δακτυλίους, εμφάνισαν μικρότερες τιμές του ΔΦΟ συγκριτικά με εκείνες της Μαλαγουζιάς (Proestos et al., 2005). Την ημέρα 4 παρατηρήθηκε μια αύξηση στις τιμές του ΔΦΟ των δειγμάτων C, Se min και Se max, ενός όλα τα υπόλοιπα δείγματα μειώθηκε. Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι όλα τα δείγματα διέφεραν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5% (Πίνακας 16). Αύξηση παρατηρήθηκε στις τιμές του ΔΦΟ την 8^{η} μέρα στα περισσότερα δείγματα με εξαίρεση τα δείγματα SO_2 max, All min και All max που σε αυτά συνεχίστηκε η μείωση της τιμής (Διάγραμμα 23). Τέλος, την ημέρα 12 στα δείγματα Glut max, Ascor min, Ascor max και SO_2 min υπολογίστηκε υψηλότερη τιμή του ΔΦΟ, συγκριτικά με εκείνη της ημέρας 8 (Πίνακας 16). Την 12^{η} ημέρα τη μικρότερη τιμή την είχε το δείγμα C, ενώ η στατιστική ανάλυση την ημέρα 8 και την ημέρα 12 έδειξε πως όλα τα δείγματα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

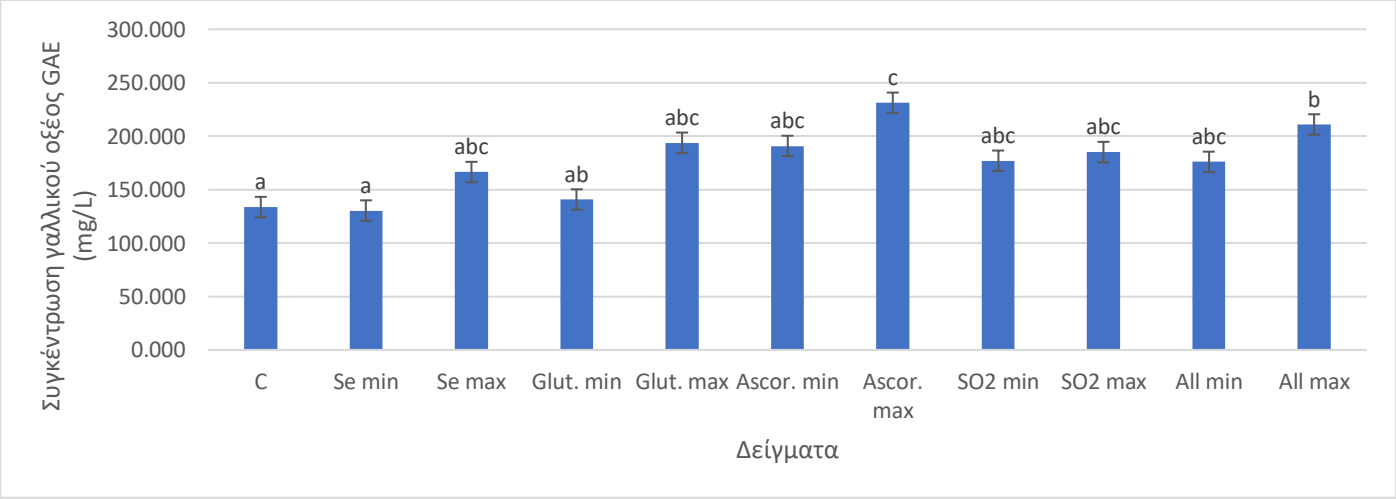
Ανάμεσα στις δύο ποικιλίες υπήρχε εξαρχής μια διαφορά, όσον αφορά τις τιμές των ΔΦΟ των δειγμάτων τους. Αν και ήταν αναμενόμενο, όπως προαναφέρθηκε και παραπάνω, τα δείγματα της Ρετσίνας να έχουν υψηλότερο ΔΦΟ, εν τέλει οι αναλύσεις έδειξαν πως τα δείγματα της Μαλαγουζιάς έχουν υψηλότερο ΔΦΟ. Καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος και στις δύο ποικιλίες υπήρξαν μικρές αυξομειώσεις στις τιμές, όμως χωρίς να υπάρξει μεγάλη μείωση μεταξύ των τιμών της ημέρας 0 και της ημέρας 12 (Διάγραμμα 24).

8.5. Ολικά φαινολικά συστατικά – Μέθοδος Folin-Ciocalteau

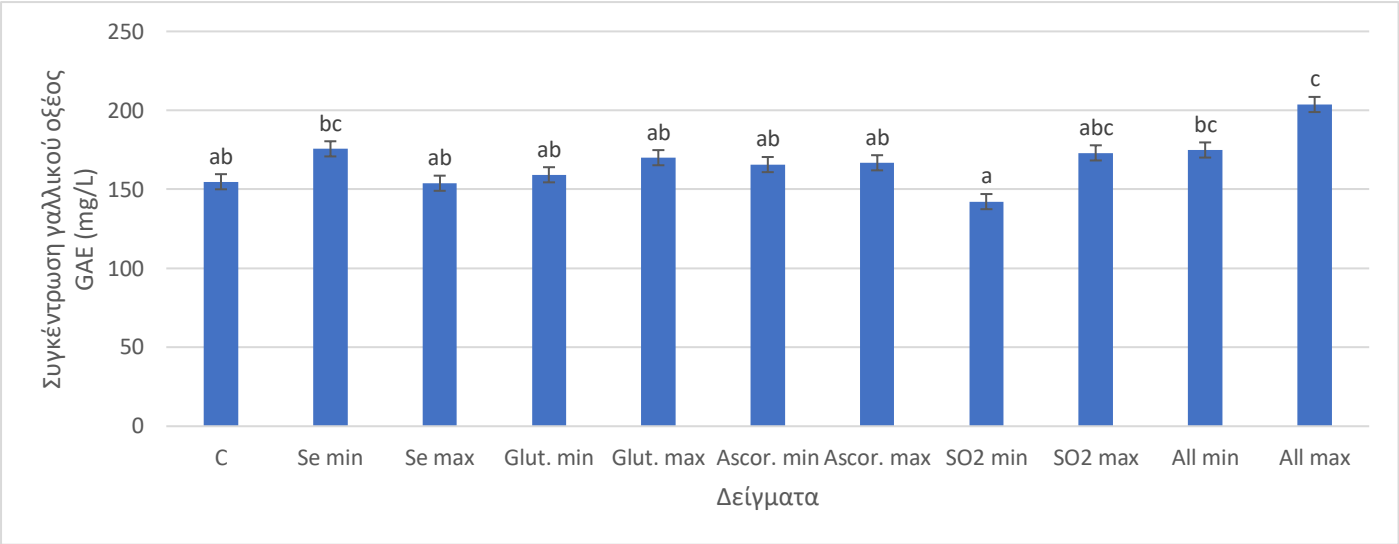
Η χρήση της μεθόδου Folin-Ciocalteau για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών συστατικών του οίνου είναι η επίσημα εγκεκριμένη από τον OIV. Είναι και αυτή φωτομετρική μέθοδος, σαν τη ΔΦΟ, παρόλα αυτά εμφανίζει δυσκολία στην υλοποίησή της. Στους Πίνακες 17 και 18 που ακολουθούν καταγράφονται τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις που έγιναν τις ημέρες 0, 4, 8 και 12 του πειράματος, και για τις 2 ποικιλίες. Οι τιμές είναι εκφρασμένες σε χιλιοστογραμμάρια γαλλικού οξέος στο λίτρο (GAE mg/L), και εκείνες με διαφορετικό εκθέτη εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

Πίνακας 17: Αποτελέσματα εκτίμησης ολικών φαινολικών συστατικών στο πείραμα επιταχυνόμενης οξείδωσης της ποικιλίας Μαλαγουζιά. Όλες οι τιμές είναι εκφρασμένες σε mg GAE/L.
Τιμές με διαφορετικό εκθέτη εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 5% μετά από σύγκριση ανά στήλη.

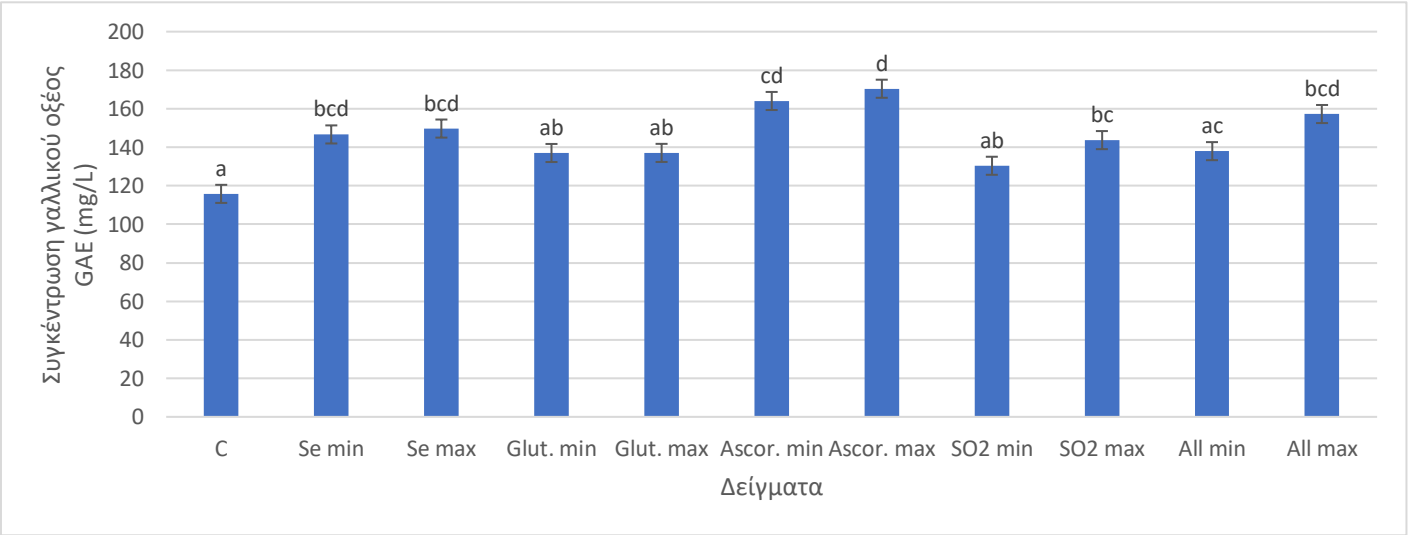
Μαλαγουζιά	**Ημέρα 0**	**Ημέρα 4**	**Ημέρα 8**	**Ημέρα 12**
Μάρτυρας (Control)	$213{,}82^{abc}$ ±19,67	$133{,}64^{a}$ ±1,54	$154{,}82^{ab}$ ±13,37	$115{,}77^{a}$ ±0,84
Se min	$169{,}82^{a}$ ±0,77	$130{,}36^{a}$ ±14,01	$175{,}64^{bc}$ ±11,06	$146{,}64^{bcd}$ ±2,44
Se max	$173{,}05^{a}$ ±16,26	$166{,}41^{abc}$ ±47,25	$153{,}86^{ab}$ ±1,48	$149{,}68^{bcd}$ ±6,62
Glut min	$197{,}05^{abc}$ ±23,21	$140{,}73^{ab}$ ±29,57	$159{,}23^{ab}$ ±3,15	$137{,}00^{ab}$ ±3,21
Glut max	$189{,}50^{ab}$ ±25,65	$193{,}77^{abc}$ ±0,45	$170{,}05^{ab}$ ±10,86	$137{,}05^{ab}$ ±7,26
Ascor min	$260{,}32^{cd}$ ±19,74	$190{,}82^{abc}$ ±0,39	$165{,}68^{ab}$ ±2,76	$164{,}00^{cd}$ ±9,00
Ascor max	$316{,}36^{d}$ ±11,83	$231{,}18^{c}$ ±7,59	$166{,}82^{ab}$ ±11,70	$170{,}36^{d}$ ±2,19
SO_2 min	$175{,}95^{a}$ ±10,35	$176{,}65^{abc}$ ±2,12	$142{,}23^{a}$ ±1,61	$130{,}36^{ab}$ ±6,94
SO_2 max	$183{,}32^{a}$ ±0,19	$185{,}09^{abc}$ ±1,29	$173{,}09^{abc}$ ±2,57	$143{,}68^{bc}$ ±8,55
All min	$241{,}18^{bc}$ ±22,11	$175{,}91^{abc}$ ±11,44	$174{,}91^{bc}$ ±6,17	$137{,}96^{ac}$ ±11,51
All max	$329{,}91^{d}$ ±12,86	$210{,}91^{b}$ ±0,51	$203{,}73^{c}$ ±6,30	$157{,}23^{bcd}$ ±8,04



Διάγραμμα 25: Συγκέντρωση των ολικών φαινολικών συστατικών στα δείγματα την ημέρα 4 για τη ποικιλία Μαλαγουζιά.



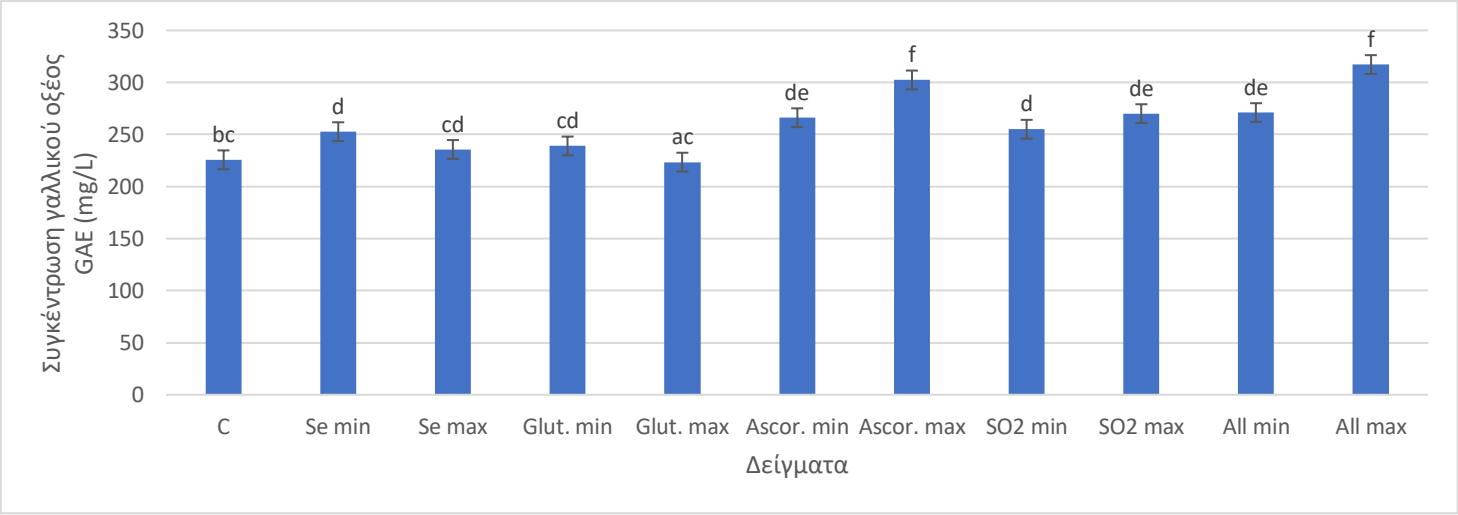
Διάγραμμα 26: Συγκέντρωση των ολικών φαινολικών συστατικών στα δείγματα την ημέρα 8 για τη ποικιλία Μαλαγουζιά.



