



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
UNIVERSITY OF WEST ATTICA

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΟΙΝΟΥ ΑΜΠΕΛΟΥ ΚΑΙ ΠΟΤΩΝ

Τίτλος διπλωματικής εργασίας «Επίδραση του θειώδους στους μικροοργανισμούς του γλεύκους και οργανικοί-βιολογικοί οίνοι.»

Ον/μα φοιτητριών :
Κανελλοπούλου Γεωργία Νικολέτα
Κάτση Δήμητρα

Επιβλέπουσα καθηγήτρια : Χατζηλαζάρου Αρχοντούλα

2022



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ**
UNIVERSITY OF WEST ATTICA

UNIVERSITY OF WEST ATTICA

FOOD SCIENCE FACULTY

DEPARTMENT OF WINE, VINE AND BEVERAGES SCIENCES

Title of diploma thesis «The effect of sulphite on must microorganisms and organic-biological wines.»

**Students:
Kanellopoulou Georgia Nikoleta
Katsi Dimitra**

Supervisor: Chatzilazarou Archontoula

2022

Διασαφήσεις εξεταστικής επιτροπής

Οι υπογράφωντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη διπλωματική εργασία με τίτλο «Επίδραση του θειώδους στους μικροοργανισμούς του γλεύκους και οργανικοί-βιολογικοί οίνοι.» και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

Ψηφιακή Υπογραφή Χατζηλαζάρου Αρχοντούλα	
Ψηφιακή Υπογραφή Σεχάντε Αντνάν	
Ψηφιακή Υπογραφή Νικολού Βασίλειος	

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ/ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι κάτωθι υπογεγραμμένες Κάτση Δήμητρα του Αντρέα, με αριθμό μητρώου 161045 και Κανελλοπούλου Γεωργία Νικολέτα του Δημητρίου με αριθμό μητρώου 161039, φοιτήτριες του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών τροφίμων του Τμήματος Επιστημών Οίνου, Αμπέλου και ποτών, δηλώνουμε υπεύθυνα ότι:

«Είμαστε συγγραφείς αυτής της πτυχιακής/διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχαμε για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες κάναμε χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνουμε ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από εμάς τις ίδιες αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δική μας, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μας ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μας».

Η Δηλούσα: Κάτση Δήμητρα



Η Δηλούσα: Κανελλοπούλου Γεωργία Νικολέτα



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα πτυχιακή έχει σκοπό να διευκρινίσει και να επισημάνει την σημασία του θειώδους στους οίνους και να παρουσιάσει εναλλακτικές λύσεις, στην απαραίτητη χρήση του. Αφορμή για αυτή την πτυχιακή αποτέλεσε η όλο και αυξανόμενη προσπάθεια των τελευταίων χρόνων να βρεθούν υποκατάστατα για τη χρήση του θειώδους.

Θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε την κυρία Χατζηλαζάρου που μας εμπιστεύτηκε και μας έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθούμε με αυτή την εργασία και ήταν πάντα πρόθυμη να μας βοηθήσει σε ό,τι χρειαζόμασταν. Επίσης θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε πάρα πολύ τον κύριο Νικολού, ο οποίος αν και δεν ήταν ο επιβλέπων καθηγητής μας, αφιέρωσε χρόνο για να μας βοηθήσει κάθε στιγμή που αντιμετωπίζαμε προβλήματα με την εργασία. Τέλος, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε τις οικογένειες μας και τους φίλους μας και φυσικά η μία την άλλη για την στήριξη, στην διάρκεια αυτής της εργασίας και γενικότερα των σπουδών μας.

Κάτση Δήμητρα

Κανελλοπούλου Γεωργία Νικολέτα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι προσπάθειες κατάρριψης του μύθου, ότι το διοξείδιο του θείου είναι η μοναδική λύση στην οινοποίηση, έχουν εντατικοποιηθεί. Μάλιστα, δεκαετίες τώρα, τόσο χημικοί όσο και οινολόγοι έχουν μελετήσει με διάφορες εφαρμογές τη μείωση του θειώδους στον οίνο, με σκοπό την ελαχιστοποίηση του στο τελικό προϊόν, ώστε αυτό να θεωρείται απολύτως φυσικό. Βάσει των μελετών που έχουν προηγηθεί, η μείωση επιτυγχάνεται από τον περιορισμό της ποσότητας που χρησιμοποιείται αρχικά στον αμπελώνα (χρήση του θείου ως μυκητοκτόνο), την υγιεινή του σταφυλιού (προσεκτική συγκομιδή, ώστε να αποφευχθεί ο τραυματισμός και στη συνέχεια η επιμόλυνσή του). Επίσης, η μείωση επιτυγχάνεται από την έγκαιρη θείωση του σταφυλοπολτού κατά την υποδοχή του στο οινοποιείο, την σωστή και έγκαιρη ψύξη του σταφυλιού για προστασία από ανεπιθύμητες ζυμώσεις και επιμολύνσεις από μικροοργανισμούς και βακτήρια (λυσοζύμη, χιτοζάνη). Επιπλέον, ο περιορισμός του θειώδους μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη χρήση υποκαταστατών (όπως το σορβικό οξύ) παράλληλα με ένα ποσοστό θειώδους ή και όχι. Τα υποκατάστατα είναι ικανά να προστατέψουν το γλεύκος και τον οίνο επαρκώς και να επηρεάζουν ελάχιστα ή και καθόλου την ποιότητα του, ενώ δεν είναι και λίγες οι φορές που ίσως να προσφέρουν και στον οργανοληπτικό του χαρακτήρα.

ABSTRACT

Efforts to dispel the myth that sulfur dioxide is the only solution to winemaking have intensified. In fact, for decades now, both chemists and oenologists have studied with various applications the reduction of sulfite in wine, in order to minimize it in the final product, so that it is considered completely natural. Based on previous studies, the reduction is achieved by limiting the amount used initially in the vineyard (use of sulfur as a fungicide), in the hygiene of the grapes (careful harvesting, to avoid injury and subsequent contamination). Also, the reduction is achieved by the sulfation of the grape pulp during its reception in the winery, by the correct and timely cooling of the grapes for protection from unwanted fermentations and contamination by microorganisms and bacteria (lysozyme, chitosan). In addition, the reduction of sulfite can be accomplished by the use of substituents (such as sorbic acid) in conjunction with a percentage of sulfite or not. Substitutes are able to protect must and wine adequately and have little or no effect on its quality, while they often benefit its organoleptic character.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	1
ΛΙΣΤΑ ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΩΝ	10
ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΚΑΙ ΑΓΓΛΙΚΗ ΓΛΩΣΣΑ	10
Εισαγωγή-Σκοπός Έρευνας	11
1. Τοξικότητα-Αλλεργίες-Νομοθεσία ΟΙV	11
1.1 Επίδραση Θειώδους στον Άνθρωπο και στο Περιβάλλον	11
1.2 Νομοθετικό Πλαίσιο	14
2. Ιστορική Αναδρομή	14
3. Το στοιχειακό Θείο	16
3.1 Φυσικά-Χημικά Χαρακτηριστικά του Θείου	16
3.2. Η Σχέση του Θείου με το Σταφύλι	17
3.3 Η Σχέση του Θείου με τον αμπελώνα	17
3.4. Η σχέση του Θείου με τον χώρο του οινοποιείου	18
3.4.1 Μεταβολισμός του Θείου στις ζύμες	18
3.4.2 Η αφομοίωση του θείου	18
4. Ο θειώδης Ανυδρίτης-Εισαγωγή	20
4.1 Χημεία Θειώδους σε Υδατικά Διαλύματα	21
4.2 Χημεία Θειώδους στον Οίνο	22
4.2.1 Χημικές Ιδιότητες	22
4.2.2 Οι μορφές του θειώδους	30
4.2.3. Ενώσεις που δεσμεύουν το Θειώδες	31
4.3 Ο ρόλος του Θειώδους στην Οινοποίηση	37
4.3.1 Ο σχηματισμός θειώδους από τις ζύμες	37
4.3.2 Ο σχηματισμός υδρόθειου	37
4.3.3 Πλεονεκτήματα-Μειονεκτήματα Θειώδους στην Οινοποίηση	39
5. Μέθοδοι προσδιορισμού Θειώδους	39
5.1 Μέθοδοι προσδιορισμού Ελεύθερου και Δεσμευμένου θειώδους σύμφωνα με τον ΟΙV- Συνήθης Μέθοδος	39
5.2 Μέθοδοι προσδιορισμού Ελεύθερου και Δεσμευμένου θειώδους σύμφωνα με τον ΟΙV- Μέθοδος Αναφοράς	42
6. Πρακτικές συνέπειες της παρουσίας του Θειώδους στον Οίνο	44

6.1 Επίδραση pH-Θερμοκρασίας-Αλκοολικού τίτλου (vol %)	44
6.2. Καμπύλη Θείωσης και η χρήση της στην οινοποίηση	46
7. Τρόποι Μείωσης και Υποκατάστατα Θειώδους	49
7.1 Βιολογικός οίνος	61
Συμπεράσματα-Συζήτηση	62
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	63

ΛΙΣΤΑ ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΩΝ

Συντόμηση	Πλήρες Όνομα
amu	Atomic Mass Unit
atm	Atmospheres
ATP	Adenosine triphosphate
cm	Centimeter
FAD	Flavin Adenine Dinucleotide
FMN	Flavin Mononucleotide
g	Grammar
J	Joule
Kg.K	Kilogram per Kelvin
L	Liter
LAB	Lactic Acid Bacteria
M	Molarity
m.ohm	Megaohm
mg	Milligram
ml	Milliliter
MLF	Malolactic Fermentation
mm	Millimeter
MPa	Megapascal
NAD	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
nm	Nanometer
°C	degrees Celsius
Pa	Pascal
ppm	Parts per million
UV	Ultra Violet
vol	Alcoholic volume
μg	Microgram

Εισαγωγή-Σκοπός Έρευνας

Ο οίνος αποτελεί ένα φυσικό προϊόν με περιεκτικότητα σε αιθανόλη και χαμηλό pH, χαρακτηριστικά που συνήθως αποτελούν ανασταλτικούς παράγοντες για την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών. Παρόλο αυτά, για την συντήρηση και την διατήρηση του οίνου απαιτείται ένα πρόσθετο ικανό να το προστατεύσει από την οξείδωση και από τη πιθανή ανάπτυξη μικροοργανισμών. Οι μικροοργανισμοί δεν είναι πάντα επιθυμητοί μιας και μπορούν να τον αλλοιώσουν με πολλούς τρόπους όπως αρωματικά και γευστικά. Παράλληλα όμως, τον τελευταίο καιρό έχει ενταθεί σε μεγάλο βαθμό το ενδιαφέρον για τη χρήση “φυσικών” συντηρητικών ή τεχνικών, αντί των χρησιμοποιούμενων πρόσθετων που κρίνονται είτε ως ύποπτα (όσον αφορά την επίδραση στον ανθρώπινο οργανισμό) ή δεν είναι πλέον αποδεκτά από τον καταναλωτή.