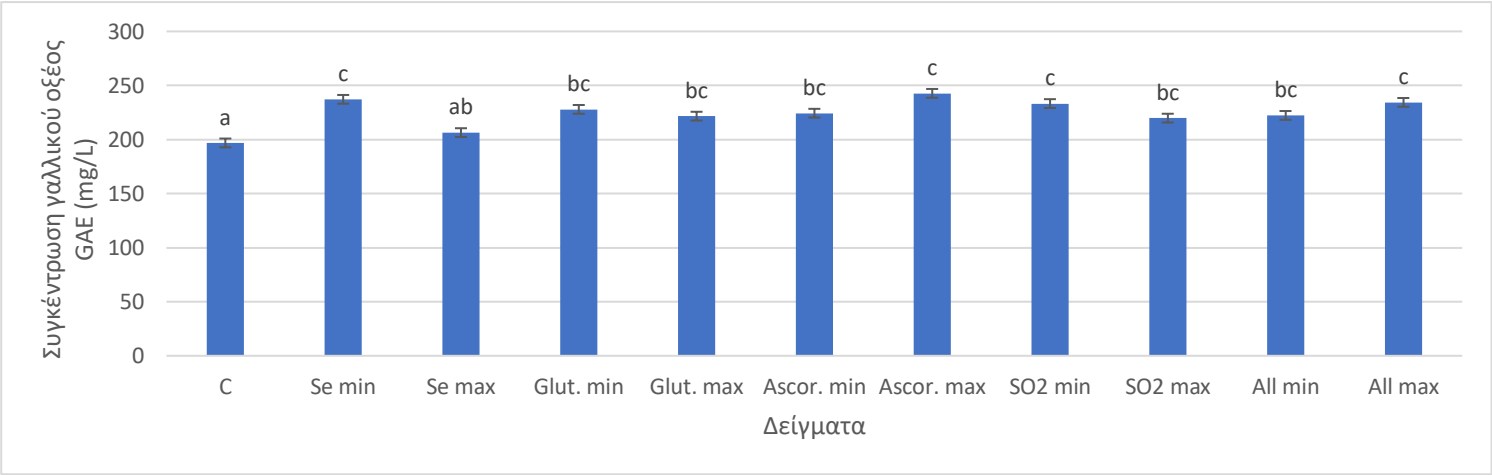
Διάγραμμα 27: Συγκέντρωση των ολικών φαινολικών συστατικών στα δείγματα την ημέρα 12 για τη ποικιλία Μαλαγουζιά.

Πίνακας 18: Αποτελέσματα εκτίμησης ολικών φαινολικών συστατικών στο πείραμα επιταχυνόμενης οξείδωσης της ποικιλίας Ρετσίνα. Όλες οι τιμές είναι εκφρασμένες σε mg GAE/L.
Τιμές με διαφορετικό εκθέτη εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 5% μετά από σύγκριση ανά στήλη.

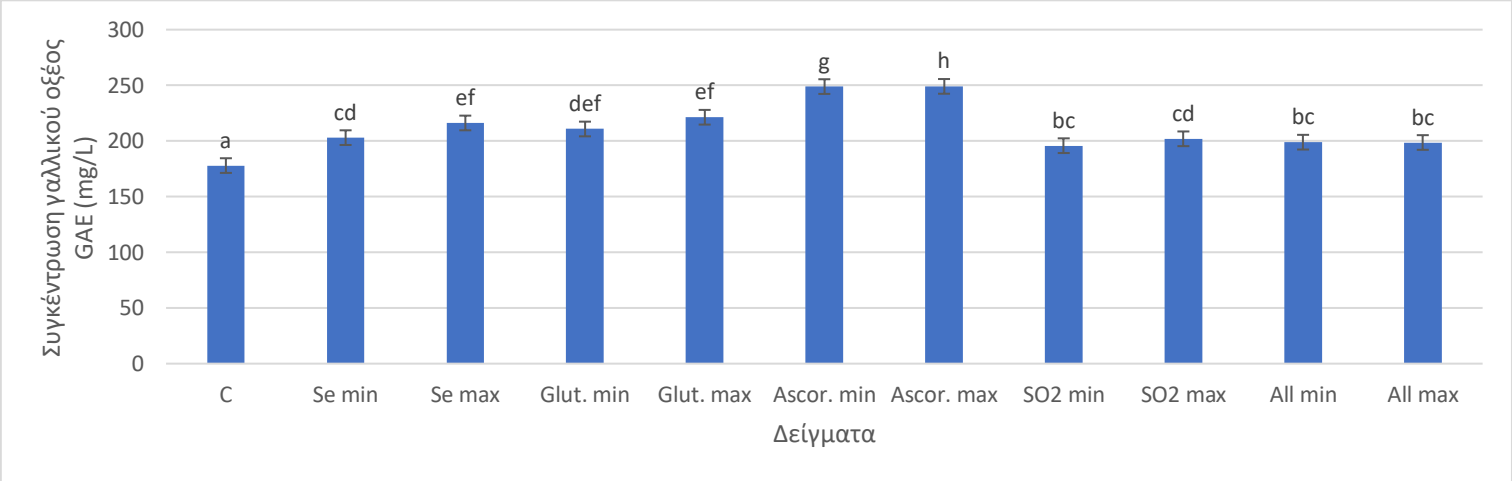
Ρετσίνα	**Ημέρα 0**	**Ημέρα 4**	**Ημέρα 8**	**Ημέρα 12**
Μάρτυρας (Control)	383,23^{c} ±24,75	225,73^{bc} ±5,01	196,86^{a} ±13,82	177,91^{a} ±2,57
Se min	323,86^{b} ±3,66	252,73^{d} ±4,11	237,18^{c} ±3,21	203,00^{cd} ±1,80
Se max	308,82^{b} ±0,13	235,64^{cd} ±5,66	206,41^{ab} ±4,69	216,18^{ef} ±1,80
Glut min	214,14^{a} ±19,86	239,00^{cd} ±2,06	227,91^{bc} ±0,64	210,77^{def} ±2,38
Glut max	289,36^{b} ±6,94	223,50^{ac} ±3,73	221,64^{bc} ±0,77	221,32^{ef} ±3,02
Ascor min	385,68^{c} ±9,96	266,14^{de} ±8,68	224,36^{bc} ±8,74	248,86^{g} ±4,69
Ascor max	492,18^{d} ±3,60	302,41^{f} ±9,32	242,73^{c} ±2,57	249,05^{h} ±3,28
SO_2 min	333,59^{b} ±13,44	255,05^{d} ±0,19	233,27^{c} ±2,70	195,77^{bc} ±0,70
SO_2 max	401,32^{c} ±12,92	270,05^{de} ±3,66	219,82^{bc} ±5,53	201,96^{cd} ±3,66
All min	384,73^{c} ±16,97	271,05^{de} ±3,41	222,32^{bc} ±1,09	198,91^{bc} ±5,40
All max	486,05^{d} ±4,82	317,18^{f} ±4,76	234,36^{c} ±4,37	198,64^{bc} ±3,73



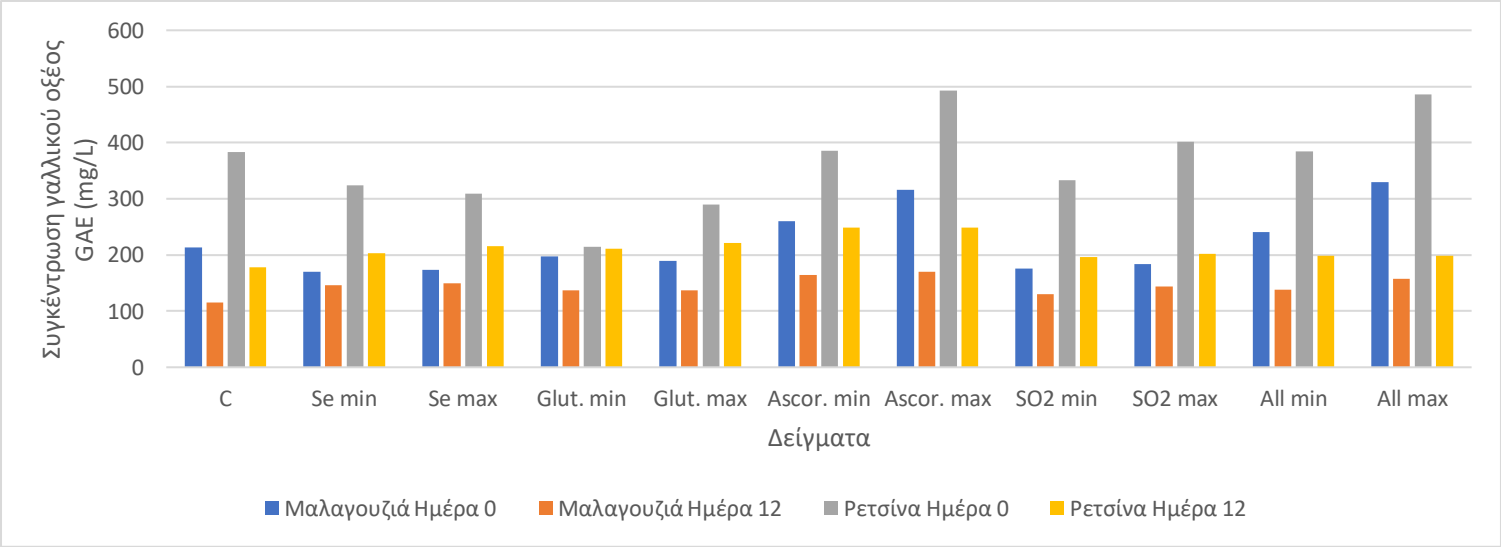
Διάγραμμα 28: Συγκέντρωση των ολικών φαινολικών συστατικών στα δείγματα την ημέρα 4 για τη ποικιλία Ρετσίνα.



Διάγραμμα 29: Συγκέντρωση των ολικών φαινολικών συστατικών στα δείγματα την ημέρα 8 για τη ποικιλία Ρετσίνα.



Διάγραμμα 30: Συγκέντρωση των ολικών φαινολικών συστατικών στα δείγματα την ημέρα 12 για τη ποικιλία Ρετσίνα.



Διάγραμμα 31: Συγκεντρώσεις των ολικών φαινολικών συστατικών στα δείγματα την ημέρα 0 και 12 για τις ποικιλίες Μαλαγουζιά και Ρετσίνα.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των φαινολικών ενώσεων του οίνου είναι απαραίτητος, λόγω του ότι αποτελούν τα φυσικά αντιοξειδωτικά του. Ως αποτέλεσμα, σε ένα πείραμα επιταχυνόμενης οξείδωσης, όπου ο οίνος εκτίθεται σε υψηλή θερμοκρασία παρουσία οξυγόνου, είναι αναμενόμενη η μείωση της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών ενώσεων του κατά τη διάρκεια του πειράματος.

Η μέτρηση της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών συστατικών των δειγμάτων της Μαλαγουζιάς την ημέρα 0, όπως φαίνεται στον Πίνακα 17, παρουσίασε αρκετές διακυμάνσεις στις τιμές του κάθε δείγματος. Πιο συγκεκριμένα, τα δείγματα C, Se min, Se max, Glut min, Glut max και SO_2 min ήταν εκείνα με τις μικρότερες συγκεντρώσεις, τα οποία, παράλληλα, δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5% μεταξύ τους. Τις μεγαλύτερες τιμές συγκεντρώσεων ολικών φαινολικών συστατικών παρουσίασαν τα δείγματα Ascor max και All max, τα οποία διέφεραν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5%, από όλα τα υπόλοιπα δείγματα, αλλά όχι μεταξύ τους. Την 4^{η} ημέρα υπήρξε μια πτώση της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών ενώσεων των δειγμάτων, συνολικά (Διάγραμμα 25), με τα δείγματα Ascor max, All max, C και Se min να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5% μεταξύ τους, αλλά όχι με τα υπόλοιπα δείγματα. Τη μεγαλύτερη συγκέντρωση φαινολικών συστατικών την είχε το δείγμα Ascor max ενώ τη μικρότερη το δείγμα Se min. Την 8^{η} ημέρα (Διάγραμμα 26) υπήρξε μια σταθεροποίηση σχεδόν όλων των δειγμάτων όσον αφορά τη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων, με το δείγμα SO_2 min να εμφανίζει τη μικρότερη τιμή και το δείγμα All max την υψηλότερη. Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι τα δείγματα SO_2 min και All max διέφεραν στατιστικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5% μεταξύ τους αλλά όχι και με όλα τα υπόλοιπα δείγματα, τα οποία εμφάνισαν αρκετές στατιστικές συσχετίσεις μεταξύ τους. Την 12^{η} ημέρα η μέτρηση των ολικών φαινολικών συστατικών των δειγμάτων εμφάνισε τιμές μικρότερες συγκριτικά με εκείνες της ημέρας 0 (Πίνακας 17), όπως ήταν αναμενόμενο, το οποίο συμφωνεί με αντίστοιχη μελέτη των Pati et al. (2019). Αν και το δείγμα Ascor min είχε τη μεγαλύτερη συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων (Διάγραμμα 27), τα δείγματα Se min και Se max είχαν την μικρότερη διαφορά μεταξύ των συγκεντρώσεων των ημερών 0 και 12. Στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδο σημαντικότητας 5%, με το δείγμα C εμφάνισαν τα δείγματα Se min, Se max, Ascor min, Ascor max, SO_2 max και All max.

Οι μετρήσεις για τη συγκέντρωση των ολικών φαινολικών ενώσεων των δειγμάτων της Ρετσίνας την ημέρα 0 που παρατίθενται στον Πίνακα 18, φανερώνουν αρχικά μια αυξημένη συγκέντρωση, συγκριτικά με τα αντίστοιχα δείγματα της Μαλαγουζιάς την ίδια ημέρα. Αναλυτικότερα, τα δείγματα Ascor max και All max είχαν τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις και διέφεραν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5% από όλα τα υπόλοιπα δείγματα. Το δείγμα Glut min είχε τη μικρότερη τιμή συγκεντρώσεις ολικών φαινολικών ενώσεων και διέφερε και αυτό στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5% από όλα τα υπόλοιπα δείγματα. Δεν παρατηρήθηκε στατιστική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων Se min, Se max, Glut max και SO_2 min, αλλά και μεταξύ των δειγμάτων C, Ascor min, SO_2 max και All min. Την 4η ημέρα (Διάγραμμα 28) όλα τα δείγματα, εκτός του Glut min, εμφάνισαν μείωση στις συγκεντρώσεις των ολικών φαινολικών τους, γεγονός που συμφωνεί με έρευνα των De Beer et al. (2005), όπου παρατήρησαν και εκείνοι πώς η παραμονή λευκών οίνων σε υψηλές θερμοκρασίες οδηγεί στη μείωση της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών συστατικών τους. Με εξαίρεση τα δείγματα Ascor max και All max, τα οποία είχαν τις μεγαλύτερες τιμές αλλά και διέφεραν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5% από όλα τα υπόλοιπα, όλα τα άλλα δείγματα δεν εμφάνισαν μεγάλες διακυμάνσεις μεταξύ των συγκεντρώσεων τους, κάτι που επαληθεύτηκε και από την στατιστική ανάλυση. Την ημέρα 8 όλα τα δείγματα παρουσίασαν μείωση στην συγκέντρωση των ολικών φαινολικών συστατικών τους με το δείγμα C να έχει τη μικρότερη τιμή (Διάγραμμα 29) και να διαφέρει στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5% από όλα τα υπόλοιπα. τα δείγματα Se min, Ascor max Και All max είχαν τις υψηλότερες τιμές. Η στατιστική ανάλυση έδειξε πως τα δείγματα Glut min, Glut max, Ascor min, SO_2 min και SO_2 max δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους σε επίπεδο σημαντικότητας 5% (Πίνακας 18). Την ημέρα 12 υπολογίστηκαν στα δείγματα Se max, Ascor min και Ascor max υψηλότερες τιμές συγκριτικά με εκείνες της ημέρας 8, ενώ σε όλα τα υπόλοιπα δείγματα υπήρξε και περεταίρω μείωση. Το δείγμα C είχε τη μικρότερη τιμή και τα δείγματα Ascor min f και Ascor max τις υψηλότερες, ενώ η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι και τα 3 δείγματα διέφεραν στατιστικά και μεταξύ τους αλλά και με όλα τα υπόλοιπα δείγματα. Στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδο σημαντικότητας 5% δεν παρατηρήθηκε μεταξύ των δειγμάτων Se min και SO_2 max, μεταξύ των δειγμάτων Se max και Glut max, αλλά και μεταξύ των δειγμάτων SO_2 min, All min και All max (Διάγραμμα 30).

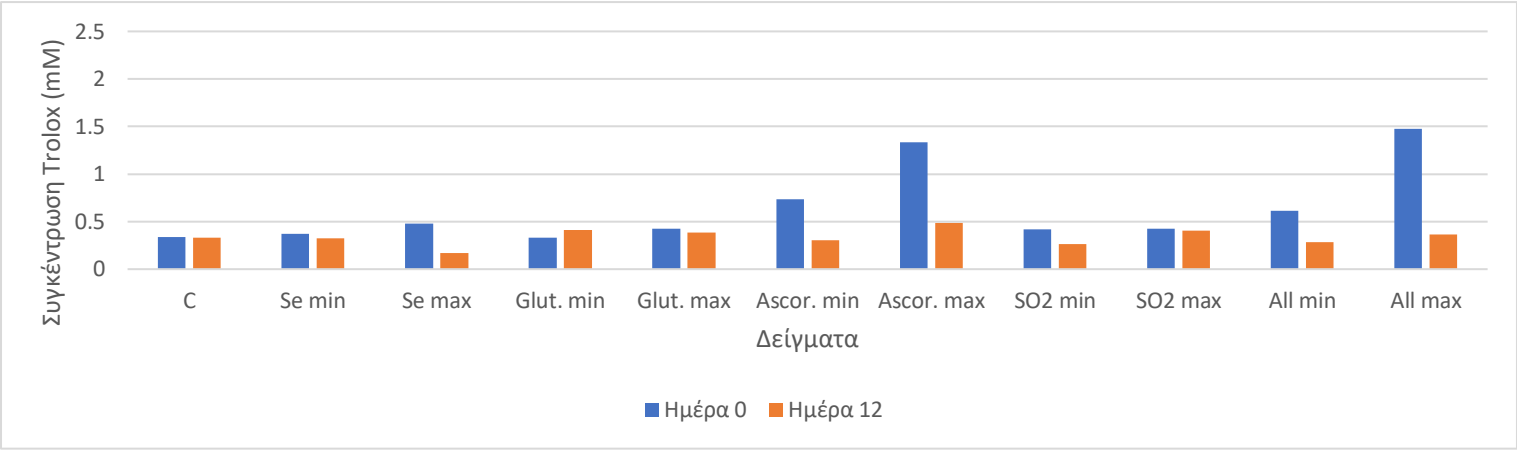
Στην ανάλυση τις μετρήσεις των ολικών φαινολικών συστατικών των δειγμάτων και των δύο ποικιλιών παρατηρήθηκε πως κατά τη διάρκεια του πειράματος της επιταχυνόμενης οξείδωσης όλα τα δείγματα παρουσίασαν μείωση των τιμών τους. Επιπλέον, παρόλο που τα δείγματα της Ρετσίνας είχαν μεγαλύτερη συγκέντρωση φαινολικών την ημέρα 0 από τα δείγματα της Μαλαγουζιάς, ποσοστιαία είχαν σχεδόν την ίδια μείωση. Την τελευταία ημέρα του πειράματος και για τις δύο ποικιλίες τη μικρότερη τιμή συγκέντρωσης ολικών φαινολικών συστατικών είχε το δείγμα C ενώ τις μεγαλύτερες τα δείγματα Ascor min και Ascor max (Διάγραμμα 31).

8.6. Αντιοξειδωτική ικανότητα – Μέθοδος DPPH

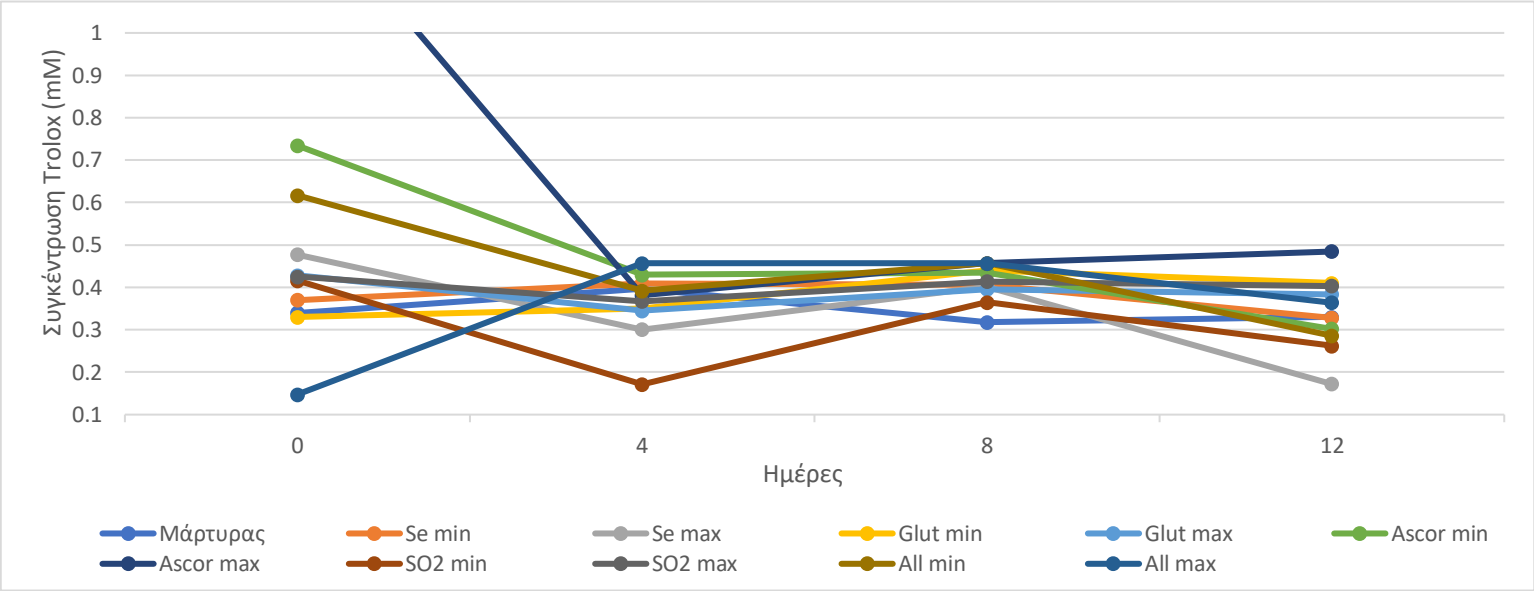
Η μέθοδος DPPH που χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Blois (1958), όπου την ανέπτυξε. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων τις ημέρες 0, 4, 8 και 12 του πειράματος, και για τις 2 ποικιλίες, καταγράφονται στους Πίνακες 19 και 20. Οι τιμές εκφράζονται σε χιλιοστοϊσοδύναμα Trolox (mM Trolox) και εκείνος με διαφορετικό εκθέτη εμφανίζουν σημαντικά στατιστική διαφορά σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

Πίνακας 19: Αποτελέσματα εκτίμησης αντιοξειδωτικής ικανότητας nm στο πείραμα επιταχυνόμενης οξείδωσης της ποικιλίας Μαλαγουζιά. Όλες οι τιμές είναι εκφρασμένες σε mM Trolox.
Τιμές με διαφορετικό εκθέτη εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 5% μετά από σύγκριση ανά στήλη.

Μαλαγουζιά	**Ημέρα 0**	**Ημέρα 4**	**Ημέρα 8**	**Ημέρα 12**
Μάρτυρας (Control)	$0,34^{a}$ ±0,15	$0,40^{a}$ ±0,11	$0,32^{a}$ ±0,05	$0,33^{ab}$ ±0,02
Se min	$0,37^{a}$ ±0,05	$0,41^{a}$ ±0,06	$0,41^{a}$ ±0,13	$0,33^{ab}$ ±0,01
Se max	$0,48^{a}$ ±0,03	$0,30^{a}$ ±0,04	$0,40^{a}$ ±0,08	$0,17^{a}$ ±0,03
Glut min	$0,33^{a}$ ±0,17	$0,35^{a}$ ±0,17	$0,44^{a}$ ±0,03	$0,41^{ab}$ ±0,01
Glut max	$0,43^{a}$ ±0,00	$0,35^{a}$ ±0,09	$0,40^{a}$ ±0,03	$0,38^{ab}$ ±0,08
Ascor min	$0,73^{a}$ ±0,02	$0,43^{a}$ ±0,03	$0,43^{a}$ ±0,05	$0,30^{ab}$ ±0,01
Ascor max	$1,33^{b}$ ±0,05	$0,38^{a}$ ±0,12	$0,46^{a}$ ±0,02	$0,49^{b}$ ±0,15
SO_2 min	$0,42^{a}$ ±0,02	$0,17^{a}$ ±0,10	$0,37^{a}$ ±0,00	$0,26^{ab}$ ±0,06
SO_2 max	$0,43^{a}$ ±0,15	$0,37^{a}$ ±0,13	$0,41^{a}$ ±0,03	$0,40^{ab}$ ±0,16
All min	$0,62^{a}$ ±0,04	$0,39^{a}$ ±0,06	$0,46^{a}$ ±0,05	$0,29^{ab}$ ±0,05
All max	$1,47^{b}$ ±0,20	$0,46^{a}$ ±0,25	$0,4^{a}$ ±0,05	$0,36^{ab}$ ± 0,08



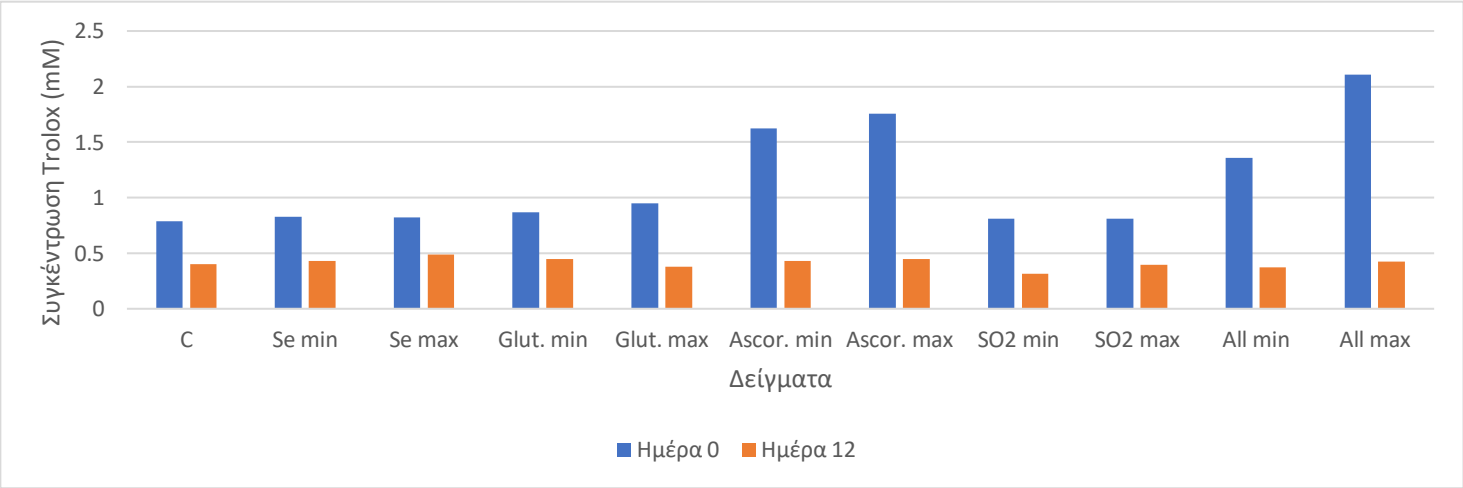
Διάγραμμα 32: Μεταβολή της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων από την ημέρα 0 έως τη 12 για τη ποικιλία Μαλαγουζιά.



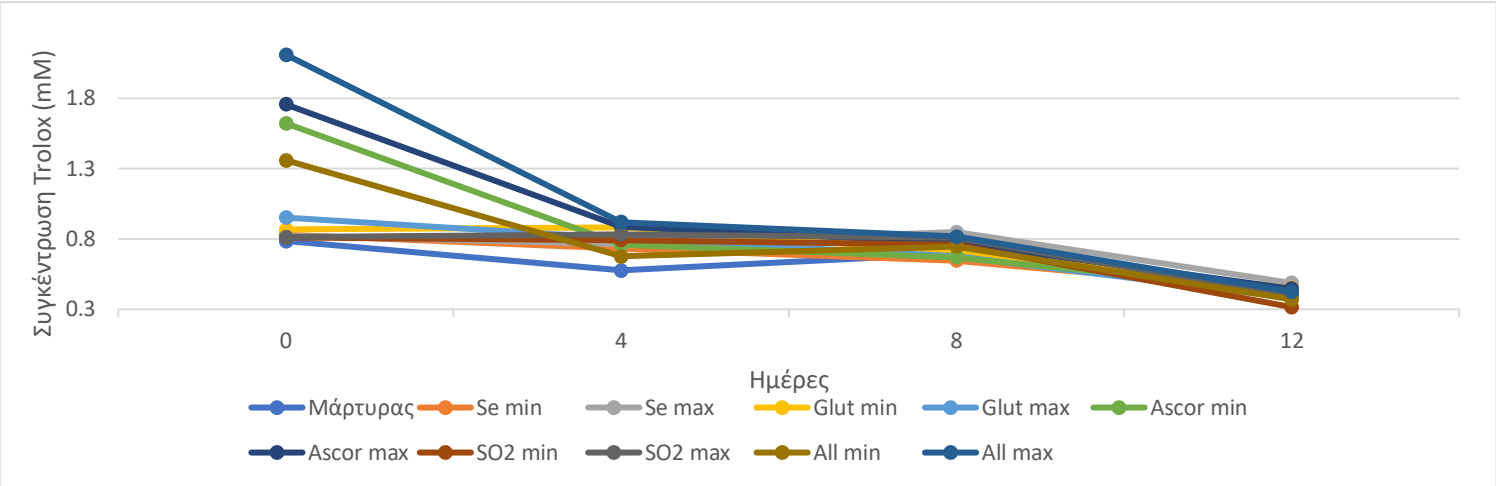
Διάγραμμα 33: Σύγκριση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων την ημέρα 0 και 12 για τη ποικιλία Μαλαγουζιά.

Πίνακας 20: Αποτελέσματα εκτίμησης αντιοξειδωτικής ικανότητας nm στο πείραμα επιταχυνόμενης οξείδωσης της ποικιλίας Ρετσίνα. Όλες οι τιμές είναι εκφρασμένες σε mM Trolox.
Τιμές με διαφορετικό εκθέτη εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 5% μετά από σύγκριση ανά στήλη.