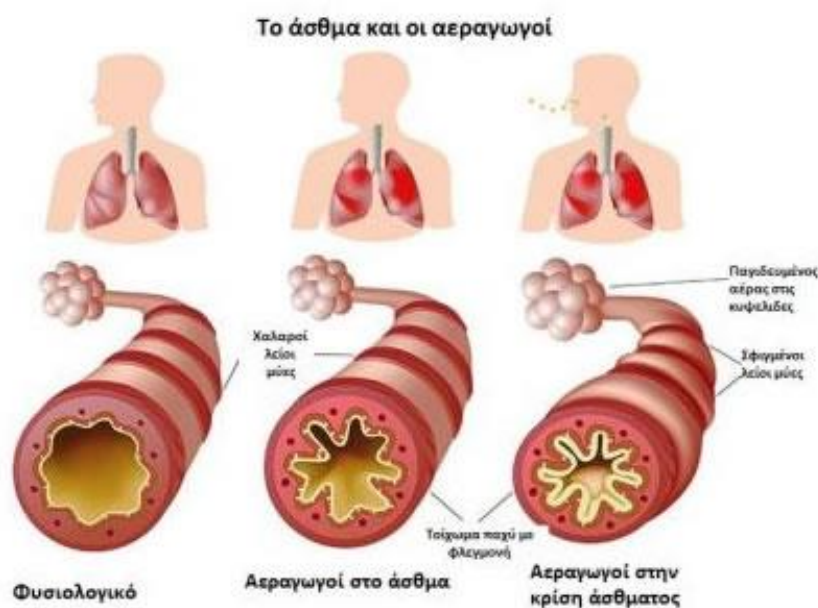
Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η βαθύτερη μελέτη και κατανόηση ενός πρόσθετου στον οίνο, τον θειώδη ανυδρίτη, καθώς και η εύρεση τεχνικών προκειμένου η ποσότητά του να ελαχιστοποιηθεί όσο το δυνατόν περισσότερο.

1. Τοξικότητα-Αλλεργίες-Νομοθεσία OIV

1.1 Επίδραση Θειώδους στον Άνθρωπο και στο Περιβάλλον

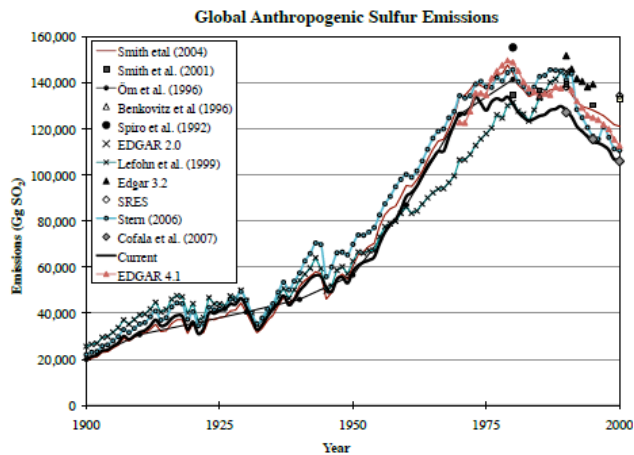
Το θειώδες παρά την θετική συμβολή του στην διατήρηση και συντήρηση του οίνου παρουσιάζει αρκετά μειονεκτήματα για την υγεία των ανθρώπων αλλά και για το περιβάλλον. Πιο συγκεκριμένα, είναι συνδεδεμένο με εμφάνιση συμπτωμάτων άσθματος τόσο σε ανθρώπους που έχουν ιστορικό άσθματος όσο και σε ανθρώπους που δεν έχουν. Το θειώδες μπορεί να προκαλέσει δυσκολία στην αναπνοή, σφίξιμο στο στήθος και βήχα σε ένα ποσοστό 5 με 10 % των ανθρώπων που έχουν άσθμα (<https://www.allergy.org.au/patients/other-allergy/sulfite-allergy>). Στους περισσότερους ανθρώπους το επεισόδιο άσθματος λόγω θειώδους εμφανίζεται σε χρονικό διάστημα δευτερολέπτων και λίγων λεπτών (Bernard J. Freedman 1980). Μεγάλο είναι επίσης και το ποσοστό των ανθρώπων οι οποίοι είναι αλλεργικοί στο θειώδες. Η συγκεκριμένη αλλεργία εμφανίζεται με πονοκέφαλο, εξάνθημα, κνίδωση, πρήξιμο του στόματος και των χειλών, δυσκολία στην αναπνοή, είναι ίσως επεισόδιο άσθματος (για όσους πάσχουν από άσθμα) και σε σπάνιες περιπτώσεις αναφυλαξία (<https://www.healthline.com/health/allergies/sulfa-sulfite#sulfite-allergy>). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι σε κάποια άτομα το pH του στομαχιού τους εμποδίζει τον ιονισμό του θειώδους με αποτέλεσμα να μένει δεσμευμένο εκεί (Ough, Crowell). Το όριο θειώδους που μπορεί να μυρίσει κάποιος χωρίς να δημιουργηθεί πρόβλημα είναι 0,3 – 2,5 mg. Συγκεντρώσεις όμως των 5-10 mg προκαλούν ερεθισμό της αναπνευστικής οδού στους περισσότερους ανθρώπους ενώ ακόμα μεγαλύτερες συγκεντρώσεις προκαλούν σοβαρό ξηρό βήχα. Τέλος, εάν κάποιος

εισπνέσει συγκεντρώσεις πάνω από 400-500 mg για μερικά λεπτά, μπορεί να οδηγηθεί σε θάνατο (L. Hasenberg). Μεγάλη προσοχή οφείλουν να δείχνουν και οι οινολόγοι οι οποίοι χειρίζονται το μεταμπισουλφίτ (metabisulphite) κατά την διάρκεια της οινοποίησης αφού μπορεί να προκαλέσει δερματίτιδα αν έρθει σε επαφή με το δέρμα. Ο Nater έκανε γνωστή μια από τις πρώτες υποθέσεις δερματίτιδας εξαιτίας θειώδους, ενώ μετέπειτα έρευνες από τους Petersen και Menne, Vena και Madan επιβεβαίωσαν την επικινδυνότητα επαφής του θειώδους με το δέρμα (H. Vally et al 2009). Το διοξείδιο του θείου και οι θειούχες ενώσεις αποδομούν την θειαμίνη (βιταμίνη B1) και την κυανοβαλαμίνη (βιταμίνη B12) και προκαλούν συμπτώματα όπως ταχυκαρδία, αδυναμία, πονοκέφαλο και αναιμία, μελαγχολία, διαταραχή μνήμης ή όρασης αντίστοιχα.



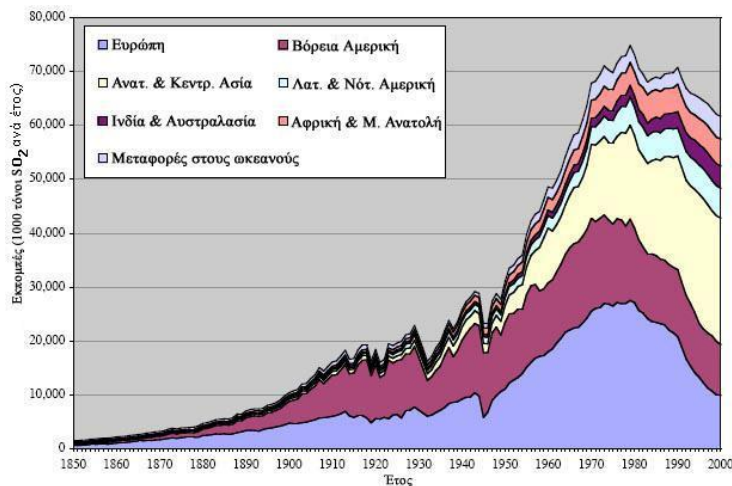
Εικόνα 1.1: Το άσθμα και οι αεραγωγοί.

Όσον αφορά στο περιβάλλον το διοξείδιο του θείου απελευθερώνεται στην ατμόσφαιρα από τα ηφαίστεια αλλά και από ανθρώπινη δραστηριότητα. Η ετήσια παραγωγή διοξειδίου του θείου από όλα τα ενεργά ηφαίστεια ανέρχεται περίπου στους 107 τόνους (L. Hasenberg). Ωστόσο, αυτή η ποσότητα είναι μικρότερη σε σχέση με την ποσότητα που παράγεται από ανθρώπινη δραστηριότητα η οποία μολύνει το περιβάλλον.



Εικόνα 1.2: Εκπομπές διοξειδίου του θείου σε παγκόσμιο επίπεδο.

Τα καυσαέρια οχημάτων με κινητήρα, η καύση ορυκτών καυσίμων, η τήξη και το κάψιμο μεταλλευμάτων, ο εξευγενισμός του αργού πετρελαίου, η διαδικασία λεύκανσης, η παραγωγή γαλιού και χαρτιού καθώς και η εξόντωση εντόμων είναι μερικές από τις ανθρωπογενής πηγές διοξειδίου του θείου (L. Hasenberg). Βασικοί πλέον υπεύθυνοι για τις εκπομπές SO₂ στην ατμόσφαιρα είναι η Κεντρική και Ανατολική Ασία και, κατ' επέκταση η Ευρώπη και η Βόρεια Αμερική (εικόνα 1.3).



Εικόνα 1.3: Εκπομπές διοξειδίου του θείου ανά ήπειρο.

Το παραγόμενο διοξείδιο του θείου διαλυόμενο από τα σύννεφα και τις σταγόνες της βροχής κάνει το νερό της βροχής ακόμα πιο όξινο (A. G. Clarke και M. Radojevic 1986). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή της χλωρίδας, των κτηρίων και των μνημείων καθώς και την όξυνση των εδαφών, των λιμνών και των ρεμάτων.

1.2 Νομοθετικό Πλαίσιο

Λόγω της τοξικότητας και των προβλημάτων που δημιουργεί το θειώδες, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (World Health Organization) έχει ορίσει ως μέγιστη ημερήσια πρόσληψη τα 0,7 mg/kg σωματικού βάρους ενώ η θανατηφόρα πρόσληψη ορίζεται ως 1,5g/kg σωματικού βάρους (Biancalana, 2006). Όσον αφορά στον οίνο τα όρια περιεκτικότητας σε διοξείδιο του θείου στην Ευρωπαϊκή Ένωση φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 1.1: Τα νομοθετικά όρια του θειώδους.