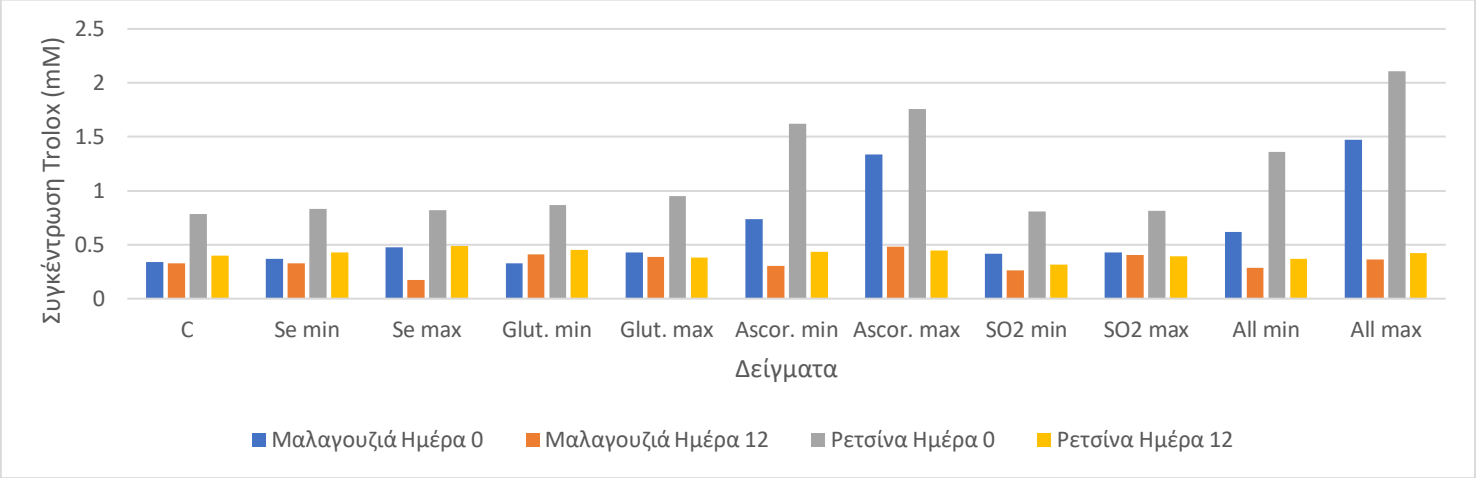
Ρετσίνα	**Ημέρα 0**	**Ημέρα 4**	**Ημέρα 8**	**Ημέρα 12**
Μάρτυρας (Control)	0,785^{a} ±0,28	0,58^{a} ±0,03	0,69^{a} ±0,03	0,40^{a} ±0,09
Se min	0,83^{a}±0,17	0,73^{a} ±0,04	0,65^{a} ±0,06	0,43^{a} ±0,09
Se max	0,822^{a} ±0,04	0,76^{a} ±0,16	0,85^{a} ±0,15	0,49^{a} ±0,00
Glut min	0,87^{a} ±0,08	0,88^{a} ±0,01	0,71^{a} ±0,02	0,45^{a} ±0,06
Glut max	0,95^{a} ±0,02	0,80^{a} ±0,04	0,68^{a} ±0,02	0,38^{a} ±0,03
Ascor min	1,62^{ab} ±0,22	0,76^{a} ±0,07	0,67^{a} ±0,02	0,43^{a} ±0,01
Ascor max	1,76^{ab} ±0,66	0,89^{a} ±0,15	0,77^{a} ±0,06	0,45^{a} ±0,01
SO_2 min	0,81^{a} ±0,04	0,79^{a} ±0,09	0,76^{a} ±0,06	0,32^{a} ±0,01
SO_2 max	0,81^{a} ±0,07	0,83^{a} ±0,09	0,81^{a} ±0,06	0,40^{a} ±0,04
All min	1,36^{ab} ±0,08	0,68^{a} ±0,09	0,75^{a} ±0,06	0,37^{a} ±0,04
All max	2,11^{b} ±0,25	0,92^{a} ±0,03	0,82^{a} ±0,04	0,43^{a} ±0,04



Διάγραμμα 34: Σύγκριση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων την ημέρα 0 και 12 για τη ποικιλία Ρετσίνα.



Διάγραμμα 35: Μεταβολή της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων από την ημέρα 0 και τη 12 για τη ποικιλία Ρετσίνα.



Διάγραμμα 36: Μεταβολές της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων από την ημέρα 0 και 12 για τις ποικιλίες Μαλαγουζιά και Ρετσίνα.

Τα δείγματα και από τις δύο ποικιλίες, εξαιτίας της έκθεσης τους σε υψηλές θερμοκρασίες και σε οξυγόνο, κατά τη διάρκεια του πειράματος επιταχυνόμενης οξείδωσης, είναι λογικό να εμφανίσουν μείωση της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας στο πέρασμα του χρόνου. Η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα των οίνων εμπεριέχει πέρα από την περιεκτικότητα του σε φαινολικά συστατικά, και την προστασία που του παρέχουν επιπρόσθετα αντιοξειδωτικά.

Όλα τα δείγματα της ποικιλίας της Μαλαγουζιάς εμφάνισαν μείωση της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας κατά τη διάρκεια του πειράματος, που κυρίως οφείλεται στην οξείδωση και κατά συνέπεια στη μείωση των αντιοξειδωτικών

συστατικών που περιείχαν, συμπέρασμα που κατέληξαν και οι Vlachou et al. (2022) σε αντίστοιχο πείραμα. Την ημέρα 0 (Πίνακας 19) τις μεγαλύτερες μετρήσεις αντιοξειδωτικής ικανότητας φαίνεται πως είχαν τα δείγματα που εμπεριείχαν ασκορβικό οξύ, μόνο του ή με όλες τις προσθήκες (Ascor min, Ascor max, All min και All max), και τα οποία διέφεραν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5% από όλα τα υπόλοιπα δείγματα. Από την άλλη μεριά, τα ίδια δείγματα την 12^{η} ημέρα εμφάνισαν τη μεγαλύτερη πτώση στην αντιοξειδωτική τους ικανότητα. Σε σταθερό επίπεδο διατηρήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των δειγμάτων C, Se min, Glut min, Glut max και SO2 max (Διάγραμμα 33). Το δείγμα Ascor max αν και είχε τη μεγαλύτερη πτώση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, διατήρησε να έχει την υψηλότερη τιμή και να διαφέρει στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5% μόνο από το δείγμα Se max, που αντίστοιχα είχε και τη μικρότερη τιμή. Όλα τα υπόλοιπα δείγματα δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά (Πίνακας 19). Τις ημέρες 4 και 8 του πειράματος παρατηρήθηκε μια σταδιακή μείωση στις τιμές της αντιοξειδωτικής ικανότητας όλων των δειγμάτων (Πίνακας 19), με εξαίρεση το δείγμα Se min η οποία εμφάνισε την ημέρα 4 αύξηση, και κατά τη στατιστική ανάλυση των τιμών για τις δύο αυτές μέρες δεν ανιχνεύτηκε κάποια στατιστική σημαντική διαφορά σε επίπεδο σημαντικότητας 5% μεταξύ όλων των δειγμάτων (Διάγραμμα 32).

Τα δείγματα της Ρετσίνας την ημέρα 0 εμφάνισαν αυξημένες τιμές στη μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας (Πίνακας 20), συγκριτικά με τα δείγματα της Μαλαγουζιάς, το οποίο οφείλεται κυρίως στις αυξημένες συγκεντρώσεις φαινολικών ενώσεων που διαθέτει η συγκεκριμένη ποικιλία. Τις μεγαλύτερες τιμές εμφάνισαν τα δείγματα στα οποία έχει γίνει προσθήκη ασκορβικού οξέος, μόνο του ή με τις προσθήκες και των υπόλοιπων αντιοξειδωτικών (Ascor min, Ascor max, All min και All max). Την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα τη διέθετε το δείγμα All max, το οποίο διέφερε στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5% από τα δείγματα. Την 4η ημέρα του πειράματος υπήρξε πτώση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων, που έρχεται σε συμφωνία με τη μελέτη των Paixao et al. (2007), με εξαίρεση τα δείγματα Glut min και SO_2 max. Συγκριτικά με την ημέρα 0, τη μικρότερη πτώση της αντιοξειδωτικής ικανότητας είχαν τα δείγματα Se min, Se max και SO_2 min. Δεν παρατηρήθηκε στατιστική σημαντική διαφορά σε επίπεδο σημαντικότητας 5% μεταξύ των δειγμάτων. Την ημέρα 8 συνεχίστηκε η μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας όλων των δειγμάτων, με εξαίρεση τα δείγματα C, Se max και All min που

σημείωσαν αύξηση (Διάγραμμα 34). Την τελευταία ημέρα του πειράματος, την ημέρα 12, όλα τα δείγματα εμφάνισαν μείωση στην αντιοξειδωτική ικανότητα, με τα δείγματα Se max, Glut min και Se min να έχουν τις υψηλότερες τιμές και το δείγμα SO_2 min τη μικρότερη (Διάγραμμα 35). Την ημέρα 8 όπως και την ημέρα 12 κανένα δείγμα δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδο σημαντικότητας 5% με τα υπόλοιπα (Πίνακας 20). Τα δείγματα C, Se min, Se max και Glut min ήταν εκείνα που εμφάνισαν την μικρότερη μείωση της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας σε όλη τη διάρκεια του πειράματος (Διάγραμμα 34).

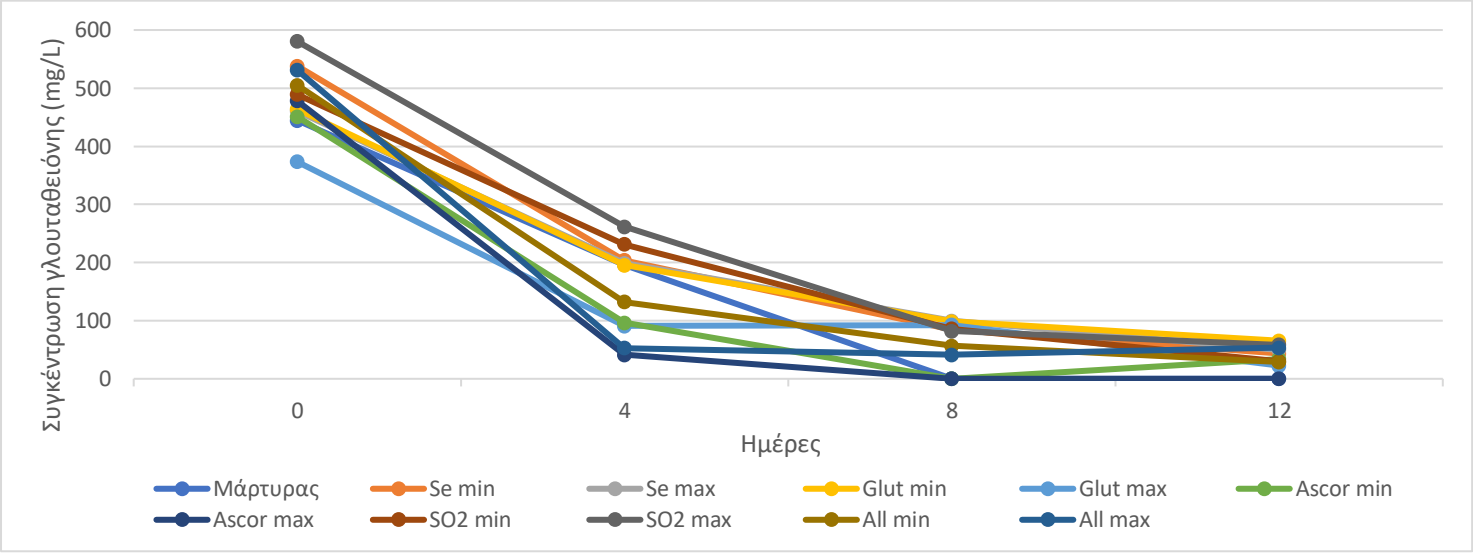
Συγκριτικά οι δύο ποικιλίες εμφάνισαν διαφορές στα δείγματα τους από την ημέρα 0, με τα δείγματα της Ρετσίνας να έχουν σχεδόν διπλάσια αντιοξειδωτική ικανότητα από ότι τα δείγματα της Μαλαγουζιάς. Και στις δύο ποικιλίες τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα, την ημέρα 0, είχαν τα δείγματα με την μεγαλύτερη συγκέντρωση ασκορβικού οξέος, Ascor max και All max. Με το πέρας του πειράματος της επιταχυνόμενης οξείδωσης, τα δείγματα της Ρετσίνας αν και εμφάνισαν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα από εκείνα της Μαλαγουζιάς, είχαν μεγαλύτερη μείωση συγκριτικά με την ημέρα 0. Επίσης, και στις δύο ποικιλίες τη μικρότερη μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας εμφάνισαν τα δείγματα C, Se min, Se max και Glut min (Διάγραμμα 36).

8.7. Ολικές ελεύθερες σουλφυδρυλομάδες (SH) – Μέθοδος Ellman

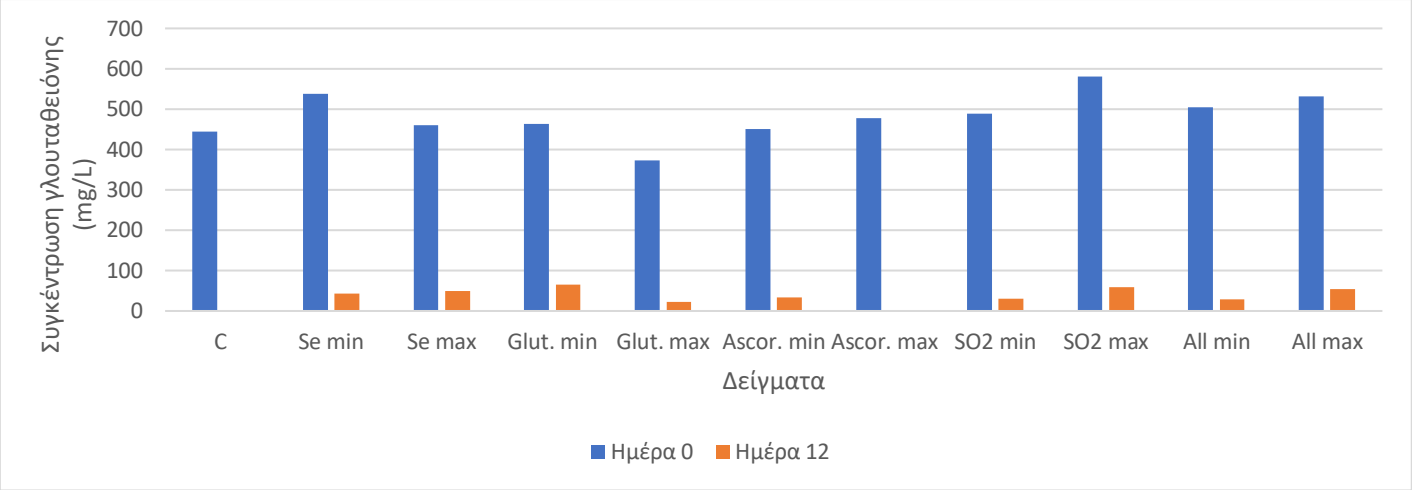
Η μέτρηση των ολικών ελεύθερων σουλφυδρυλομάδων ομάδων κρίθηκε απαραίτητη εξαιτίας πολλών μελετών που έχουν αποδείξει πως ενώσεις με ελεύθερες σουλφυδρυλομάδες στους οίνους (γλουταθειόνη, κυστεΐνη και θειόλες), προσφέρουν αντιοξειδωτική προστασία, κυρίως προστατεύοντας τις πτητικές ενώσεις του αρώματος (Roussis et al., 2009). Η μέτρηση έγινε την ημέρα 0, 4, 8 και 12 του πειράματος και για τις 2 ποικιλίες. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στους Πίνακες 21 και 22 με τις τιμές να είναι εκφρασμένες σε χιλιοστογραμμάρια γλουταθειόνης στο λίτρο (GSH mg/L), ενώ οι τιμές με διαφορετικό εκθέτη εμφάνισαν στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

Πίνακας 21: Αποτελέσματα εκτίμησης ολικών ελεύθερων σουλφυδρυλομάδων στο πείραμα επιταχυνόμενης οξείδωσης της ποικιλίας Μαλαγουζιά. Όλες οι τιμές είναι εκφρασμένες σε mg GSH/L.
Τιμές με διαφορετικό εκθέτη εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 5% μετά από σύγκριση ανά στήλη.

Μαλαγουζιά	**Ημέρα 0**	**Ημέρα 4**	**Ημέρα 8**	**Ημέρα 12**
Μάρτυρας (Control)	$444,55^{bcd}$ ±4,89	$196,02^{de}$ ±1,45	$0,00^{a}$ ±0,00	$0,00^{ac}$ ±0,00
Se min	$537,98^{hi}$ ±3,12	$203,59^{ef}$ ±2,44	$84,77^{c}$ ±2,51	$43,64^{def}$ ±8,74
Se max	$460,18^{def}$ ±11,83	$198,71^{ef}$ ±6,85	$99,46^{c}$ ±7,26	$49,52^{efg}$ ±8,26
Glut min	$463,50^{def}$ ±12,21	$195,61^{de}$ ±9,16	$98,59^{c}$ ±9,84	$65,57^{g}$ ±0,35
Glut max	$373,27^{a}$ ±4,82	$90,66^{b}$ ±5,75	$92,46^{c}$ ±15,69	$22,75^{ac}$ ±0,42
Ascor min	$450,89^{cde}$ ±9,48	$96,18^{b}$ ±10,86	$0,00^{a}$ ±0,00	$34,11^{c}$ ±6,78
Ascor max	$477,93^{def}$ ±10,38	$41,57^{a}$ ±6,59	$0,00^{a}$ ±0,00	$0,00^{ac}$ ±0,00
SO_2 min	$488,84^{efg}$ ±13,79	$231,41^{fg}$ ±16,26	$85,68^{c}$ ±4,37	$30,14^{bc}$ ±0,32
SO_2 max	$580,32^{i}$ ±25,52	$261,77^{g}$ ±0,32	$82,23^{c}$ ±2,57	$58,23^{fg}$ ±0,00
All min	$504,89^{fgh}$ ±11,86	$131,93^{c}$ ±16,04	$56,91^{b}$ ±6,88	$29,00^{bc}$ ±2,70
All max	$530,91^{gh}$ ±10,41	$53,07^{a}$ ±2,09	$41,55^{b}$ ±2,57	$53,50^{fg}$ ±0,84



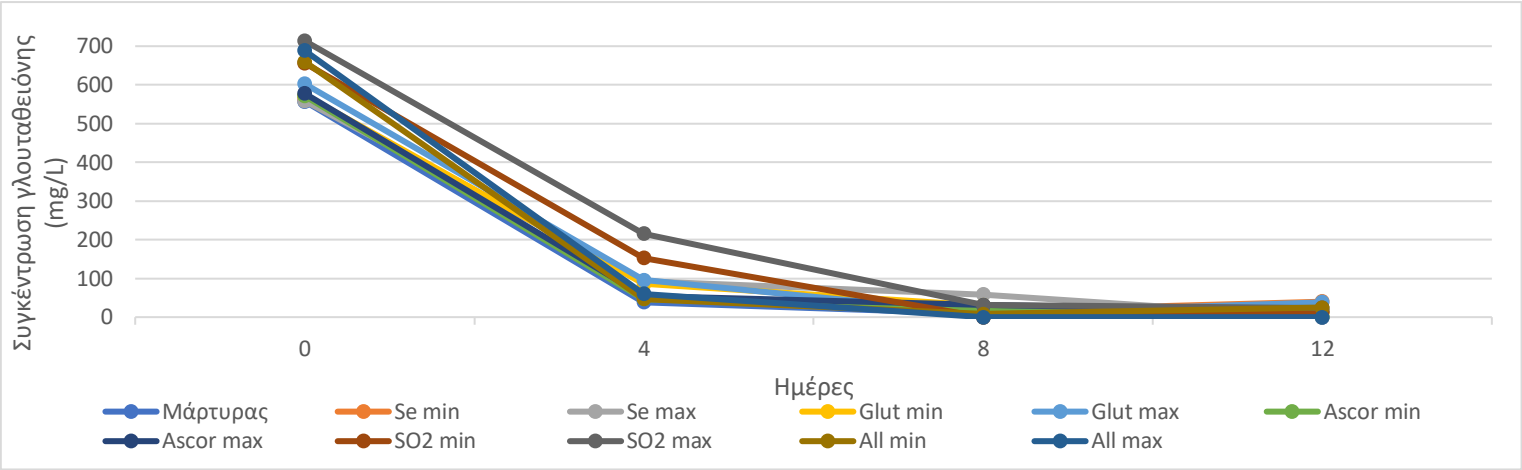
Διάγραμμα 37: Μεταβολή της συγκέντρωσης των ολικών ελεύθερων σουλφυδρυλομάδων των δειγμάτων από την ημέρα 0 έως τη 12 για τη ποικιλία Μαλαγουζιά



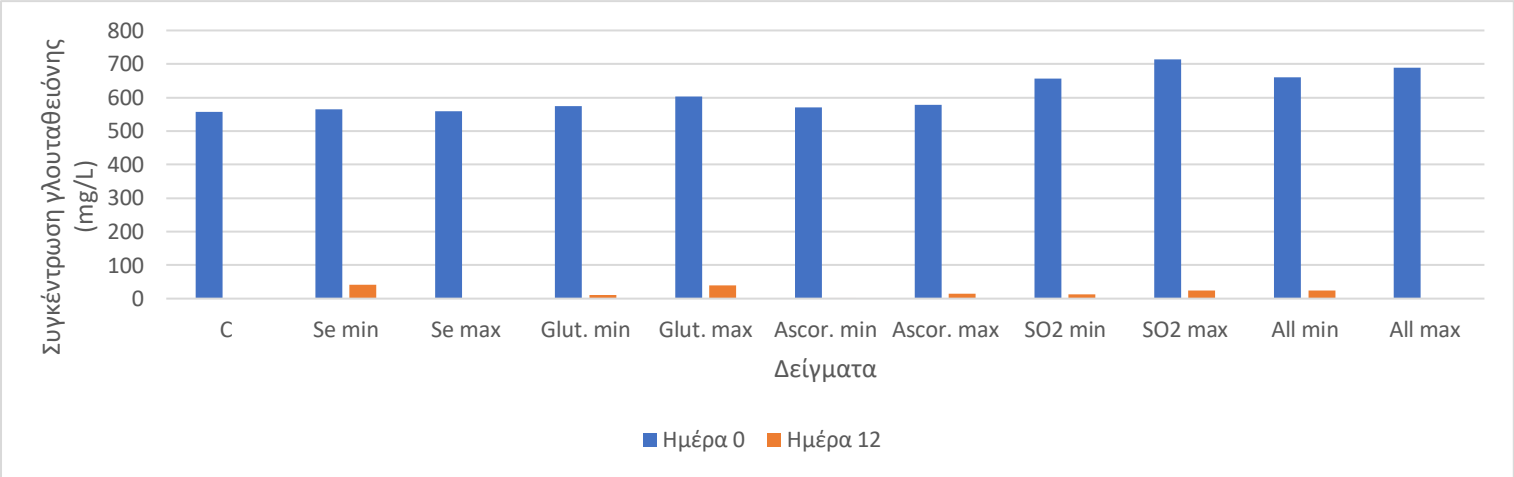
Διάγραμμα 38: Μεταβολή της συγκέντρωσης των ολικών ελεύθερων σουλφυδρυλομάδων των δειγμάτων από την ημέρα 0 και τη 12 για τη ποικιλία Μαλαγουζιά.

Πίνακας 22: Αποτελέσματα εκτίμησης ολικών ελεύθερων σουλφυδρυλομάδων στο πείραμα επιταχυνόμενης οξείδωσης της ποικιλίας Ρετσίνα. Όλες οι τιμές είναι εκφρασμένες σε mg GSH/L.
Τιμές με διαφορετικό εκθέτη εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 5% μετά από σύγκριση ανά στήλη.

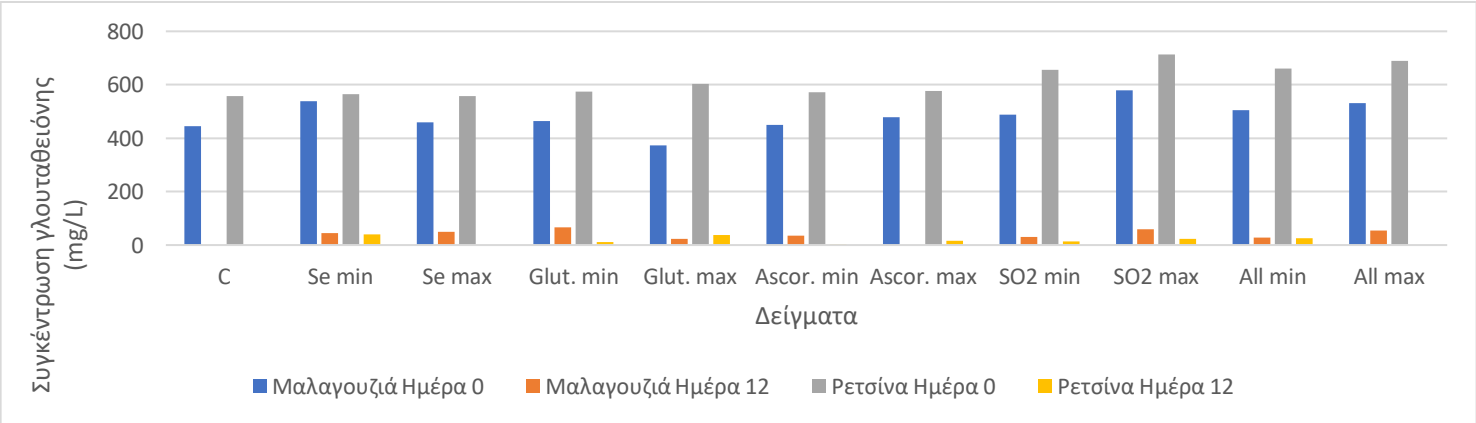
Ρετσίνα	**Ημέρα 0**	**Ημέρα 4**	**Ημέρα 8**	**Ημέρα 12**
Μάρτυρας (Control)	557,47^{ab} ±12,00	38,43^{a} ±2,62	8,46^{b} ±3,93	0,00 ^{ab}±0,00
Se min	564,02^{ab} ±3,62	94,35^{c} ±5,05	15,73^{bc} ±0,64	40,56^{f} ±3,18
Se max	558,57^{ab} ±7,91	93,57^{c} ±3,30	58,74^{e} ±2,42	0,00^{ab} ±0,00
Glut min	573,73^{ab} ±48,74	85,62^{c} ±3,58	30,73^{d} ±1,11	11,29^{bc} ±3,58
Glut max	602,53^{bc} ±8,02	95,59^{c} ±1,63	9,30^{b} ±1,87	38,57^{ef} ±5,13
Ascor min	571,38^{ab} ±22,13	47,25^{ab} ±1,43	18,37^{c} ±3,18	0,48^{ab} ±0,68
Ascor max	577,70^{bc} ±3,73	54,69^{b} ±0,83	31,35^{d} ±3,34	15,54^{cd} ±3,54
SO_2 min	656,15^{c} ±27,37	153,15^{d} ±5,09	0,00^{a} ±0,00	12,95^{bc} ±1,15
SO_2 max	713,48^{d} ±32,73	215,59^{e} ±8,14	31,46^{d} ±0,56	23,43^{de} ±4,37
All min	659,89^{c} ±0,87	47,08^{ab} ±0,48	8,43^{b} ±0,64	24,55^{de} ±9,14
All max	688,40^{d} ±1,71	59,75^{b} ±1,40	0,00^{a} ±0,00	0,00^{ab} ±0,00



Διάγραμμα 39: Μεταβολή της συγκέντρωσης των ολικών ελεύθερων σουλφυδρυλομάδων των δειγμάτων από την ημέρα 0 έως τη 12 για τη ποικιλία Ρετσίνα.



Διάγραμμα 40: Μεταβολή της συγκέντρωσης των ολικών ελεύθερων σουλφυδρυλομάδων των δειγμάτων από την ημέρα 0 και τη 12 για τη ποικιλία Ρετσίνα.



Διάγραμμα 41: Μεταβολή των συγκεντρώσεων των ολικών ελεύθερων σουλφυδρυλομάδων των δειγμάτων από την ημέρα 0 και τη 12 για τις ποικιλίες Μαλαγουζιά και Ρετσίνα.

Τα δείγματα της Μαλαγουζιάς την ημέρα 0 εμφάνισαν υψηλές συγκεντρώσεις ολικών ελεύθερων σουλφυδρυλομάδων, με το δείγμα Glut max να έχει τη μικρότερη συγκέντρωση και να διαφέρει στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5% όλα τα υπόλοιπα δείγματα (Πίνακας 21). Τη μεγαλύτερη τιμή την είχε το δείγμα SO_2 max, το οποίο διέφερε και αυτό στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5% από όλα τα υπόλοιπα, εκτός από το δείγμα Se min. Την 4^{η} ημέρα υπήρξε μια πτώση στις τιμές των συγκεντρώσεων, κάτι που ήταν αναμενόμενο και έρχεται σε συμφωνία με την μελέτη των Voltea et al. (2022) οι οποίοι εξέτασαν δείγματα Μαλαγουζιάς σε πείραμα επιταχυνόμενης οξείδωσης, με τα δείγματα Se min, SO_2 min και SO_2 max να έχουν τις υψηλότερες τιμές, ενώ το δείγμα Ascor max τη χαμηλότερη (Διάγραμμα 37). Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι τα δείγματα Asor max και All max διέφεραν με όλα τα υπόλοιπα δείγματα και όχι μεταξύ τους, σε επίπεδο σημαντικότητας 5%. Το ίδιο συνέβη μεταξύ των δειγμάτων C και Glut min, μεταξύ των Glut max και Ascor max και μεταξύ των Se min και Se max. Την ημέρα 8 συνεχίστηκε η πτωτική πορεία των τιμών των συγκεντρώσεων των ολικών ελευθέρων σουλφυδρυλομάδων (Διάγραμμα 37), με εξαίρεση το δείγμα Glut max του οποίου η τιμή παρέμεινε σταθερή. Μηδενικές τιμές εμφάνισαν τα δείγματα C, Ascor min και Ascor max τα οποία διέφεραν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5%. Τις υψηλότερες τιμές είχαν τα δείγματα Se min, Se max, Glut min, Glut max, SO_2 min και SO_2 max το κόμμα τα οποία δεν εμφάνισαν κάποια στατιστική σημαντική διαφορά (Πίνακας 21). Τέλος, την τελευταία μέρα του πειράματος τα δείγματα εμφάνισαν τις χαμηλότερες τιμές τους, με τα δείγματα C και Ascor max να διατηρούν τις μηδενικές συγκεντρώσεις τους. Τα δείγματα Glut min, SO2 max Και All max είχαν τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις και διέφεραν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5% από όλα τα υπόλοιπα δείγματα. Όσον αφορά την ποσοστιαία μεταβολή στη συγκέντρωση των ολικών ελεύθερων σουλφυδρυλομάδων, από την ημέρα 0 έως την ημέρα 12, που είχαν όλα τα δείγματα φαίνεται πως το δείγμα Glut min ήταν εκείνο με τη μικρότερη (Διάγραμμα 38).

Τα δείγματα της Ρετσίνας την ημέρα 0 εμφάνισαν υψηλότερες συγκεντρώσεις ολικών ελεύθερων σουλφυδρυλομάδων συγκριτικά με εκείνα της Μαλαγουζιάς, ενώ οι τιμές των δειγμάτων ήταν ανάλογες με της έρευνας των Kontogeorgos & Roussis (2014), οι οποίοι εξέτασαν δείγματα από Σαββατιανό, με στόχο τη μέτρηση των ολικών ελευθέρων σουλφυδρυλομάδων τους. Αναλυτικότερα, την υψηλότερη συγκέντρωση

την είχε το δείγμα SO_2 max, το οποίο διέφερε στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5% από όλα τα υπόλοιπα δείγματα, ενώ τη μικρότερη το δείγμα C, που δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντική διαφορά με τα δείγματα Se min, Se max, Glut min, Glut max Και Ascor min (Πίνακας 22). Την ημέρα 4 του πειράματος όλα τα δείγματα εμφάνισαν πτώση στις τιμές τους, με τα δείγματα που εμπεριείχαν τις μικρές και υψηλές συγκεντρώσεις θειώδους να έχουν τιμές πάνω από 100, και διέφεραν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5% μεταξύ τους αλλά και με όλα τα υπόλοιπα δείγματα (Διάγραμμα 39). Τη μικρότερη τιμή την είχε πάλι το δείγμα C, το οποίο διέφερε στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5% σχεδόν με όλα τα άλλα, με εξαίρεση τα δείγματα Ascor min και All min. Την ημέρα 8, συνεχίστηκε η μείωση της συγκέντρωσης των ολικών ελευθέρων σουλφυδρυλομάδων σε όλα τα δείγματα (Διάγραμμα 39), με τα δείγματα SO_2 min και All max να εμφανίζουν τις πρώτες μηδενικές τιμές αλλά και να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5% με τα υπόλοιπα (Πίνακας 22). Από την άλλη μεριά την υψηλότερη τιμή και στατιστική σημαντική διαφορά εμφάνισε το δείγμα Se max. Την $12^{η}$ ημέρα τα δείγματα C, Se max, Ascor min Και All max ήταν εκείνα που η συγκέντρωση των ολικών ελεύθερων σουλφυδρυλομάδων τους ήταν 0. Την υψηλότερη τιμή την είχε το δείγμα Se min, το οποίο διέφερε στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5% από όλα τα υπόλοιπα. Το δείγμα Se min της Ρετσίνας τι ήταν εκείνο που είχε τη μικρότερη ποσοστιαία μεταβολή καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος συγκριτικά με όλο το υπόλοιπα (Διάγραμμα 40).