Τύπος οίνου	Όρια (mg/L)
Οίνος ερυθρός (σάκχαρα <5 g/L)	150
Οίνος λευκός και ερυθρωπός (σάκχαρα <5 g/L)	200
Οίνος ερυθρός (σάκχαρα >5 g/L)	200
Οίνος λευκός και ερυθρωπός (σάκχαρα >5 g/L)	250
Οίνος λικέρ (σάκχαρα <5 g/L)	150
Οίνος λικέρ (σάκχαρα >5 g/L)	200
Αφρώδης οίνος ποιότητας	185
Λοιποί αφρώδη οίνοι	235

2. Ιστορική Αναδρομή

Ο θειώδης ανυδρίτης χρησιμοποιείται 300 χρόνια στην οινολογική πρακτική. Εδώ και μισό αιώνα περίπου όμως, παρακολουθείται και μελετάται η ορθολογική του χρήση καθώς και η αναζήτηση τρόπων περιορισμού του στο ελάχιστο προκειμένου να διασφαλιστεί ποιοτικά ο οίνος. Οι δόσεις καθορίζονται από τις συνθήκες ορθολογικής χρήσης σε όλα τα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας, ώστε ο οινοποιός να επωφελείται των ιδιοτήτων του θειώδους χρησιμοποιώντας τη μικρότερη δυνατή ποσότητα. Προϋπόθεση για αυτό είναι η γνώση των μορφών του θειώδους ανυδρίτη με τις οποίες βρίσκεται στο γλεύκος και στον οίνο και τη δραστηριότητα κάθε μορφής, καθώς και τους παράγοντες που επηρεάζουν τη κάθε δράση του (pH, θερμοκρασία, αλκοόλη, ουσίες αδρανοποίησής του). Πολλές χιλιετίες πριν στην Αίγυπτο και στην Ρώμη, με στόχο να έχουν οι οίνοι μεγάλη διάρκεια ζωής έκλειναν τα βαρέλια με κεριά. Για να καθυστερήσουν την οξείδωση και για την σωστή αποθήκευσή τους, καίγανε θειάφι μέσα στο βαρέλι. Αυτό συνεχιζόταν μέχρι και τον μεσαίωνα, πολλές φορές και κρυφά, διότι δεν είχε επιτραπεί από την τότε νομική εξουσία κάθε κράτους. Πιο συγκεκριμένα, το σημείο κατατεθέν που σηματοδότησε την χρήση του θειώδους στην οινοποίηση νόμιμα ήταν το 1487 όπου στη Πρωσία το τότε διάταγμα επέτρεψε τη χρήση του σε κάθε οινοποιό. Μέχρι τότε, Ολλανδοί και Άγγλοι χρησιμοποιούσαν τη καύση θειοφοκεριών μέσα στα βαρέλια όπως οι Ρωμαίοι. Η πρώτη χειρόγραφη επιγραφή όπου γίνεται χρήση του κεριού στην οινοποίηση,

παρουσιάζεται μόλις τον 18ο αιώνα, το 1765. Χαρακτηριστικά αναγράφεται ότι “Το αέριο που εκλύεται από τη καύση των θειαφοκλωστών χρησιμοποιείται για το θειάφισμα των βαρελιών προσδίδοντας φρεσκάδα στους οίνους, που μάλιστα διατηρείται επί μακρόν.” Στα ολλανδικά οι θειαφοκλωστές αναφέρονται ως Dutch match, και γι αυτό οι Ολλανδοί θεωρούν δική τους εφεύρεση τη θείωση. Οι Ολλανδοί ήταν οι καλύτεροι θαλασσοπόροι και δεινοί έμποροι της εποχής και αναζητούσαν λύσεις για το “ξύδιασμα” των οίνων, πράγμα που σήμαινε απώλειες κερδών και φήμης. Εκείνοι παρουσίασαν επίσης τα διάσημα Ισπανικά και Πορτογαλικά κρασιά. Αργότερα, στα τέλη του 19ου αιώνα εμφανίστηκε ο Παστέρ και απέδειξε πως η καταστροφή των οίνων οφειλόταν στη κακή συντήρηση των βαρελιών καθώς και στις μικροβιακές προσβολές. Από το 1900 και κυρίως μετά τον Β΄ παγκόσμιο πόλεμο επιτράπηκε η χρήση του θειώδους για τους οίνους ποιότητας μόνο σε χώρες κύρους και οικονομικά δυνατές. Τη δεκαετία του ’60 μετά από μελέτες στην ενζυμολογία και στην αναλυτική χημεία αποδείχτηκε μια από τις πιο σημαντικές ιδιότητες του θειώδους, η αντιοξειδωτική του δράση καθώς και η σημασία της παρουσίας του έναντι των ζυμών και βακτηρίων στους οίνους. Αυτό όμως που παρατηρείται από τον μεσαίωνα και μέχρι πρόσφατα τόσο στην Ελλάδα όσο και σε άλλες χώρες, είναι η ιδεολογία του “χημικού πρόσθετου” στον οίνο, που η παρουσία του το καθιστούσε επικίνδυνο και η απουσία του το καθιστούσε “αγνό προϊόν και καθαρό”. Μόλις το 2005 άρχισε η περαιτέρω διάθεση για συζήτηση περί της χρήσης του και των πλεονεκτημάτων του στον οίνο.



Εικόνα 2.1: Ο τρύγος στα αρχαία χρόνια.



Εικόνα 2.2: Τοιχογραφία με δραστηριότητες περί σταφυλιού και οίνου στην αρχαία Αίγυπτο (El Dorry, 2012).



Εικόνα 2.3: Ο τρύγος στα αρχαία χρόνια.

3. Το στοιχειακό Θείο

Για να κατανοηθεί καλύτερα το θειώδες σαν χημική ένωση που προστίθεται στον οίνο καθώς και πως αυτό δημιουργεί δεσμούς και ενώσεις που επηρεάζουν με τη σειρά τους τον οίνο, είναι απαραίτητο να κατανοηθεί το ίδιο το θείο ως ένα από τα επιμέρους στοιχεία που αποτελούν το θειώδη ανυδρίτη.

3.1 Φυσικά-Χημικά Χαρακτηριστικά του Θείου

Το θείο (S) έχει ατομικό αριθμό 16. Είναι στερεό, σταθερό υπό κανονικές συνθήκες, με μορφή κίτρινης σκόνης και χαρακτηριστική οσμή. Χρησιμοποιείται σε εφαρμογές στη βιομηχανία, από επαγγελματίες και καταναλωτές. Το θείο έχει ερεθιστική δράση στο δέρμα αλλά καμία άλλη άμεση ή έμμεση χρόνια επίδραση στην ανθρώπινη υγεία και στο περιβάλλον. Δεν είναι πτητικό, δεν είναι εύφλεκτο και δεν έχει εκρηκτικές ή οξειδωτικές ιδιότητες. Στα προϊόντα αποσύνθεσης τα οποία θεωρούνται επικίνδυνα περιλαμβάνονται τα οξείδια του θείου και το υδρόθειο.

Δεν διαλύεται στο νερό με πολλές αλλοτροπικές μορφές, συναντάται ως ελεύθερο υπό μορφή μορίων S_8 σε κοιτάσματα συνήθως κοντά σε ηφαίστεια ή διαλυμένο στο πετρέλαιο ενώ αποτελεί συστατικό πολλών σημαντικών ορυκτών όπως:

Ο σιδηροπυρίτης FeS_2

Ο γαληνίτης, PbS

Ο γύψος, $CaSO_4 \cdot 2H_2O$

Ο σφαλερίτης, ZnS ,

από τα οποία κυρίως λαμβανόταν στο παρελθόν ενώ σήμερα ως επί το πλείστον λαμβάνεται κατά την αποθείωση του φυσικού αερίου και του πετρελαίου.

Πίνακας 3.1: Τα χαρακτηριστικά του Θείου.

ΙΔΙΟΤΗΤΑ	ΤΙΜΗ
Φυσική κατάσταση	Σκόνη
Χρώμα	Κίτρινο
Οσμή	Χαρακτηριστική
Πυκνότητα	2,07 g/cm ³
Σημείο βρασμού	444,6°C
Σημείο ανάφλεξης	113-12°C
Κίνδυνος Εκρήξεως	Δεν έχει εκρηκτικές ιδιότητες
Θερμοκρασία Αυτανάφλεξης	Μη εφαρμόσιμο
Τάσης Ατμών	<0,000014Pa
Διαλυτότητα στο νερό	<0,0000005gr/L
Ιξώδες (κινηματικό)	Μη εφαρμόσιμο
Συντελεστής Διανομής οκτανόλης-νερού	Μη εφαρμόσιμο
Ατομική μάζα	32,06 amu
Σκληρότητα	2
Σημείο Τήξεως	388 ^o K
Ηλεκτρανητικότητα (Pauling)	2,58
Θερμική Αγωγιμότητα	0,269 W/m.K
Ηλεκτρική αγωγιμότητα	5,0x 10 ⁻¹⁶ /m.ohm
Ειδική θερμοκρασία	710 J/kg.K

3.2. Η Σχέση του Θείου με το Σταφύλι

Το θείο απορροφάται από το ριζικό σύστημα του αμπελιού υπό τη μορφή του θεικού ανιόντος SO₄⁻² ή μέσω των φύλλων με την μορφή αερίου.

Ωστόσο, μια από τις βασικότερες χρήσεις του θείου στον αμπελώνα είναι η μυκητοκτόνος δράση του αφού είναι συστατικό διαφόρων φυτοφαρμάκων. Η χρήση του ξεκίνησε να εφαρμόζεται το 1821 στην Αγγλία για την καταπολέμηση του ωιδίου στην αχλαδιά, ενώ στο αμπέλι χρησιμοποιήθηκε στα μέσα του 18^{ου} αιώνα στην Γαλλία. Το θείο, μαζί με το άζωτο, είναι απαραίτητα στοιχεία για την ανάπτυξη των ζυμομυκήτων, καθώς χρησιμοποιούνται στον σχηματισμό κυτταρικών συστατικών όπως είναι οι πρωτεΐνες και οι βιταμίνες.

Οι ζύμες βρίσκουν το θείο υπό την μορφή θεικών ιόντων, ενώ κάποια είδη μπορούν να καλύψουν τις ανάγκες τους σε θείο μέσω της παραγωγής υδρόθειου.

3.3 Η Σχέση του Θείου με τον αμπελώνα

Οι μορφές του θείου στον αμπελώνα

Το θείο στο εμπόριο απαντάται σε τρεις μορφές:

Σε στερεή μορφή ως σκόνη έτοιμη για θειαφίσματα. Προστίθεται είτε στη βάση του φυτού είτε στα φύλλα.

Σε υγρή μορφή, ως βρέξιμη σκόνη της στερεής μορφής. Εφαρμόζεται με ψεκάσμο του φυτού στα φύλλα ώστε να απορροφηθεί πιο γρήγορα.

Στη μορφή κολλοειδούς θείου, τεμάχια θείου μεγέθους 3-6μm.

Διαφορές σκόνης και βρέξιμης σκόνης.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως η ημερομηνία του τρύγου πρέπει να απέχει 3-5 ημέρες από την εφαρμογή των θειούχων προϊόντων στον αμπελώνα.

Μάλιστα, ο Runkine το 1963 τονίζει ότι ο σχηματισμός του υδρόθειου είναι αντιστρόφως ανάλογος των σωματιδίων των θειούχων ενώσεων που εφαρμόζονται στον αμπελώνα.