Ανάμεσα στις δύο ποικιλίες, είναι εμφανές και από το Διάγραμμα 41, πως την ημέρα 0 τα δείγματα της Ρετσίνας είχαν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις ολικών ελεύθερών σουλφυδρυλομάδων συγκριτικά με εκείνα της Μαλαγουζιάς. Αντίθετα όμως, την ημέρα 12, τα δείγματα της Μαλαγουζιάς ήταν εκείνα που είχαν τις μικρότερες ποσοστιαίες μεταβολές από αυτά της Ρετσίνας. Τέλος, παρατηρήθηκε ότι το δείγμα Se min και από τις 2 ποικιλίες είχε τις μικρότερες ποσοστιαίες μεταβολές στις συγκεντρώσεις ολικών ελεύθερων σουλφυδρυλομάδων, από όλα τα υπόλοιπα.

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

Για τον υπολογισμό των επιπέδων των φαινολικών ενώσεων το δείγμα των και των δύο ποικιλιών στη διάρκεια του πειράματος της επιταχυνόμενης οξείδωσης χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση HPLC, και συγκεκριμένα η μέτρηση των Low Molecular Weight Phenol. Η μέτρηση έγινε 2 φορές σε κάθε ποικιλία, με την 1^{η} να γίνεται την ημέρα 0 και την 2^{η} την ημέρα 12. Επιπλέον, την ημέρα 0, 30ml από το δείγμα Μάρτυρας μεταφέρθηκαν σε vial, το οποίο έκλεισε αεροστεγώς, και παρέμεινε σε κατάψυξη μέχρι και την ημέρα 12 όπου μετρήθηκε μαζί με τα υπόλοιπα δείγματα. Τα δείγματα, σύμφωνα με την ανάλυση, εμπεριείχαν φλαβανοειδείς ενώσεις, όπως η κατεχίνη, η επικατεχίνη και ο γαλλικός εστέρας της επιγαλλοκατεχίνης, αλλά και μη φλαβανοειδείς, δηλαδή υδροξυκινναμωμικά οξέα, όπως το καφταρικό, το κουταρικό, το καφεϊκό και το φερταρικό. Το γαλλικό οξύ, που ανήκει στην κατηγορία των βενζοϊκών οξέων, ανιχνεύθηκε και στις δύο ποικιλίες, σε όλα τα δείγματα, αλλά σε πολύ μικρή συγκέντρωση. Στους Πίνακες 23 και 24 παρατίθονται οι τιμές των ποσοστιαίων διαφορών των συγκεντρώσεων των φαινολικών ενώσεων κάθε δείγματος, από την ημέρα 0 και 12 του πειράματος, και οι τιμές με διαφορετικό εκθέτη εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

Πίνακας 23: Αποτελέσματα εκτίμησης ποσοστιαίων διαφορών των φαινολικών ενώσεων με τη μέτρηση HPLC στο πείραμα επιταχυνόμενης οξείδωσης της ποικιλίας Μαλαγουζιά. Όλες οι τιμές είναι ποσοστιάιες διαφορές των συγκεντρώσεων ((Ημ.12-Ημ.0)/Ημ.0) εκφρασμένες σε mg/L.
Τιμές με διαφορετικό εκθέτη εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 5% μετά από σύγκριση ανά στήλη.

Μαλαγουζιά	epicatechin	caftaric	catechin	caffeic acid	coutaric	fertaric
Μάρτυρας (Control)	-100%^{b}	-33%^{d}	20%^{d}	-4%^{b}	-14%^{b}	-17%^{b}
Se min	-100%^{b}	-37%^{c}	16%^{d}	2%^{d}	-11%^{c}	3%^{e}
Se max	-100%^{b}	-33%^{d}	15%^{d}	4%^{d}	-6%^{d}	-4%^{d}
Glut min	N/D^{a}	-32%^{d}	14%^{d}	2%^{d}	-7%^{d}	-9%^{c}
Glut max	-100%^{b}	-30%^{d}	8%^{c}	4%^{d}	-8%^{d}	-3%^{d}
Ascor min	-100%^{b}	-32%^{d}	13%^{d}	3%^{d}	11%^{c}	10%^{f}
Ascor max	-5%^{c}	-53%^{b}	9%^{c}	-5%^{b}	0%^{e}	5%^{e}
SO_2 min	-100%^{b}	-21%^{e}	23%^{d}	4%^{d}	-16%^{b}	-4%^{d}
SO_2 max	-100%^{b}	-21%^{e}	63%^{e}	-2%^{b}	-25%^{a}	-21%^{a}
All min	-100%^{b}	-31%^{d}	4%^{b}	0%^{c}	2%^{e}	3%^{e}
All max	-100%^{b}	-56%^{a}	-8%^{a}	-9%^{a}	-8%^{d}	-7%^{c}
Μάρτυρας Fr	-100%^{b}	-31%^{d}	21%^{d}	-2%^{b}	-12%^{c}	-21%^{a}

Πίνακας 24: Αποτελέσματα εκτίμησης ποσοστιαίων διαφορών των φαινολικών ενώσεων με τη μέτρηση HPLC στο πείραμα επιταχυνόμενης οξείδωσης της ποικιλίας Ρετσίνα. Όλες οι τιμές είναι ποσοστιάιες διαφορές των συγκεντρώσεων ((Ημ.12-Ημ.0)/Ημ.0) εκφρασμένες σε mg/L.
Τιμές με διαφορετικό εκθέτη εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 5% μετά από σύγκριση ανά στήλη.

Ρετσίνα	caftaric	catechin	coutaric	fertaric	epigallocatechin gallate
Μάρτυρας (Control)	-100%^{a}	42%^{g}	N/D^{a}	-23%^{e}	21%^{c}
Se min	-100%^{a}	3%^{c}	N/D^{a}	-7%^{f}	-100%^{a}
Se max	-85%^{b}	26%^{f}	N/D^{a}	-8%^{f}	-100%^{a}
Glut min	-78%^{c}	22%^{e}	N/D^{a}	502%^{i}	-16%^{b}
Glut max	-100%^{a}	3%^{c}	N/D^{a}	39%^{g}	-100%^{a}
Ascor min	-100%^{a}	10%^{d}	N/D^{a}	112%^{h}	-100%^{a}
Ascor max	-100%^{a}	-37%^{b}	N/D^{a}	-28%^{d}	-100%^{a}
SO_2 min	-100%^{a}	-100%^{a}	N/D^{a}	-100%^{a}	-100%^{a}
SO_2 max	-100%^{a}	-100%^{a}	-100%^{b}	-56%^{b}	-100%^{a}
All min	-100%^{a}	-100%^{a}	-100%^{b}	-45%^{c}	-100%^{a}
All max	-100%^{a}	-100%^{a}	-100%^{b}	-100%^{a}	-100%^{a}
Μάρτυρας Fr	-100%^{a}	-100%^{a}	N/D^{a}	-100%^{a}	-100%^{a}

Αρχικά, όπως φαίνεται στον Πίνακα 23, όλα τα δείγματα της Μαλαγουζιάς εμπεριείχαν επικατεχίνη και κατεχίνη από την κατηγορία των φλαβονοειδών ενώσεων, και καφταρικό, καφεϊκό, κουταρικό και φερταρικό από την κατηγορία των υδροξυκινναμωμικών οξέων. Σχεδόν σε όλα τα δείγματα μηδενίστηκε η ποσότητα της επικατεχίνης, με το πέρας του πειράματος επιταχυνόμενης οξείδωσης, με εξαίρεση τα δείγματα Ascor max και Glut min, όπου το πρώτο υπέστη μια πολύ μικρή μείωση ενώ στο δεύτερο δεν έγινε ανίχνευση της ένωσης ούτε την ημέρα 0 ούτε την ημέρα 12. Από την άλλη μεριά η συγκέντρωση της κατεχίνης αυξήθηκε σε όλα τα δείγματα, εκτός από το δείγμα All max στο οποίο υπέστη μείωση. Τις μεγαλύτερες αυξήσεις τις είχαν τα δείγματα SO_2 max και SO_2 min, ενώ δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά, σε επίπεδο σημαντικότητας 5%, μεταξύ του δείγματος Μάρτυρας C και Μάρτυρας Fr. Η συγκέντρωση του καφταρικού οξέος παρουσίασε μείωση σε όλα τα δείγματα κατά τη διάρκεια του πειράματος με τη μεγαλύτερη να εμφανίζουν τα δείγματα All max και Ascor max. Οι συγκεντρώσεις του καφεϊκού οξέος ήταν εκείνες με τις μικρότερες μειώσεις και αυξήσεις σε όλα τα δείγματα συγκριτικά με τις υπόλοιπες φαινολικές ενώσεις που εκτιμήθηκαν Μείωση παρουσίασαν και οι συγκεντρώσεις του κουταρικού και φερταρικού οξέος, με τη μεγαλύτερη μείωση και στις δύο ενώσεις να έχει το δείγμα SO_2 max. Γενικότερα, η στατιστική ανάλυση των ποσοστιαίων διαφορών των συγκεντρώσεων έδειξε πως το δείγμα SO_2 max είχε σχεδόν σε όλες τις ενώσεις τις μικρότερες απώλειες, και τα δείγματα Se min, Se max και Glut min δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5%, κάτι που έρχεται σε συμφωνία και με τα αποτελέσματα τον υπολογισμό του δείκτη καστάνωσης των δειγμάτων και του συντελεστή k.

Στα δείγματα της Ρετσίνας ανιχνεύθηκαν η κατεχίνη και ο γαλλικός εστέρας της επιγαλλοκατεχίνης, από την κατηγορία των φλαβονοειδών ενώσεων, το καφταρικό, το κουταρικό και το φερταρικό οξύ από την κατηγορία των υδροξυκινναμωμικών οξέων. Η συγκέντρωση της κατεχίνης εμφάνισε διαφορετικές διακυμάνσεις στα δείγματα. Συγκεκριμένα (Πίνακας 24), στο Μάρτυρα, στα δείγματα με Se, με Glut και το Ascor min σημείωσαν αύξηση, με μεγαλύτερη του Μάρτυρα, ενώ δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδο σημαντικότητας 5% μεταξύ των δειγμάτων Se min και Glut max. Στο δείγμα Ascor max υπήρξε μείωση στη συγκέντρωση κατεχίνης ενώ σε όλα τα υπόλοιπα μηδένισε η ποσότητα τη $12^{η}$ ημέρα. Αντίστοιχα, η συγκέντρωση του εστέρα της επιγαλλοκατεχίνης υπέστη πλήρη μηδενισμό σε όλα τα δείγματα με

εξαίρεση το δείγμα Glut min που είχε μικρή μείωση μετά το πέρας του πειράματος, και το Μάρτυρα που είχε αύξηση. Το καφταρικό οξύ μειώθηκε σε μεγάλο βαθμό στα δείγματα Se max και Glut min, και σε όλα τα άλλα δεν ανιχνεύθηκε συγκέντρωση την ημέρα 12. Το κουταρικό οξύ βρέθηκε σε μετρήσιμη συγκέντρωση την ημέρα 0 μόνο στα δείγματα SO_2 max, All min και All max, αλλά δεν κατέστη δυνατό να μετρηθεί σε κανένα δείγμα την ημέρα 12. Τέλος, η συγκέντρωση φερταρικού οξέος την ημέρα 12 ήταν ίση με 0 στα δείγματα SO_2 min, All max και Μάρτυρας Fr. Αύξηση σημείωσαν τα δείγματα Glut min, Glut max και Ascor min, ενώ σε όλα τα υπόλοιπα υπήρξε μείωση της συγκέντρωσης. Το συγκεκριμένο υδροξυκινναμωμικό οξύ ήταν εκείνο με τις περισσότερες στατιστικά σημαντικές διαφορές, μεταξύ των δειγμάτων, σε επίπεδο σημαντικότητας 5%

Συμπερασματικά, και οι δύο ποικιλίες εμφάνισαν μείωση των συγκεντρώσεων των φλαβανολών τους και μη, κατά τη διάρκεια του πειράματος. Επίσης, σε καμία από τις δύο ποικιλίες δεν ανιχνεύτηκε μετρήσιμη ποσότητα του γαλλικού οξέος, ενώ τα δείγματα του Μάρτυρα που καταψύχθηκαν δεν εμφάνισαν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις συγκριτικά με όλα τα δείγματα που υπέστησαν επιταχυνόμενη οξείδωση. Δεν κατέστη δυνατό να γίνει η διαφοροποίηση με βάση την καλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα για κανένα από τα δείγματα σε καμία από τις δύο ποικιλίες, με εξαίρεση το δείγμα SO_2 max, από τη ποικιλία Μαλαγουζιά, το οποίο είχε τις μικρότερες μειώσεις στις περισσότερες φλαβανόλες και στα υδροξυκινναμωμικά οξέα που εντοπίστηκαν, συγκριτικά με όλα τα υπόλοιπα. Τέλος, παρατηρήθηκε ότι όλα τα δείγματα της Μαλαγουζιάς εμφάνισαν περισσότερες κατηγορίες φλαβανολών και υδροξυκινναμωμικών οξέων συγκριτικά με εκείνα της Ρετσίνας.

9. Συμπεράσματα

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των λευκών οίνων αλλά και των αντιοξειδωτικών που τους έχουν προστεθεί μειώνεται με την οξείδωση, που έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση οξειδωτικού καφετιάσματος. Στις δύο ποικιλίες που εξετάστηκαν στο συγκεκριμένο πείραμα, Μαλαγουζιά και Ρετσίνα, ανεξάρτητα με την προσθήκη αντιοξειδωτικού που τους έγινε, σελήνιο, γλουταθειόνη, ασκορβικό οξύ και θειώδης ανυδρίτης, δημιουργήθηκε οξειδωτικό καφέτιασμα έπειτα από την τοποθέτησή τους

για 12 ημέρες σε υδατόλουτρο, στους 55°C. Στην μέτρηση της απορρόφησης στα 420nm, στο συντελεστή k και στον υπολογισμό των %ΔA_{420nm} ,ήταν κοινό και στις δύο ποικιλίες πως τις υψηλότερες τιμές της είχαν το δείγματα που εμπεριείχαν ασκορβικό οξύ, είτε μόνο του είτε μαζί με τα υπόλοιπα αντιοξειδωτικά. Η ύπαρξη του ασκορβικού οξέος μεσα στον οίνο, εν τέλει δεν βοηθά στην αντιοξειδωτική προστασία του αλλά αντιθέτως την επιταχύνει. Από την άλλη μεριά, τα δείγματα τα οποία εμπεριείχαν θειώδη ανυδρίτη, ως μόνο αντιοξειδωτικό και στις δύο ποικιλίες, ήταν εκείνα που είχαν τις μικρότερες τιμές. Παρατηρήθηκε επίσης ότι τα δείγματα που εμπεριείχαν σελήνιο, μόνο, συμπεριφέρθηκαν με την ίδια τάση οξείδωσης όπως εκείνοι που περιείχαν μόνο γλουταθειόνη, παρόλο που το σελήνιο βρισκόταν σε πολύ μικρότερη συγκέντρωση. Επιπλέον, όλα τα δείγματα της Ρετσίνας εμφάνισαν μεγαλύτερο και πιο γρήγορα ο οξειδωτικό καφέτιασμα σε σύγκριση με εκείνα της Μαλαγουζιάς. Αν και ήταν αναμενόμενο τα δείγματα της Ρετσίνας, τα οποία προέρχονται από την ποικιλία Σαββατιανό η οποία έχει μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις άρα και μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα από τη Μαλαγουζιά, να έχουν χαμηλότερους συντελεστές καφετιάσματος, η παρουσία της ρητίνης και η θέρμανση της αντίστοιχα οδήγησαν στο συγκεκριμένο αποτέλεσμα.

Το πείραμα της επιταχυνόμενης οξείδωσης που εφαρμόστηκε και στις δύο ποικιλίες οδήγησε στην άμεση ανάγκη του θειώδη ανυδρίτη, ολικού και ελεύθερου, που υπήρχε στις ίδιες ποσότητες σε όλα τα δείγματα, να προστατέψει από την οξείδωση των συστατικών του οίνου και κατά συνέπεια να μειωθεί η συγκέντρωση του. Καμία από τις δύο ποικιλίες, ούτε κάποια προσθήκη από τα 4 αντιοξειδωτικά δεν κατάφεραν να ανακάμψουν τη συγκεκριμένη μείωση.

Η ολική ογκομετρούμενη οξύτητα παρέμεινε σταθερή και στις δύο ποικιλίες καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Επίσης, δεν μεταβλήθηκε έπειτα από την προσθήκη οποιουδήποτε αντιοξειδωτικού. Συνεπώς, η ολική ογκομετρούμενη οξύτητα δεν επηρεάζεται από την οξείδωση και την εμφάνιση οξειδωτικού καφετιάσματος σε έναν οίνο.

Οι φαινολικές ενώσεις και οι συγκεντρώσεις τους μειώθηκαν σημαντικά και στις δύο ποικιλίες. Η προσθήκη σεληνίου, και στις δύο συγκεντρώσεις, φαίνεται πως οδήγησε στη μικρότερη ποσοστιαία διαφορά έπειτα από την επιταχυνόμενη οξείδωση. Όπου είχε γίνει προσθήκη με θειώδη ανυδρίτη μόνο, κατάφερε να γίνει δυνατή η ανίχνευση

φλαβονοειδών και υδροξυκινναμωμικών οξέων μετά το πέρας του πειράματος. Επιπλέον παρατηρήθηκε, πως η ρητίνη εμπεριέχει ενώσεις με αντιοξειδωτική προστασία ενισχύοντας την προστασία από την οξείδωση του οίνου. Το ασκορβικό οξύ δρα συνεργατικά στην επιτάχυνση της οξείδωσης των φαινολικών ενώσεων των οίνων.

Η αντιοξειδωτική ικανότητα της Ρετσίνας είναι υψηλότερη από εκείνη της Μαλαγουζιάς. Η ύπαρξη ασκορβικού οξέος μέσα στον οίνο μπορεί να αυξάνει στην αρχή την αντιοξειδωτική του ικανότητα, αλλά με την θέρμανση του και κατά συνέπεια την οξείδωση του επιταχύνει τη μείωση της. Αντίθετα, το σελήνιο, η γλουταθειόνη και ο θειώδης ανυδρίτης επιβραδύνουν τις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις και διατηρούν στα ίδια επίπεδα την αντιοξειδωτική ικανότητα. Το σελήνιο και στις δύο ποικιλίες κατάφερε να διατηρήσει την αντιοξειδωτική τους ικανότητα στα ίδια επίπεδα με εκείνα που είχε ο θειώδης ανυδρίτης.

Ενώσεις που οι περιέχουν ελεύθερη η σουλφυδρυλομάδα ήταν εκείνες που οξειδώθηκαν πρώτες κατά την επιταχυνόμενη οξείδωση και σχεδόν εκμηδενίστηκαν ανεξάρτητα από την ποικιλία. Επομένως, οι συγκεκριμένες ενώσεις, παρόλο που παρέχουν αντιοξειδωτική προστασία σε έναν οίνο, είναι αρκετά ευοξείδωτες και η προστασία τους δεν μπορεί να ενισχυθεί από κανένα αντιοξειδωτικό.

Καταλήγοντας, η Ρετσίνα παρόλο που είχε μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα στην αρχή του πειράματος συγκριτικά με τη Μαλαγουζιά, εμφάνισε μεγαλύτερο και πιο γρήγορα οξειδωτικό καφέτιασμα και η οξειδωτική προστασία της μειώθηκε σε παρόμοιες τιμές με εκείνες της Μαλαγουζιάς. Κατά συνέπεια η ρητίνη, παρόλο που θεωρείται αντιοξειδωτικό, κατά τη θέρμανση της επιταχύνει την οξείδωση του οίνου. Επιπροσθέτως, το ασκορβικό οξύ έχει τη μικρότερη αντιοξειδωτική προστασία από όλα τα υπόλοιπα αντιοξειδωτικά, επιταχύνει την οξείδωση και δεν επηρεάζεται από την προσθήκη άλλων αντιοξειδωτικών. Ο θειώδης ανυδρίτης αποδείχθηκε από το πείραμα πως έχει την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα ανεξαρτήτου ποικιλίας. Η γλουταθειόνη και το σελήνιο θα μπορέσουν να αποτελέσουν υποκατάστατα του θειώδους ανυδρίτη ώστε να μειωθεί η προσθήκη του κατά την οινοποίηση, με κυριότερο το σελήνιο το οποίο κατάφερε να διατηρήσει την αντιοξειδωτική ικανότητα σχεδόν σταθερή και ήταν το μοναδικό αντιοξειδωτικό σε τόσο μικρή συγκέντρωση.

10. Βιβλιογραφικές αναφορές

Ξένη βιβλιογραφία

- Amerine, M.A. & Singleton, V.L. (1968). Wine: An introduction for Americans, Ed. 4th, California: University of California Press.

- Antoce O.A., (2007). Oenology: Chemistry and sensory analysis. Universitaria Publishing House, Craiova.

- Arnous, A., Makris, S.P. & Kefalas, P. (2001). Effect of principal polyphenolic components on relation to antioxidant characteristics of aged red wines. Journal of Agriculture and Food Chemistry 49 (12): 5736-5742.

- Badea, G.A. & Antoce, A.O. (2015). Glutathione as a possible replacement of sulfur dioxide in winemaking technologies. Scientific Papers. Series B, Horticulture. Vol. LIX.

- Baluasundram, N., Sundram, K. & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products. Antioxidant activity, occurrence and potential uses. J. Agric. Food Chem.,99,191-203.

- Barbulescu, I., Feredes, M., Carmen, B., Rodica, A. & Teodoerscu, R. (2012). Improving wine-making products with selenium and total polyphenols. Romanian Biotechnological Letters, 17, 7646-7655.

- 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.

- Barril, C., Rutledge, D.N., Scollary, G.R. & Clark, A.C. (2016). Ascorbic acid and white wine production: a review of beneficialversus detrimental impacts. Australian Journal of Grape and Wine Research, 22, 169–181.

- Battin, E.E. & Brumaghim, J.L. (2009). Antioxidant Activity of Sulfur and Selenium: A Review of Reactive Oxygen Species Scavenging, Glutathione Peroxidase and Metal-Binding Antioxidant Mechanisms. Cell Biochem Biophys., 55,1-23.

- Bendouguerra, N., Hornedo-Ortega, R., Garcia, F., El Khawand, T., Saucier, C. & Richard, T. (2021). Stilbenes in grape berries and wine and their potential role as anti-obesity agents: A review. J. Agric. Food Sci. & Tech., 112,362-381.

- Blois, M.S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature 181:1199–1200.

- Boulton, R. B., Singleton, V. L., Bisson, L. F., & Kunkee, R. E. (2001). Principles and practices of winemaking (Chinese trans.). Beijing: China Light Industry Press.

- Bradshaw, M.P., Prenzler, P.D. & Scollary, G.R. (2001). Ascorbic acid-induced browning of (+)-catechin in a model wine system. J. Agric. Food Chem., 49,934-939.

- Bradshaw, M.P., Cheynier, V., Scollary, G.R. & Prenzler, P.D. (2003). Defining the ascorbic acid crossover from anti-oxidant to pro-oxidant in a model wine matrix containing (+)-catechin. J. Agric. Food Chem., 51,4126-4132.

• Brand-Willams, W., Cuvelier, M. E. & Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. J. Food Sci. &Tech., 28, 25-30.

• Camara, J.S., Alves, M.A. & Marques, J.C. (2006). Changes in volatile composition of Madeira wines during their oxidative ageing. Analytica Chimica Acta, 563, 188-197.

• Cheynier, V. F., Trousdale, E. K., Singleton, V. L., Salgues, M. J., & Wylde, R. (1986). Characterization of 2-S-glutathioylcaftaric acid and its hydrolysis in relation to grape wines. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 34, 217–221.

• Cheynier, V., Souquet, J.M. & Moutounet, M. (1989). Glutathione content and glutathione to hydroxycinnamic acid ratio in Vitis vinifera grapes and musts. Am. J. Enol. Vitic., 40:320–324.

• Chidi, B.S., Bauer, F.F. & Rossouw, D. (2018). Organic Acid Metabolism and the Impact of Fermentation Practices on Wine Acidity: A Review. S. Afr. J. Enol. Vitic., Vol. 39, No. 2.

• Cooke, D., Steward, W.P., Gescher, A.J. & Marczylo, T. (2005). Anthocyans from fruits and vegetables – Does bright colour signal cancer chemopreventive activity? European Journal of Cancer, 41, 1931-1940.

• Danilewicz, J. C. (2003). Review of reaction mechanisms of oxygen and proposed intermediate reduction products in wine: Central role of iron and copper. American Journal of Enology and Viticulture, 54, 73–85.

• Danilewicz, J. C. (2007). Interaction of sulfur dioxide, polyphenols, and oxygen in a wine-model system: Central role of iron and copper. American Journal of Enology and Viticulture, 58, 53–60.

• Danilewicz, J. C., Seccombe, J. T., & Whelan, J. (2008). Mechanism of interaction of polyphenols, oxygen, and sulfur dioxide in model wine and wine. American Journal of Enology and Viticulture, 59, 128–136.

• Darias-Martín, J.J., Rodríguez, O., Díaz, E. & Lamuela-Raventós, R.M. (2000). Effect of skin contact on the antioxidant phenolics in white wine. J. Food Chem., 71, 483-487.

• De Beer, D., Joubert, E., Gelderblom, W.C.A., & Manley, M. (2005). Changes in the Phenolic Composition and Antioxidant Activity of Pinotage, Cabernet Sauvignon, Chardonnay and Chenin blanc Wines During Bottle Ageing. J.Enol.Vitic., 26, 1.

• Deshaies, S., Cazals, G., Enjalbal, C., Thibaut, C., Garcia, F., Mouls, L. & Saucier, C. (2020). Red Wine Oxidation: Accelerated Ageing Tests, Possible Reaction Mechanisms and Application to Syrah Red Wines. Antioxidants, 9, 663.

• Di Lecce, G., Boselli, E., D'Ignazi, G. & Frega, N.G. (2013). Evolution of phenolics and glutathione in Verdicchio wine obtained with maceration under reductive conditions. J. Agric. Food Sci. and Tech. 53, 54-60.

• Du Toit, W. J., Lisjak, K., Stander, M., & Prevoo, D. (2007). Using L-MSMS to assess glutathione levels in South African white grape juices and wines made with different levels of oxygen. J. Agri, Food Chem., 55, 2765–2769.

• Duthie, G. G., Duthie, S. J., & Kyle, J. A. M. (2000). Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. Nutrition Research Reviews, 13, 79–106.

• El-Horsy, L., Auezova, L., Sakr, A. & Hajj-Moussa, E. (2009). Browning susceptibility of white wine and antioxidant effect of glutathione. Int. J. Food Sci. & Tech., 44,2459-2463.

• Es-Safi, N. E., Cheynier, V., & Moutounet, M. (2002). Role of aldehydic derivatives in the condensation of phenolic compounds with emphasis on the sensorial properties of fruit-derived foods. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 5571–5585.

• Escudero, A., Hernandez-Orte, P., Cacho, J. E. & Ferreira, V. (2000). Clues about the role of 3-(methylthio)propionaldehyde as a character impact odorant of some oxidized wines. J. Agric. Food Chem. 48, 4268-4272.

• Fernandez, A.P., Lundgren, M.W., Gandin, V., Misra, S., Tisato, F., Marzano, C., Pia Rigobello, M., Kumar, S. & Bjornstedt, M. (2012). Methylselenol Formed by Spontaneous Methylation of Selenide Is a Superior Selenium Substrate to the Thioredoxin and Glutaredoxin Systems. Plos One, 7, 11.

• Fernandez-Pachon, M.S., Villano, D., Garcia-Parrilla, M.C. & Troncoso, A.M. (2004). Antioxidant activity of wines and relation with their polyphenolic composition. Analytica Chimica Acta, 513, 113–118.

• Ferreira-Lima, N.E., Burin, V.M., Caliari, V. & Bordignon-Luiz, M.T. (2016). Impact of Pressing Conditions on the Phenolic Composition, Radical Scavenging Activity and Glutathione Content of Brazilian Vitis vinifera White Wines and Evolution During Bottle Ageing. Springer, Food Biop. Tech., DOI 10.1007/s11947-016-1680-7.

• Frias, S., Diaz, C., Conde, J.E. & Perez-Trujillo, J.P. (2003). Selenium and mercury concentrations in sweet and dry bottled wines from the Canary Islands, Spain. Food Addit. Conta., 20(3),237.

• Fujimaki, T., Mori, S., Horikawa, M. & Fukui, Y. (2018). Isolation of proanthocyanidins from red wine, and their inhibitory effects on melanin synthesis in vitro. J. Agric. Food Chem. 248, 61-69.

• Godden, P.W., Francis, I.L., Field, J.B.F., Gishen, M., Coulter, A.D., Valente, P.J., Hoj, P.B. & Robinson, E.M.C. (2002). An evaluation of the technical performance of wine bottle closures. Proceedings of the 11th Wine Industry Technical Conference. Eds. R. Blair, P. Williams and P. Hoj (AWITC: Glen Osmond, South Australia) pp. 44-52.

• Gonzales Cartagena, L., Perez- Zuñiga, F.J. & Abad, F.B. (1994). Interactions of some environmental and chemical parameters affecting the colour attributes of wine. Am. J. En. & Viti., 45,43-48.

• Grant-Preece, P., Barril, C., Schmidtke, L.M. & Clark, A.C. (2017). Impact of Fluorescent Lighting on Oxidation of Model Wine Solutions Containing Organic Acids and Iron. J. Agr. Food Chem., DOI: 10.1021/acs.jafc.6b04669.

• Ibern-Gomez, M., Andres-Lacueva, C., Lamuela-Raventos, R.M., Buxaderas, S., Singleton, V.L. & De La Torre-Boronat, M.C. (2000). Browning of cava (sparkling wine) during aging in contact with lees due to the phenolic composition. Am. J. Enol. Viticult., 5, 29–36.

• Jakabová, S., Fikselová, M., Mendelová, A., Ševˇcík, M., Jakab, I., Aláˇcová, Z., Kolaˇckovská, J. & Ivanova-Petropulos, V. (2021). Chemical Composition of White Wines Produced from Different Grape Varieties and Wine Regions in Slovakia. J. Agric. Applied Science, 11,11059.