Επιπλέον, οι Schutz και Kunkee συνέκριναν τον σχηματισμό του υδρόθειου που παρήχθη σε έναν οίνο ο οποίος προήλθε από αμπελώνα όπου είχε εφαρμοστεί θείο σε μορφή σκόνης, σε σχέση με οίνο που προήλθε από αντίστοιχο αμπελώνα με εφαρμογή θειούχων κολλοειδών διαλυμάτων. Αυτή η έρευνα κατέληξε στο συμπέρασμα ότι στη δεύτερη κατηγορία οίνου, αυτή με τα θειούχα κολλοειδή, το ποσοστό του παραγόμενου υδρόθειου ήταν πολύ πιο μεγάλο.

Η χρήση της βρέξιμης σκόνης με κοκκομετρική διάμετρο του θείου μεταξύ 6-8 μm έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του υδρόθειου στο τελικό προϊόν. Η βρέξιμη σκόνη είναι γενικά καλύτερη από κάθε μορφή, διότι ακόμη και με το 1/3 της σκόνης υπάρχει η ίδια αποτελεσματικότητα ως προς τις ασθένειες, τα ζιζάνια, τους μύκητες και γενικότερα ως προς τη προστασία του φυτού καθώς επίσης σχηματίζεται και μικρότερη ποσότητα υδρόθειου.

3.4. Η σχέση του Θείου με τον χώρο του οινοποιείου

3.4.1 Μεταβολισμός του Θείου στις ζύμες

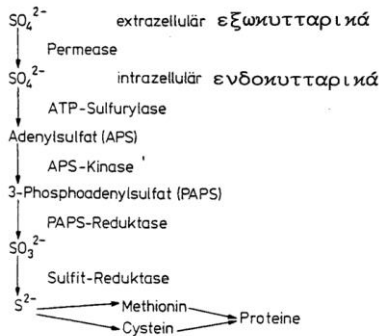
Το θείο αποτελεί βασικό συστατικό βιταμινών όπως η βιοτίνη και η θειαμίνη καθώς και των αμινοξέων μεθειονίνη και κυστεΐνη που αποτελούν δομικές μονάδες των πρωτεϊνών.

Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, οι ζύμες παράγουν πτητικές θειούχες ενώσεις, οι οποίες συνεισφέρουν στο άρωμα του οίνου έχοντας σχετικά χαμηλό κατώφλι αντίληψης. Σε ορισμένες περιπτώσεις κάποιες θειούχες ενώσεις είναι υπεύθυνες για τις δυσάρεστες οσμές (Α. Καγοπούλου).

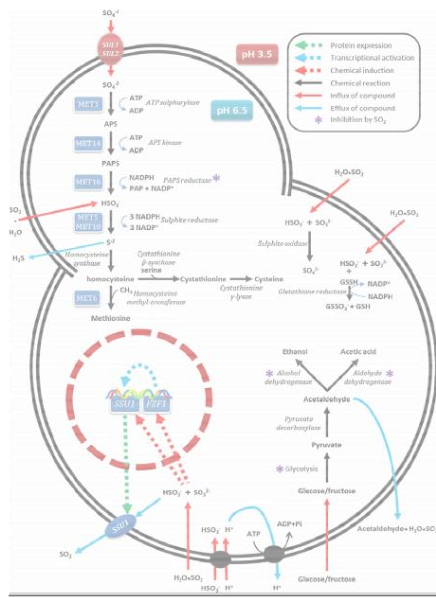
3.4.2 Η αφομοίωση του θείου

Πηγή θείου για τις ζύμες στο γλεύκος αποτελούν κυρίως τα θειϊκά άλατα καθώς και το αμινοξύ μεθειονίνη. Το θειούχο αμινοξύ κυστεΐνη δεν αφομοιώνεται σχεδόν καθόλου από τις ζύμες. Τα

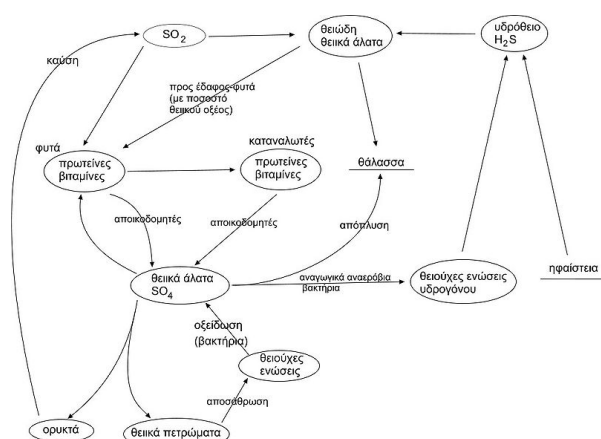
περισσότερα στελέχη του *S. Cerevisiae* μπορούν να χρησιμοποιήσουν σαν πηγή θείου, θειώδη ή θειοθειικά άλατα (Λογοθέτης). Τα θειικά ανιόντα του γλεύκους εισέρχονται στο κύτταρο με τη βοήθεια μίας πρωτεΐνης και ανάγονται προς θειούχα ανιόντα S^{2-} τα οποία συμβάλουν στην διαδικασία βιοσύνθεσης των αμινοξέων τα οποία αποτελούνται από θείο και άλλες θειούχες ενώσεις (Α. Καψοπούλου).



Εικόνα 3.1: Η αφομοίωση του θείου από τις ζύμες.



Εικόνα 3.2: Το συνοπτικό μονοπάτι της αφομοίωσης του θειώδους και οι κυτταρικές και μοριακές ανταποκρίσεις του *S.cerevisiae* με την παρουσία του SO_2 . (Divol B., 2012).



Εικόνα 3.3: Πορεία αφομοίωσης του θείου.

4. Ο θειώδης Ανυδρίτης-Εισαγωγή

Ο θειώδης ανυδρίτης είναι το διοξείδιο του θείου SO_2 (αέριο), το οποίο χρησιμοποιείται για την αποστείρωση και συντήρηση των γλεύκων και των οίνων. Μέχρι σήμερα δεν έχει βρεθεί κανένα υποκατάστατο που να περιλαμβάνει όλες τις ιδιότητες του θειώδους. Είναι αέριο, άχρωμο, μη αναφλέξιμο, χαρακτηριστικής δυσάρεστης και αποπνικτικής οσμής, το οποίο σχηματίζεται από την καύση του θείου. Με εκτόνωση στερεοποιείται προς λευκή χιονώδη μάζα. Όταν εισπνέεται, επιδρά στους βλεννογόνους και στα αναπνευστικά όργανα. Το θειώδες σε αέρια μορφή διαλύεται στο νερό, τόσο περισσότερο, όσο χαμηλότερη είναι η θερμοκρασία. Στα οινοποιεία δεν είναι δυνατόν να προετοιμαστούν και να συντηρηθούν διαλύματα πιο πυκνά από το 10% v/v, επειδή η τάση ατμών των διαλυμάτων είναι πολύ υψηλή και το αέριο διοξείδιο του θείου διαφεύγει πολύ εύκολα, δημιουργώντας πνιγηρή ατμόσφαιρα. Συνήθως προετοιμάζονται διαλύματα 6% v/v σε νερό τα οποία έχουν την μέγιστη διαλυτότητα. Το διοξείδιο του θείου ανάλογα με τις συνθήκες με τις οποίες βρίσκεται, εμφανίζεται ως οξειδωτικό και ως αναγωγικό. Υπό ορισμένες συνθήκες οξειδώνει το υδρόθειο προς θείο, τον άνθρακα προς διοξείδιο του άνθρακα και το υδρογόνο προς νερό. Έχει αναγωγική δράση, απορροφώντας αργά το οξυγόνο από τον αέρα και μετατρέπεται σε θειικό οξύ. Ανάγει το ιώδιο προς υδροϊώδιο, το χλώριο προς υδροχλώριο, τον τρισθενή σίδηρο προς δισθενή. Στις αναγωγικές ιδιότητες του διοξειδίου του θείου στηρίζεται και ο ποσοτικός προσδιορισμός του με διάλυμα ιωδίου.

Το SO_2 χρησιμοποιείται ως συντηρητικό σε μεγάλο αριθμό προϊόντων στην βιομηχανία τροφίμων. Η παρουσία του μέσα στα προϊόντα δηλώνεται με κωδικούς σύμφωνα με την κωδικοποίηση των πρόσθετων ουσιών της Ε.Ε. Η χημική ένωση SO_2 ταξινομείται στην ομάδα των θειούχων ενώσεων. Το εύρος των κωδικών είναι E220-E228 (ΕΚ αρ. 423/2008, Di Costo 2006).

Οι μορφές του θειώδους ανυδρίτη που χρησιμοποιούνται στην οινολογία είναι του καθαρού θείου, της στερεής ή της υγροποιημένης μορφής και των διαλυμάτων του θειώδους ανυδρίτη. Αναφέρονται αναλυτικά στον Πίνακα 4.1.

Πίνακας 4.1: Μορφές θειώδους στην οινοποίηση.

ΚΩΔΙΚΟΙ E.E.	ΧΗΜΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ	ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ
E220	Διοξείδιο του θείου	Φυσικό συντηρητικό
E221	Θειώδες Νάτριο	Σύνθετο συντηρητικό
E222	Όξινο θειώδες Νάτριο	Σύνθετο συντηρητικό και λευκαντικό μέσο
E223	Μεταθειώδες Νάτριο	Σύνθετο συντηρητικό και αντιοξειδωτικό
E224	Μεταθειώδες Κάλιο	Σύνθετο συντηρητικό
E225	Θειώδες Κάλιο	Σύνθετο συντηρητικό
E226	Θειώδες Ασβέστιο	Σύνθετο συντηρητικό
E227	Όξινο θειώδες ασβέστιο	Σύνθετο συντηρητικό
E228	Όξινο θειώδες κάλιο	Σύνθετο συντηρητικό

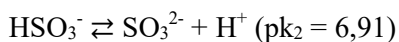
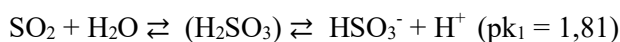
4.1 Χημεία Θειώδους σε Υδατικά Διαλύματα

Διαλυτότητα

Η διαλυτότητα του θειώδους ανυδρίτη είναι πολύ υψηλή στο νερό και παρουσιάζει μεγάλο εύρος. Για παράδειγμα είναι 228 g/L στους 0°C, 162,1 g/L στους 10°C, 112,9 g/L στους 20°C και 78,1 g/L στους 30°C. Η θερμοκρασία έχει άμεση επίδραση στη διαλυτότητα. Αξιοσημείωτο είναι ότι σε μικρές τιμές της θερμοκρασίας παρουσιάζει μεγάλη διαλυτότητα. Αυτή η ιδιότητα δίνει τη δυνατότητα δημιουργίας και προετοιμασίας διαλυμάτων με διοξείδιο του θείου σε χαμηλότερες θερμοκρασίες. Σε υψηλές θερμοκρασίες υπάρχει περίπτωση διαρροής αερίων θειώδους.

Ιονισμός

Η ενυδάτωση του διοξειδίου του θείου δίνει τις παρακάτω ισορροπίες:



Η μορφή SO_2 στο νερό ονομάζεται μοριακή. Το HSO_3^- , δηλαδή η πρώτη ιονισμένη μορφή του

SO₂, αναφέρεται ως μπισουλφίτ. Το HSO₃⁻ είναι η πιο συνηθισμένη μορφή του διοξειδίου του θείου στα γλεύκη και τους οίνους. Είναι ασθενές οξύ, οπότε στο διάλυμα αντιδρά και μετατρέπεται σε άλλες μορφές δίνοντας νέες ισορροπίες σε συνάρτηση με το pH (Henderson 2009). Το ιόν SO₃²⁻ είναι η οξειδωμένη μορφή του SO₂ που βρίσκεται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις στις συνθήκες του οίνου. Η δράση του να καταναλώνει O₂ είναι πολύ μειωμένη, εξαιτίας της ελάχιστης ποσότητας του μέσα στον οίνο (Jackson 2008, Ribéreau – Gayon et al. 2006, Boulton et al. 1998).

Μεταβλητότητα

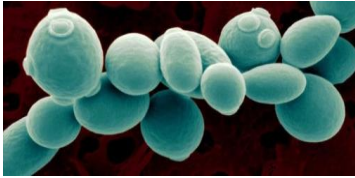
Οι διάφορες μορφές των θειωδών στο διάλυμα του γλεύκους και του οίνου βρίσκονται σε άνισες ποσότητες. Η συγκέντρωσή τους μεταβάλλεται από την οξύτητα ή το pH του διαλύματος. Όσο πιο όξινο είναι το pH του διαλύματος, τόσο η αντίδραση ευνοεί το σχηματισμό μοριακού SO₂ κι αντίθετα όσο αυξάνεται το pH του διαλύματος τόσο η αντίδραση κατευθύνεται στη δημιουργία ιονισμένων μορφών του (Henderson 2009). Η μεταβλητότητα επηρεάζεται και από την τάση των ατμών του διαλύματος. Οι ατμοί πάνω στην επιφάνεια του διαλύματος περιέχουν ελεύθερο SO₂. Αυτό είναι σημαντικό θέμα λόγω απώλειας SO₂ μέσω εξάτμισης και λόγω επίδρασης στην οσμή. Η πίεση των ατμών είναι ανάλογη όχι μόνο από τη συγκέντρωση του ελεύθερου διοξειδίου του θείου, αλλά και με τη συγκέντρωση της μοριακής του μορφής στο διάλυμα (Boulton et al. 1998).

4.2 Χημεία Θειώδους στον Οίνο

4.2.1 Χημικές Ιδιότητες

Αντισηπτική δράση-Αντιμικροβιακή δράση

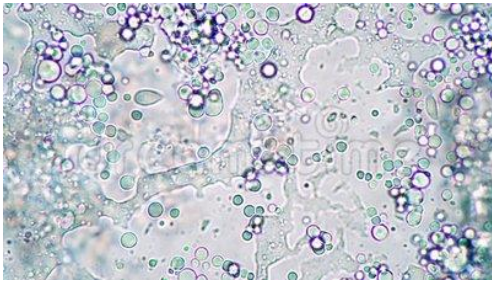
Η αντισηπτική δράση του θειώδους ανυδρίτη αναφέρεται στην παρεμπόδιση της ανάπτυξης σε μεγάλο εύρος μικροοργανισμών. Έχει μεγάλη ανασταλτική δράση ως προς τις ζύμες (εικόνα 4.1), τα γαλακτικά βακτήρια (lactic acid bacteria -LAB) (εικόνα 4.2, 4.3) και πιο μικρή ως προς τα οξικά βακτήρια (εικόνα 4.4, 4.5) και ορισμένα άλλα που προκαλούν αλλοιώσεις (Santos M. 2012, Ribéreau – Gayon et al 2006). Η ποσότητα του διοξειδίου του θείου μέσα στον οίνο δεν είναι όλη ενεργή. Η μοριακή μορφή είναι η κύρια δραστική μορφή του SO₂. Η δραστικότητα του μοριακού SO₂ είναι σε συνάρτηση με την αντισηπτική του δραστηριότητα (Κουράκου-Δραγώνα 1998).



Εικόνα 4.1: *Saccharomyces cerevisiae*.



Εικόνα 4.2: Τα γαλακτικά βακτήρια.



Εικόνα 4.3: Τα γαλακτικά βακτήρια.

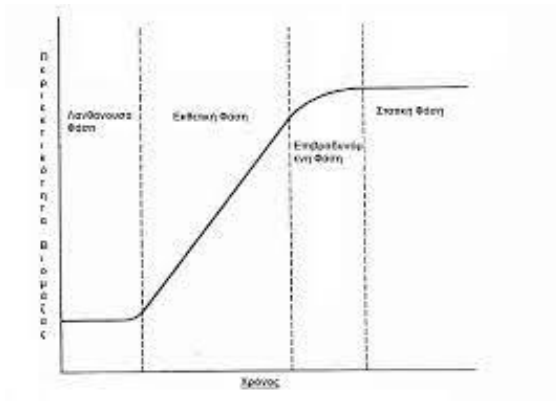


Εικόνα 4.4: Τα οξικά βακτήρια.



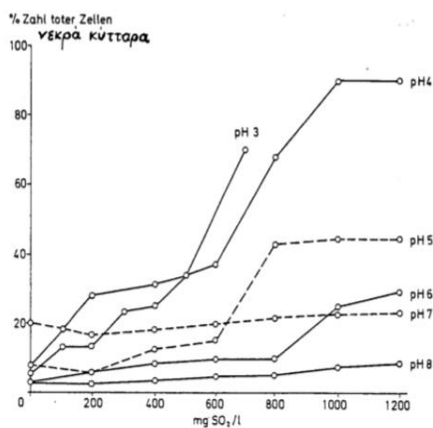
Εικόνα 4.5: Τα οξικά βακτήρια.

Πιο συγκεκριμένα η επίδρασή του στις ζύμες παρουσιάζεται με επιμήκυνση της φάσης αναμονής και καθυστέρηση της αλκοολικής ζύμωσης, μείωση του ρυθμού ανάπτυξης και καθυστέρηση της ολοκλήρωσης της ζύμωσης και επιτάχυνση της φάσης θανάτου.



Εικόνα 4.6: Οι φάσεις του κυτταρικού κύκλου των ζυμών.

Ο τρόπος δράσης του είναι ο εξής: Το θειώδες εισέρχεται στα κύτταρα των ζυμών με τη μοριακή μορφή και λόγω του pH των κυττάρων (περίπου 6,5-7) δίσταται σε ιόντα, τα οποία αποτελούν την ενεργή μορφή του. Η ποσότητα του μοριακού θειώδους που θα εισέρθει στο κύτταρο εξαρτάται άμεσα από το pH (εικόνα 4.7) το οποίο καθορίζει την ιοντική ισορροπία και συνεπώς και τη συγκέντρωση της κάθε μορφής. Όσο χαμηλότερο είναι το pH, τόσο μεγαλύτερη θα είναι η συγκέντρωση της μοριακής μορφής (Α. Καψοπούλου).



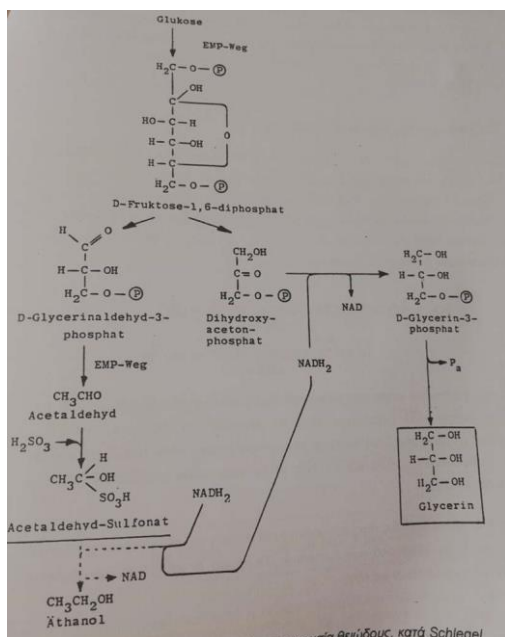
Εικόνα 4.7: Η επίδραση του pH στη δράση του θειώδους στις ζύμες (Dittrich).

Στο εσωτερικό του κυττάρου, το θειώδες αναστέλλει την δραστηριότητα του ενζύμου αφυδρογονάση της 3-φωσφογλυκεριναλδεύδης στη οδό της γλυκόλυσης, αφού σχηματίζει σύμπλοκο με το συνένζυμο NAD^+ , με αποτέλεσμα να χάνεται η δραστηριότητά του. Επίδρα αρνητικά στην αναπνευστική αλυσίδα και την οξειδωτική φωσφορυλίωση καθώς αναστέλλει τις αφυδρογονάσες που χρησιμοποιούν ως συνένζυμο το NAD^+ . Η επίδρασή του στην αναπνευστική αλυσίδα επιβεβαιώνεται και από το γεγονός, ότι το θειώδες αναστέλλει τις φλαβοπρωτεΐνες, καθώς δημιουργούνται σύμπλοκα μεταξύ των προσθετικών ομάδων των

ενζύμων FMN και FAD⁺ και θειώδους. Μειώνει την συγκέντρωση του εσωκυτταρικού ATP, καθώς ενεργοποιεί ένα ενζυμικό σύστημα στην κυτταρική μεμβράνη το οποίο έχει τον χαρακτήρα υδρολάσης. Δεσμεύει την ακεταλδεΐδη σύμφωνα με την αντίδραση

$$\text{CH}_3\text{-CHO} + \text{Na}_2\text{SO}_3 \rightarrow \text{CH}_3\text{-CHOH-SO}_3\text{Na}$$

με αποτέλεσμα να μειώνεται η παραγωγή αιθανόλης και να αυξάνεται η παραγωγή γλυκερίνης (εικόνα 4.8) (Ε. Ντουρτόγλου, Α. Ευαγγέλου). Διασπά την βιταμίνη θειαμίνη και αντιδρά με τις αζωτούχες βάσεις των νουκλεϊκών οξέων με αποτέλεσμα να δημιουργούνται μεταλλάξεις (Α. Καγοπούλου).



Εικόνα 4.8: Η παραγωγή γλυκερίνης παρουσία θειώδους, κατά Schlegel.