• Jones, P.R., Gawel, R., Francis, I.L., & Waters, E.J. (2008). The influence of interactions between major white wine components on the aroma, flavour and texture of model white wine. Food Qual. Prefer, 19, 596–607.

• Kallithraka, S., Arvanitoyannis, I., Kefalas, P., El-Zajouli, A., Soufleros, E., & Psarra, E. (2001). Instrumental and sensory analysis of Greek wines: implementation of principal component analysis (PCA) for classification according to geographical origin. J. Food Chem. 73,501-514.

• Kallithraka, S., Tsoutsouras, E., Tzourou, E. & Lanaridis, P. (2006). Principal phenolic compounds in Greek red wines. J. Agric. Food Chem. 99, 784-793.

• Kallithraka, S., Salacha, M.I. & Tzourou, I. (2009). Changes in phenolic composition and antioxidant activity of white wine during bottle storage: Accelerated browning tests versus bottle storage. J. Food Chem., 113,500-505.

• Kanavouras, A., Coutelieris, F., Karanika, E., Kotseridis, Y. & Kallithraka, S. (2020). Colour change of bottled white wines as a quality indicator. OENO One 2020, 2, 189-197.

• Kedare, S.B. & Singh, R.P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. J. Food Sci. & Tech. 48(4):412-422.

• Kilmartin, P.A. (2010). Understanding and controlling non enzymatic wine oxidation. Andrew G. Reynold, In Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Managing Wine Quality, Woodhead Publishing, 432-458.

• Kontogeorgos, N. & Roussis, I.G. (2014). Research Note: Total Free Sulphydryls of Several White and Red. J. Enol. Vitic. 35, 1.

Wines

• Kritzinger, E.C., Bauer, F.F. & du Toit W.J. (2013). Influence of yeast strain, extended lees contact and nitrogen supplementation on glutathione concentration in wine. Australian Journal of Grape and Wine Research, 19:161–170.

• Kutz, M. (2012). Handbook of Environmental Degradation of Materials. Ed. 2nd, Oxford, William Andrew-Elsevier.

• Kyraleou, M., Boviatsi, E., Proxenia, N., Kotseridis, Y. & Kallithraka, S. (2013). Addition of carbon dioxide and ascorbic acid in white wines: Effects on browning development and antioxidant activity. Lucrări Ştiinţifice – vol. 56/2013, seria Agronomie.

• Kyraleou, M., Kallithraka, S., Theodorou, N., Teissedre, P.L., Kotseridis, Y. & Koundouras, S. (2017). Changes in Tannin Composition of Syrah Grape Skins and

Seeds during Fruit Ripening under Contrasting Water Conditions. J. Molecules,22,1453.

- Lacey, M.J., Allen, M.S., Harris, R.L.N. & Brown, W.V. (1991). Methoxypyrazines in Sauvignon blanc Grapes and Wines. American Journal of Enology and Viticulture, 42(2):103-108.

- Li, H., Guo, A., & Wang, H. (2008). Mechanisms of oxidative browning of wine. J. Food Chemistry, 108, 1–13.

- Liger-Belair, G. (2005). The physics and chemistry behind the bubbling properties of Champagne and sparkling wines: A state-of-the-art review. J. Agric. Food Chem., 53, 2788–2802.

- Meyer, A. S., Donovan, J. L., Pearson, D. A., Waterhouse, A. L., & Frankel, E. N. (1998). Fruit hydroxycinnamic acids inhibit lowdensity lipoprotein oxidation in vitro. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46, 1783–1787.

- Milat, A.M., Boban, M., Teissedre, P.L., Seselja-Perisin, A., Juric, D., Skroza, D., Generalic-Mekinic, I., Ljubenkov, I., Volarevic, J., Rasines-Perea, Z., Jourdes, M., & Mundic, I. (2019). Effects of oxidation and browning of macerated white wine on its antioxidant and direct vasodilatory. J. Functional Foods, 59, 138-147.

- Moreno-Arribas, M.V., & Polo, M.C. (2009). Wine Chemistry and Biochemistry, 378, Ed. 1st, New York: Springer.

- Nioi, C., Lisanti, M.T., Meunier, F., Redon, P., Massot, A. & Moine, V. (2022). Antioxidant activity of yeast derivatives: Evaluation of their application to enhance the oxidative stability of white wine. J. Food Sci. Tech., 171, 114116.

- Oszmianski, J., Cheynier, V. & Moutounet, M. (1996). Iron-Catalyzed Oxidation of (+)-Catechin in Model Systems. J. Agric. Food Chem., 44(7): 1712-1715.

- Oliveira, C.M., Ferreira, A.C.S., De Freitas, V. & Silva, A.M.S. (2011). Oxidation mechanisms occurring in wines. J. Food Research International, 44,1115-1126.

- Paixao, N., Perestrelo, R., Marques, J.C. & Camara, J.S. (2007). Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rose and white wines. J. Food Chem., 105, 204-214.

- Peinado, J., Lopez de Lerma, N. & Peinado, R.A. (2010). Synergistic antioxidant interaction between sugars and phenolics from a sweet wine. Eur. Food Res. Technol., 231, 363–370.

- Pati, S., Crupi, P., Savastano, M.L., Benucci, I., & Esti, M. (2019). Evolution of phenolic and volatile compounds during bottle storage of a white wine without added sulfite. J. Sci. Food Agric., 100, 775-784.

- Pavon, C., Aldas, M., Lopez-Martinez, J., Hernandez-Fernandez, J., Arrieta, M.P., (2021). Films Based on Thermoplastic Starch Blended with Pine Resin Derivatives for Food Packaging. J.Foods, 10,1171.

- Pereira, G. E., Gaudillere, J.-P., Pieri, P., Hilbert, G., Maucourt, M., Deborde, C., Moing, A., & Rolin, D. (2006). Microclimate Influence on Mineral and Metabolic Profiles of Grape Berries. J. Agric. Food Chem., 54, 6765–6775.

• Proestos, C., Bakogiannis, A., Psarianos, C., Koutinas, A.A., Kanellaki, M., & Komaitis, M. (2005). High performance liquid chromatography analysis of phenolic substances in Greek wines. Food Control, 16, 319-323.

• Pyrzynska, K. & Pekal, A. (2013). Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples. J. Analytical Methods, 5, 4288.

• Rapp, A., & Versini, G. (1991). Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds of wines. In: Proceeding of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine. The American Society of Enology and Viticulture (pp. 156-164). Seattle, Washington, USA.

• Reinisalo, M., Kårlund, A., Koskela, A., Kaarniranta, K. & Karjalainen, R.O. (2015). Polyphenol Stilbenes: Molecular Mechanisms of Defence against Oxidative Stress and Aging-Related Diseases. Published online at National library of medicine, 09/06/2015. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4477219/#.

• Ribereau – Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2006). The chemistry of wine stabilization and treatments. Handbook of Enology, 2, 141-204, 2nd ed., West Sussex-UK: John Wiley and Sons Ltd.

• Rodriguez-Nogales, J.M., Fernandez-Fernandez, E., Gomez, M. & Vila-Crespo, J. (2012). Antioxidant Properties of Sparkling Wines Produced with β-Glucanases and Commercial Yeast Preparations. J. Food Sci., doi: 10.1111/j.1750-3841.2012.02857.x.

• Roussis, I.G., Papadopoulou, D. & Daitsiotis M.S. (2009). Protective Effect of Thiols on Wine Aroma Volatiles. The Open Food Science Journal., 3, 98-102.

• Salacha, M.I., Kallithraka, S. & Tzourou, I. (2008). Browning of white wines: correlation with antioxidant characteristics, total polyphenolic composition and flavanol content. Int. J. Food Sci. & Tech., 43,1073-1077.

• Sánchez-Ferrer, A., Rodríguez-López, J. N., García-Cánovas, F., & García-Carmona, F. (1995). Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. Biochimica et Biophysica Acta, 1247, 1–11.

• Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J.A. & Saura-Calixto, F. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. J. Sci. Food Agri. 79:270–276.

• Simpson, R. F. (1982). Factors affecting oxidative browning of white wine. Vitis, 21, 233–239.

• Singleton, V. L., & Kramling, T. E. (1976). Browning of white wines and accelerated test for browning capacity. American Journal of Enology and Viticulture, 27, 157–160

• Singleton, V. L., Trousdale, E., & Zaya, J. (1979). Oxidation of wines I. Young white wines periodically exposed to air. American Journal of Enology and Viticulture, 30, 49–54.

• Singleton, V.L. (1987). Oxygen with Phenols and Related Reactions in Must, Wines and Model Systems: Observations and Practical Implications. Am. J. Enol. Vitic., 38, 69-77.

• Singleton, V. L., & Trousdale, E. K. (1992). Anthocyanin-Tannin Interactions Explaining Differences in Polymeric Phenols between White and Red Wines. American Journal of Enology and Viticulture, 43, 63–70.

• Singleton, V. L., & Cilliers, J. J. L. (1995). Phenolic browning: a perspective from grape and wine. Research Enzymatic Browning and Its Prevention ACS Symposium Series, 600(Chapter 3), 23–48.

• Singleton, V. L., Orthofer, R. & Lamuela-Raventos, R.M. (1999). Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. Methods in Enzymology, Vol. 299, Academic Press.

• Sioumis, N., Kallithraka, S., Tsoutsouras, E., Makris, D.P. & Kefalas, P. (2005). Browning development in white wines: dependence on compositional parameters and impact on antioxidant characteristics. Eur. Food Res. Technol., 220, 326-330.

• Sioumis, N., Kallithraka, S., Makris, D. & Kefalas, P. (2006). Kinetics of browning onset in white wines: Influence of principal redox-active polyphenols and impact on the reducing capacity. J. Food Chem., 94,98-104.

• Sneyd, T.N., Leske, P.J. & Dunsford, P.A. (1993). How much Sulfur? Proceedings of the 8th Wine Industry Technical Conference. Eds. C. Stockley, R. Johnstone, P. Leske and T. Lee (Winetitles: Adelaide, South Australia) pp. 161-166.

• Sonni F., Clark A.C., Prenzler P.D., Riponi C. & Scollary G.R. (2011). Antioxidant action of glutathione and the ascorbic acid/glutathione pair in a model white wine. J. Agric. Food Chem., 59:3940–3949.

• Tarko, T., Duda-Chodak, A., Sroka, P. & Siuta, M. (2020). The Impact of Oxygen at Various Stages of Vinification on the Chemical Composition and the Antioxidant and Sensory Properties of White and Red Wines. International Journal of Food Science, Volume 2020, Article ID 7902974.

• Thiry, C., Ruttens, A., Temmerman, L.D., Schneider, Y. & Pussemier, L. (2012). Current knowledge in species-related bioavailability of selenium in food. J. Food Chem., 130,767–784.

• Tinggi, U. (2003). Essentiality and toxicity of selenium and its status in Australia: a review. Toxicol Lett., 137,103–110.

• USDA. (2004). National Nutdent Database for Standard Reference, Release 17. U.S. Department of Agdculture, Agdcultural Research Service.

• Vaimakis, V. & Roussis, I.G. (1996). Must oxygenation together with glutathione addition in the oxidation of white wine. J. Food Chem., 57(3), 419-422.

• Vassilopoulou, E., Zuidmeer, L., Akkerdaas, J., Tassios, I., Rigby, N.R., Mills, E.N.C., van Ree, R., Saxoni-Papageorgiou, P., & Papadopoulos, N.G. (2007). Severe immediate allergic reactions to grapes: Part of a lipid transfer protein-associated clinical syndrome. International Archives of Allergy and Immunology, 143, 92–102.

• Vlahou, E., Christofi. S., Roussis, I.G., & Kallithraka, S. (2022). Browning Development and Antioxidant Compounds in White Wines after Selenium, Iron, and Peroxide Addition. Appl. Sci., 12(8), 3834.

• Voltea, S., Karabagias, K.I. & Roussis, I.G. (2022). Use of Fe (II) and H2O2 along with Heating for the Estimation of the Browning Susceptibility of White Wine. J. Appl. Scie., 12,4422.

• Waterhouse, A.L. & Laurie, V.F. (2006). Oxidation of Wine Phenolics: A Critical Evaluation and Hypotheses. Am. J. Enol. Vitic., 57(3):306-313.

• Webber, V., Dutra, S.V., Spinelli, F.R., Carnieli, G.J., Cardozo, A. & Vanderlinde, R. (2017). Effect of glutathione during bottle storage of sparkling wine. J. Food Chem., 216,254-259.

• Wilkes, E. (2018) Practical measurements of total SO2 in wine. Wine & Viticulture Journal. South Australia.

• Witkowska, A., Zujko, M., Borawska, M. & Socha, K. (2006). Antioxidant properties and selenium content of wines. Polish J. Envi. Studies, 15(2a), 208-211

Ελληνική βιβλιογραφία

• Καλλίθρακα, Σ. (2021). Διαφάνειες Παραδόσεων Χημεία Γλεύκους και Οίνου – Μέθοδοι Ανάλυσης 2021-2022.

• Καλλίθρακα, Σ. (2022). Διαφάνειες Παραδόσεων Γευσιγνωσία οίνων 2021-2022.

• Κοτσερίδης, Γ. (2022). Διαφάνειες Παραδόσεων Τεχνολογίας Οίνου ΙΙ 2021-2022.

• Κοτσερίδης, Γ. & Προξενιά, Ν. (2020) Εργαστηριακές Ασκήσεις: Οινολογία Ι, Πανεπιστημιακές Σημειώσεις Εργαστηρίου Οινολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.

• Κοτσερίδης, Γ., Καλλίθρακα, Σ. & Προξενιά, Ν. (2017) Εργαστηριακές Ασκήσεις: Οινολογία ΙΙ, Πανεπιστημιακές Σημειώσεις Εργαστηρίου Οινολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.

• Κουτσούρης, Α.Ν. (2018). Μεταπτυχιακή διατριβή: Βελτίωση ποιότητας ρητινίτη οίνου από ποικιλία Σαββατιανό με χρήση διαφορετικών ζυμομυκήτων και προσθήκη chips δρυός. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

• Νέτσικα, Μ. (2019). Τα κρασιά της Ελλάδας. 2η έκδοση, IANOS Εκδόσεις, Θεσσαλονίκη.

• Παληογιάννη, Α.Π. (2007). Διδακτορική διατριβή: Μελέτη Πτητικών Συστατικών Ελληνικών Οίνων & Αποσταγμάτων – Παραγωγή Βιολειτουργικών Οίνων με Βάση Φυτά του Γένους Sideritis. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

• Σουφλέρος, Ε. (1997). Οινολογία: Επιστήμη και Τεχνογνωσία, Τόμος Ι, Τυπογραφία Παπαγεωργίου, Θεσσαλονίκη.

• Σουφλέρος, Ε. (2015). Οινολογία: Επιστήμη και Τεχνογνωσία, 3η Έκδοση, Σουφλερός, Ε. Η., Θεσσαλονίκη.

• Ταραντίλης Π. (2021). Διαφάνειες Παραδόσεων Χημεία και Ανάλυση Γλεύκους και Οίνου 2021-2022.

Ιστοσελίδες

- Καν. (ΕΕ) 1308/2013 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και Συμβουλίου της 17ης Δεκεμβρίου 2013 για την θέσπιση κοινής οργάνωσης των αγορών γεωργικών προϊόντων και την κατάργηση των κανονισμών (ΕΟΚ) αριθμ. 922/72, (ΕΟΚ) αριθμ. 234/79, (ΕΚ) αριθμ. 1037/2001 και 1234/2007 του Συμβουλίου. Access: http://www.minagric.gr/index.php/el/for-farmer-2/crop-production/ampeli/oin/353-oinos

- Κλαδικός Εθνικός Αγροτικός Συνεταιρισμός Αμπελοοινικών Προϊόντων – Κ.Ε.Ο.Σ.Ο.Ε., Access: https://www.keosoe.gr/

- Wine of Greece, Access: https://winesofgreece.org/el/

- OIV, 2021: SO2 AND WINE. Access: https://www.oiv.int/public/medias/7840/oiv-collective-expertise-document-so2-and-wine-a-review.pdf