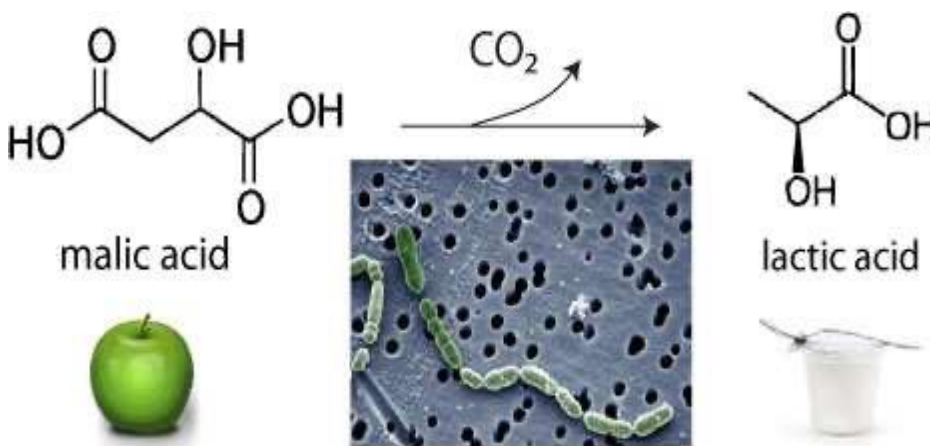
Όσον αφορά στα βακτήρια, η μοριακή μορφή του θειώδους εισέρχεται στα κύτταρά τους με απλή διάχυση (Η. Νεραντζής, Π. Ταταρίδης et al Μικροβιολογία Οίνου) και διαταράσσει τη δραστηριότητα των ενζύμων και των πρωτεϊνών (Α. Καγοπούλου) και τελικά επιφέρει τον θάνατο (Η. Νεραντζής, Π. Ταταρίδης et al Μικροβιολογία Οίνου). Επίσης, ο θειώδης ανυδρίτης επεμβαίνει στον μεταβολισμό του κιτρικού οξέος από τα LAB, δεσμεύοντας το διακετύλιο το οποίο προσδίδει το βουτυρώδες άρωμα στον οίνο (Von Wright et al, 2012). Σε χαμηλό pH, το SO₂ σε μικρές συγκεντρώσεις εμποδίζει την ανάπτυξη των βακτηρίων και σε υψηλές συγκεντρώσεις, τα βακτήρια πεθαίνουν (Henderson, 2009).

Οι ενώσεις ακεταλδεΐδη-SO₂ και πυροσταφυλικό οξύ-SO₂ είναι ιδιαίτερα δραστικές έναντι των LAB. (Κουράκου-Δραγώνα, 1998). Τα LAB μεταβολίζουν τις ενώσεις ακεταλδεΐδη και το πυροσταφυλικό οξύ, ελευθερώνοντας το μοριακό SO₂ το οποίο δρα εναντίον τους (Osborne et al., 2000, Ough, 1992).

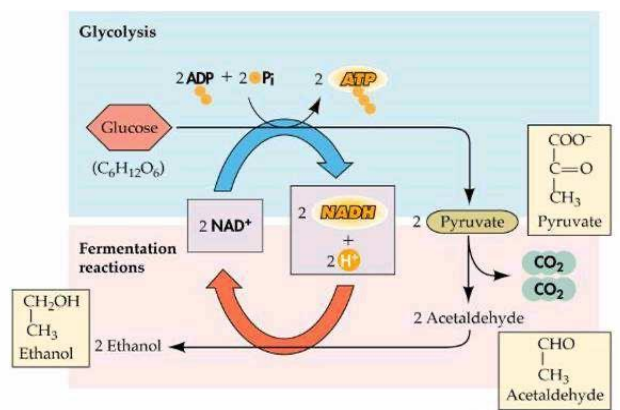
Παρά το γεγονός ότι το δεσμευμένο από την ακεταλδεύδη θειώδες παρουσιάζει κάποια ανασταλτική δράση έναντι των βακτηρίων, ο ρόλος του μοριακού θειώδους είναι πιο σημαντικός (sulphur dioxide: science behind this anti-microbial, anti-oxidant, wine additive 2009).

Η θείωση του γλεύκους μετά την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης μπορεί να καθυστερήσει ή να αναστείλει την ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων. Οι κόκκοι παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευαισθησία από τους λακτοβάκιλλους (Η. Νεραντζής, Π. Ταταρίδης et al Μικροβιολογία Οίνου) ενώ συγκέντρωση 20 mg/L ελεύθερο ή 80-100 mg/L δεσμευμένο θειώδες είναι αρκετή για να αναστείλει την ανάπτυξη του *Leuconostoc oenos* (Α. Καμποπούλου). Στην περίπτωση παρουσίας μεγάλου αριθμού οξικών βακτηρίων, προσθήκη μεγάλων συγκεντρώσεων SO₂ προκαλεί έντονη μυρωδιά και γεύση στον οίνο, πράγμα που θεωρείται μη αποδεκτό (Κουράκου-Δραγώνα, 1998).

Η ανασταλτική επίδραση του διοξειδίου του θείου στη μηλογαλακτική ζύμωση (εικόνα 4.9) είναι πολύ μεγαλύτερη από ότι είναι για την αλκοολική ζύμωση (εικόνα 4.10) που εκτελείται από ζύμες του γένους *Saccharomyces*.



Εικόνα 4.9: Η μηλογαλακτική ζύμωση.



Εικόνα 4.10: Η αλκοολική ζύμωση.

Επιπρόσθετο πρόβλημα αποτελούν οι μούχλες. Η κύρια αντιπρόσωπος στις μούχλες είναι η γκρίζα μούχλα με παθογόνο τη *Botrytis cinerea*. Η επέμβαση με το SO₂ γίνεται πολύ νωρίς. Ξεκινά πριν από τη σύνθλιψη των μολυσμένων σταφυλιών (Κουράκου-Δραγώνα, 1998). Συνήθως, εφαρμόζονται μυκητοκτόνα όπως το Captan, το Ronilan και το Orthene-50, πάνω στα σταφύλια. Η επέμβαση αυτή είναι σημαντική επειδή οι μούχλες είτε εμποδίζουν την ανάπτυξη των ζυμών είτε τις σκοτώνουν με αποτέλεσμα να παρεμποδίζουν τις ζυμώσεις. Αυτό εξαρτάται από το επίπεδο τοξικότητας του περιβάλλοντος που θα δημιουργήσουν (Ough, 1992). Η δράση του θειώδους ανυδρίτη σε γλεύκος προερχόμενο από σταφύλια προσβεβλημένα από βοτρυτή, βασίζεται στη δεσμευτική του ικανότητα. Σε μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε μολυσμένο μούστο από τον μύκητα *Botrytis cinerea*, διαπιστώθηκε πως το SO₂ παρουσίασε υψηλές δεσμευτικές τάσεις όταν υπήρχαν υψηλές συγκεντρώσεις ουδέτερων καρβονυλίων και δικαρβονυλικών ενώσεων.

Μια διαφορετική μελέτη έδειξε ότι, όταν η γλυκόζη είναι ο μόνος πρόδρομος του γαλακτικού οξέος, ανακυκλώνεται σε δ-γλυκονολακτόνη και στη συνέχεια δεσμεύεται με το μοριακό SO₂. Γενικότερα, όταν το γλεύκος είναι μολυσμένο από μούχλες, πρέπει να προστεθούν μεγαλύτερες ποσότητες θειώδους ανυδρίτη (Ribéreau – Gayon et al., 2006).

Αντιοξειδωτική δράση

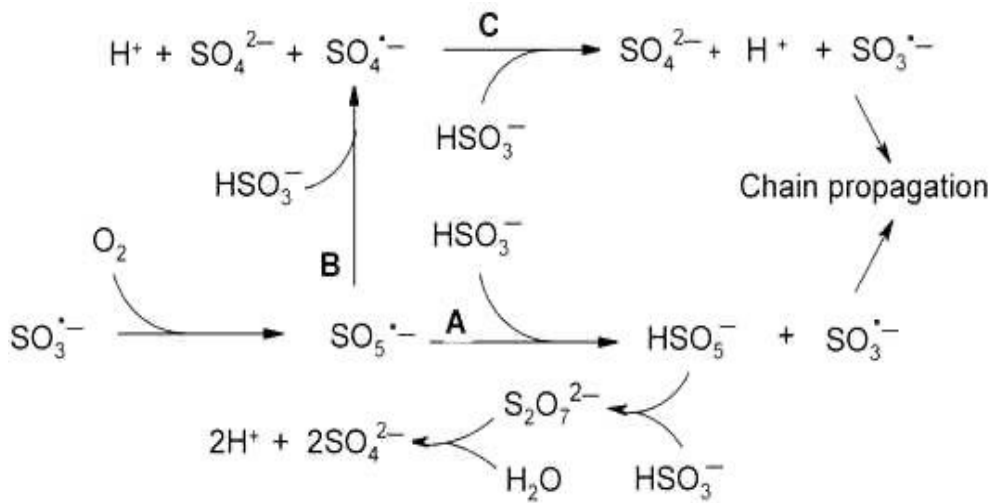
Το θειώδες παρέχει αντιοξειδωτική προστασία με τρεις τρόπους:

- α. με την άμεση δέσμευση του οξυγόνου,
- β. με την αντίδραση του με το υπεροξειδίο του υδρογόνου και
- γ. με την εμπόδιση οξειδώσεων που προκαλούν το σχηματισμό κινόνων (Santos et al., 2012).

α. Η άμεση δέσμευση του διαλυμένου οξυγόνου από το διοξείδιο του θείου περιγράφεται με την ακόλουθη αντίδραση: $2 \text{SO}_2 + \text{O}_2 \rightarrow 2 \text{SO}_3$

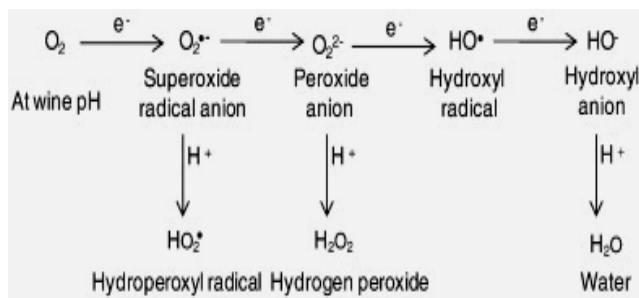
Αυτή η χημική αντίδραση είναι πολύ αργή σε αντίθεση από την ενζυμική οξείδωση. (Ribéreau – Gayon et al., 2006, Ough C.S. and Crowell E.A., 1987). Η οξειδωτική δραστηριότητα του SO₂ περιγράφεται ως ένας κύκλος αναπαραγωγής των θειωδών μορφών (SO₃²⁻). Αρχικά, η θειώδης ρίζα αντιδρά ταχέια με το οξυγόνο και παράγεται υπεροξυμονοθειική ρίζα (Εικόνα 4.11). Η υπεροξυμονοθειική ρίζα, της οποίας η οξειδωτική δράση είναι πολύ πιο μεγάλη από εκείνη του δισθενή σιδήρου, οξειδώνει τα διθειώδη σε δύο κατευθύνσεις, την οδό Α και την οδό Β. Ως αποτέλεσμα προκύπτει η αναγέννηση της θειώδης ρίζας στην οδό Β και ο σχηματισμός των υπεροξυμονοθειικών ιόντων. Τα υπεροξυμονοθειικά ιόντα υδρολύονται αμέσως σε θειικό ιόν

(SO₄²⁻). Ακολουθεί η οξείδωση από τα θειικά στα διθειώδη και επαναλαμβάνεται ο κύκλος της οξείδωσης των θειωδών.



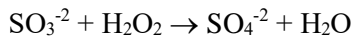
Εικόνα 4.11: Η αλυσίδα οξείδωσης θειωδών (Danilewicz, 2007).

β. Η δεύτερη περίπτωση οξείδωσης είναι της χημικής οξείδωσης, όταν το διαλυμένο οξυγόνο στον οίνο μετατρέπεται σε υπεροξειδίο του υδρογόνου (H₂O₂) (Εικόνα 4.12).



Εικόνα 4.12: Η μετατροπή του οξυγόνου σε υπεροξειδίο του υδρογόνου (Oliveira et al., 2011).

Η χημική οξείδωση αναφέρεται στην οξείδωση των φαινολών που περιέχουν μια κατεχόλη ή μια galloyl ομάδα. Η αναγωγή του οξυγόνου σε υπεροξειδίο του υδρογόνου γίνεται με τη σταδιακή προσθήκη πρωτονίων από μέταλλα, όπως του δισθενή σιδήρου ή του μονοσθενή χαλκού (Oliveira et al., 2011). Το H₂O₂ συμμετέχει στις μετατροπές της αιθανόλης σε ακεταλδεΐδη, και των αλκοολών σε αντίστοιχες αλδεΐδες, και καταλύει την οξείδωση πολυμερισμού των φαινολών ενώσεων. Αυτό το φαινόμενο γίνεται κατά την επεξεργασία και την ωρίμανση του οίνου (Ough and Crowell, 1987, Ribéreau – Gayon et al., 2006). Η οξείδωση των φαινολών από το ελεύθερο οξυγόνο του οίνου παράγει το H₂O₂. Το υπεροξειδίο του υδρογόνου αντιδρά με τα ελεύθερα θειώδη του οίνου, σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση:



Εξαιτίας της πυρηνόφιλης εκτόπισης του νερού από τα όξινα θειώδη ιόντα, αυτά αντιδρούν και σχηματίζουν SO_4^{-2} (Danilewicz, 2007). Δίνεται έμφαση στο γεγονός ότι αυτή η αντίδραση είναι μονόδρομη, δηλαδή μη αντιστρέψιμη, που σημαίνει το τέλος του ελεύθερου διοξειδίου του θείου στον οίνο (Κουράκου-Δραγώνα, 1998).

γ. Η τρίτη περίπτωση οξειδωσης αναφέρεται στις οξειδώσεις που προκαλούν τον σχηματισμό των κινόνων. Σύμφωνα με αυτήν την περίπτωση, τα ένζυμα είναι κυρίως υπεύθυνα για αυτήν την κατηγορία των οξειδώσεων, για αυτό ονομάζονται ενζυματικές οξειδώσεις (Ribéreau – Gayon et al., 2006). Η ενζυματική οξείδωση είναι φαινόμενο που συναντάται σχεδόν εξ' ολοκλήρου στο γλεύκος των σταφυλιών. Το περιεχόμενο του γλεύκους πρέπει να είναι πλούσιο σε μια ομάδα φαινυλοπροπανοειδών αντιοξειδωτικών, τα hydroxycinnamates όπως είναι οι φλαβαν-3-όλες, το p-κουμαρικό τρυγικό οξύ και το καφταρικό οξύ ($\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{O}_9$) (Oliveira et al., 2011). Ωστόσο, συνυπεύθυνοι είναι κι άλλοι καταλύτες, όπως τα μέταλλα τα οποία αναφέρθηκαν πρωτύτερα. Τα μέταλλα συμβάλλουν ως καταλύτες στη μεταφορά ηλεκτρονίων, στις οξειδώσεις των βενζολικών πυρήνων των φαινολικών παραγώγων, προς τον σχηματισμό των κινόνων και των υπεροξειδίων (Κουράκου-Δραγώνα, 1998). Το SO_2 ως αντιοξειδωτικό, δεν ενεργεί όπως ένα οποιοδήποτε άλλο αντιοξειδωτικό, όπως για παράδειγμα το ασκορβικό οξύ. Το SO_2 δρα ανασταλτικά σε ένζυμα που βρίσκονται ήδη μέσα στο γλεύκος των σταφυλιών (Jackson, 2008). Τα ένζυμα, που καταλύουν τις οξειδώσεις του γλεύκους και του οίνου, ονομάζονται οξειδάσες. Οι πολυφαινολοξειδάσες είναι οι κυριότερες οξειδάσες (Κουράκου-Δραγώνα, 1998). Δύο από τα σημαντικότερα ένζυμα που ευθύνονται για αυτές τις οξειδώσεις, πριν από τη ζύμωση, είναι η τυροσινάση (PPO-polyphenoloxidase) και η λακκάση. Η τυροσινάση καταλύει την υδροξυλίωση των μονοφαινολών σε διφαινόλες και την οξείδωση των ορθοφαινόλων (orthophenols) σε κινόνες (Ough and Crowell, 1987). Είναι ένζυμο που παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία στο διοξείδιο του θείου και χαρακτηρίζεται από τη μεγάλη αστάθειά της στις διάφορες τιμές του pH. Η λακκάση είναι ένζυμο που υπάρχει σε γλεύκος που έχει παραχθεί από σταφύλια μολυσμένα από το μύκητα *Botrytis cinerea*. Η λακκάση σε αντίθεση με την τυροσινάση έχει μεγαλύτερο εύρος δράσης, γεγονός που την κάνει πιο επιζήμια. Ο κίνδυνος οξείδωσης από την λακκάση συνεχίζεται και μετά τη μετατροπή του γλεύκους σε οίνο. Αυτή καταλύει την οξείδωση των μονο-, των ορθο-, των παρα- και των μεταφαινολών, τις διανίνες, το ασκορβικό οξύ και την αποικοδόμηση μεγάλων ομάδων φαινολικών ενώσεων που είναι υπεύθυνες για το χρώμα (Romano and Suzzi, 1993, Santos et al, 2012). Μελέτες έχουν δείξει ότι το διοξείδιο του θείου σταματά την ύπαρξη των κινόνων στο διάλυμα, με τη μετατροπή τους σε διφαινόλες. Οι οξειδωτικές αντιδράσεις συμβαίνουν τόσο στους λευκούς οίνους όσο και στους ερυθρούς. Αν και οι ερυθροί οίνοι έχουν πλούσιο υπόστρωμα οξείδωσης, τις φαινόλες, έχει αποδειχτεί ότι ιδιαίτερα ευαίσθητοι είναι οι λευκοί. Επομένως, η

συμβολή του θειώδους ανυδρίτη είναι καθοριστική αφού εμπλέκεται με προδρόμους που προκαλούν τις οξειδωτικές αντιδράσεις, είτε με την εμπόδιση της αντίδραση τους με το οξυγόνο, είτε με τη αντιστρεψιμότητα της επίδρασης του οξυγόνου (Henderson, 2009, Jackson, 2008).

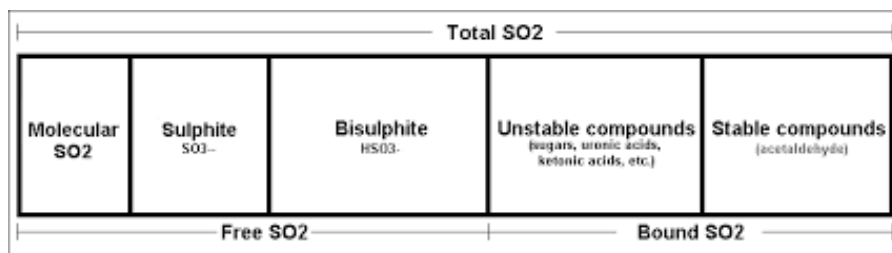
4.2.2 Οι μορφές του θειώδους

Ο θειώδης ανυδρίτης σε διαλύματα βρίσκεται στις βασικές δύο μορφές: τη μοριακή και τις ιονισμένες. Στον οίνο ένα μέρος του θειώδους αντιδρά με διάφορες ενώσεις και έτσι προκύπτει:

- α) το κλάσμα που παραμένει στη μοριακή μορφή (SO_2),
- β) το κλάσμα όπου δεν υπάρχει πουθενά μοριακός θειώδης γιατί έχει εξουδετερωθεί,
- γ) το κλάσμα που είναι ενωμένος ασταθώς, π.χ. με σάκχαρα, ανθοκυάνες και
- δ) το κλάσμα όπου βρίσκεται ενωμένος μη αντιστρεπτά, π.χ. με την ακεταλδεΐδη.

Όταν προστεθεί θειώδης ανυδρίτης στο γλεύκος ή τον οίνο, με την πάροδο του χρόνου αποκαθίσταται μια ισορροπία μεταξύ των διαφόρων μορφών, των οποίων οι συγκεντρώσεις καθώς και η δραστηκότητά εξαρτώνται κυρίως από το pH και τη θερμοκρασία. Η σχέση είναι αντιστρεπτά ίση. Όταν η θερμοκρασία αυξάνεται, η συγκέντρωση του ανυδρίτη μειώνεται. Όλες οι μορφές του σε ισορροπία είναι γνωστές σαν "ελεύθερος" θειώδης ανυδρίτης. Σε τιμές pH 3,0 - 4,0 (pH οίνου) η δραστική μορφή, που είναι η μοριακή, αντιπροσωπεύει πολύ μικρό ποσοστό. Το σύνολο του "ελεύθερου" και του "δεσμευμένου" θειώδους δίνει το "ολικό" θειώδες που έχει προστεθεί σε γλεύκος και οίνο. Οι περισσότερες ιδιότητες που αποδίδονται στο θειώδη ανυδρίτη οφείλονται στον ελεύθερο θειώδη. Ο ενωμένος είναι ανενεργός και δεν έχει καμία από τις πολύτιμες ιδιότητες του ελεύθερου, για αυτό θεωρείται "παθητικός". Αυξάνει τον ολικό θειώδη ανυδρίτη χωρίς να δρα. Οι ασταθείς ενώσεις του θειώδη ανυδρίτη είναι και αυτές χρήσιμες, γιατί αποθηκεύουν τον θειώδη που τον αποδίδουν όταν επέρχεται μείωση του ελεύθερου θειώδους στους οίνους, κυρίως λόγω οξείδωσης.

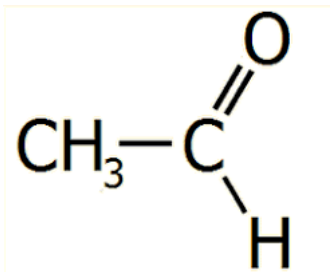
Στο pH του οίνου (3-4) το θειώδες αποτελείται από διθειώδες (HSO_3^-), και μικρές ποσότητες ιόντων (SO_3^{2-}) και μοριακού θειώδους (SO_2). Το διθειώδες μπορεί να σχηματίσει σύμπλοκα με διάφορες ενώσεις (Shao-Quan Liu και Gordon J. Pilone 1998).



Εικόνα 4.13: Οι μορφές του θειώδους στον οίνο.

4.2.3. Ενώσεις που δεσμεύουν το Θειώδες

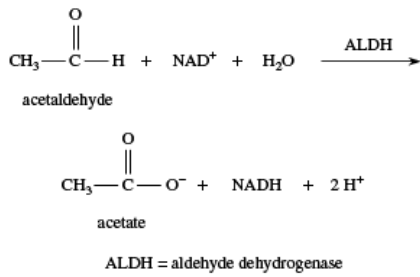
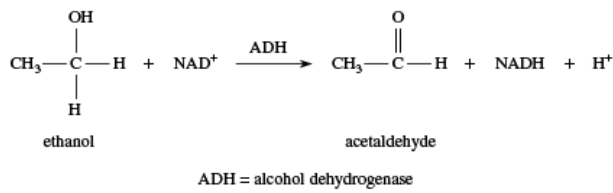
Ακεταλδεΐδη



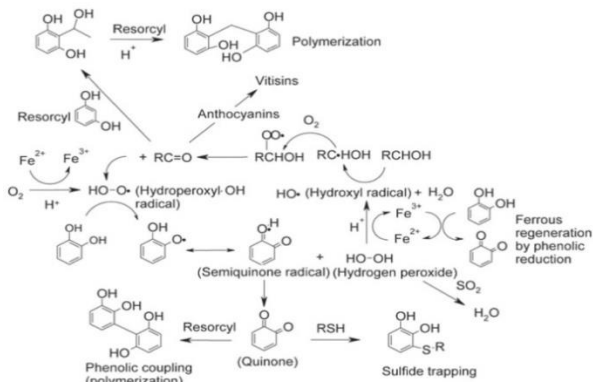
Εικόνα 4.14: Η δομή της ακεταλδεΐδης.

Η ακεταλδεΐδη ή αιθανάλη (εικόνα 4.14) είναι η απλούστερη αλδεΐδη μετά το πρώτο μέλος της ομόλογης σειράς, τη φορμαλδεΐδη, HCHO. Πρόκειται για ένα εξαιρετικά πτητικό υγρό (σ.ζ. 20,2°C) με δριμεία, ερεθιστική οσμή και δακρυγόνες ιδιότητες. Ωστόσο, η ακεταλδεΐδη σε πολύ αραιές συγκεντρώσεις στην ατμόσφαιρα έχει μια φρουτώδη και όχι δυσάρεστη οσμή, που θυμίζει "χτυπημένο" μήλο (http://195.134.76.37/chemicals/chem_acetaldehyde.htm). Στον οίνο παράγεται είτε από τις ζύμες, είτε από τα οξικά βακτήρια από την οξείδωση της αιθανόλης (εικόνα 4.15). Επίσης, μπορεί να παραχθεί από την οξείδωση φαινολικών ενώσεων (εικόνα 4.16), καθώς το υπεροξειδίο του υδρογόνου που παράγεται μπορεί να οξειδώσει την αιθανόλη σε ακεταλδεΐδη (C Coetzee, A Buica et al 2018). Κατά μέσο όρο στους ερυθρούς οίνους βρίσκεται σε ποσότητα περίπου 30 mg/L, στους λευκούς σε 80 mg/L και στους οίνους Sherry στα 300 mg/L (Shao-Quan Liu και Gordon J. Pilone 1998). Σε χαμηλές συγκεντρώσεις προσδίδει στον οίνο ένα ευχάριστο φρουτένιο άρωμα το οποίο γίνεται δυσάρεστο αν αυξηθεί πολύ η συγκέντρωσή της. Το οξυγόνο και το θειώδες μπορούν να επηρεάσουν την ποσότητα ακεταλδεΐδης που σχηματίζεται από τις ζύμες, ενώ οι οίνοι στους οποίους η ζύμωση έχει γίνει παρουσία θειώδους φαίνεται να έχουν μεγαλύτερες ποσότητες ακεταλδεΐδης (Shao-Quan Liu και Gordon J. Pilone 1998). Η ένωση της ακεταλδεΐδης με το θειώδες αποτελεί το 75% του δεσμευμένου θειώδους στους λευκούς οίνους και το 50% στους ερυθρούς (<https://www.lallemandwine.com/wp-content/uploads/2014/09/WE5-CHINA.pdf>). Η αντίδραση (εικόνα 4.17) είναι πολύ γρήγορη αφού σε pH 3,3 το 98% της ακεταλδεΐδης θα έχει ενωθεί με το διθειώδες μέσα σε 90 λεπτά. Σε συγκέντρωση 30 mg/L ελεύθερου θειώδους μόνο το 0,04% της ακεταλδεΐδης θα παραμείνει ελεύθερο (S. Afr. J. Enol. Vitic. 2018). Λόγω της μικρής σταθεράς διάστασης της ακεταλδεΐδης ($0,0024 \times 10^{-3}$), η δέσμευσή της από το διθειώδες είναι μη αντιστρεπτή και το προϊόν που παράγεται είναι πολύ σταθερό. Αυτή η δέσμευση μειώνει το διαθέσιμο ελεύθερο θειώδες με αποτέλεσμα να ελαττώνεται η αντιμικροβιακή του δράση.

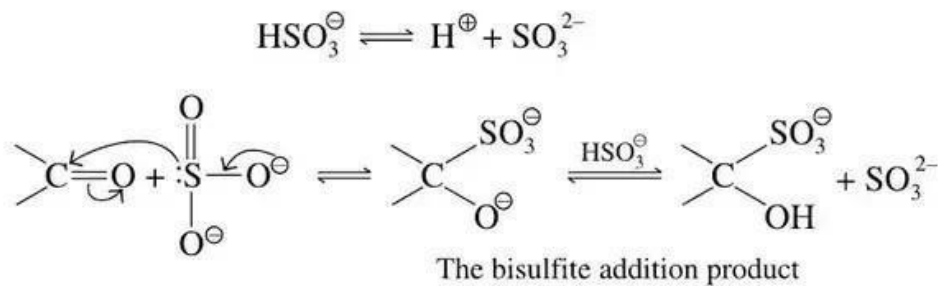
Ωστόσο, η δέσμευση της ακεταλδεΐδης μπορεί να συμβάλει στην προστασία και βελτίωση του αρώματος και της γεύσης του οίνου (Shao-Quan Liu και Gordon J. Pilone 1998).



Εικόνα 4.15: Η οξείδωση της αιθανόλης.



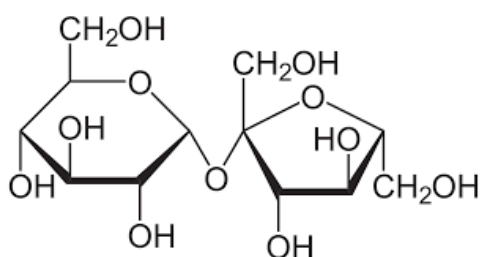
Εικόνα 4.16: Η οξείδωση των φαινολικών ενώσεων στον οίνο.



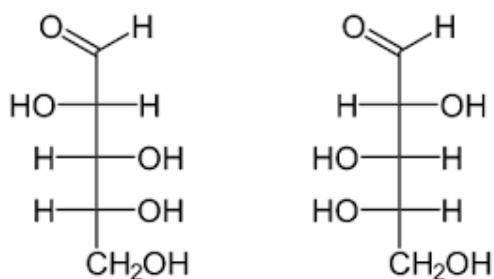
Εικόνα 4.17: Η αντίδραση της ακεταλδεΐδης με το διθειώδες.

Σάκχαρα

Τα σάκχαρα λόγω των αλδευδομάδων και των κετονομάδων μπορούν να δεσμεύσουν το θειώδες. Από αυτά, η αραβινόζη (εικόνα 4.19) και η γλυκόζη (εικόνα 4.21) έχουν πολύ μικρή δεσμευτική ικανότητα όπως και η μαλτόζη (εικόνα 4.20), ενώ η σακχαρόζη (εικόνα 4.18) και η λακτόζη (εικόνα 4.22) δεν μπορούν να αντιδράσουν με το θειώδες στην πράξη. Ωστόσο κάποιες άλλες ενώσεις όπως η κετο-5-φρουκτόζη, η ξυλόζη, το κετο-2-γλυκονικό και δικέτο-2,5-γλυκονικό οξύ προκαλούν αύξηση της δέσμευσης του θειώδους. Κατά μέσο όρο 1gr γλυκόζης δεσμεύει 0,3mgr θειώδη ενώ 1gr αραβινόζης 8mg θειώδη. Η σταθερά δέσμευσης K είναι αρκετά μεγάλη, για αυτό και η αντίδραση με το θειώδες είναι αμφίδρομη ενώ τα προϊόντα που σχηματίζονται είναι ασταθή (J.B.S. Braverman).



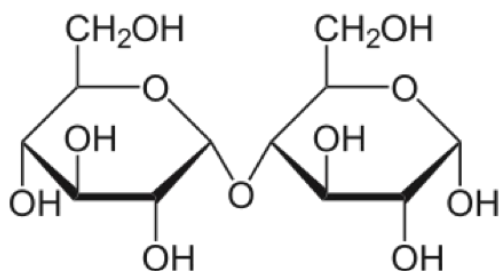
Εικόνα 4.18: Η δομή της σακχαρόζης.



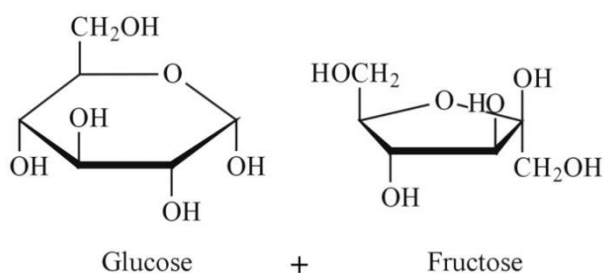
D-Arabinose

L-Arabinose

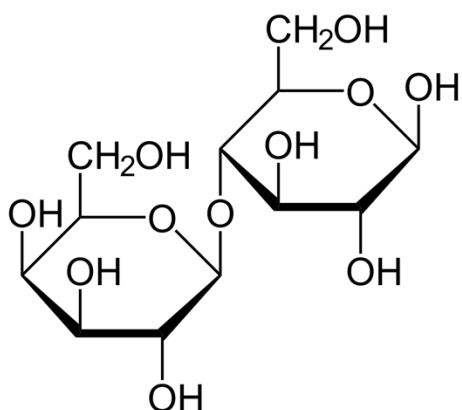
Εικόνα 4.19: Η δομή της αραβινόζης.



Εικόνα 4.20: Η δομή της μαλτόζης.



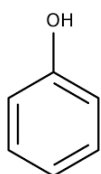
Εικόνα 4.21: Η δομή της γλυκόζης και της φρουκτόζης.



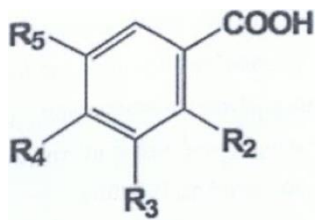
Εικόνα 4.22: Η δομή της λακτόζης.

Φαινολικά συστατικά

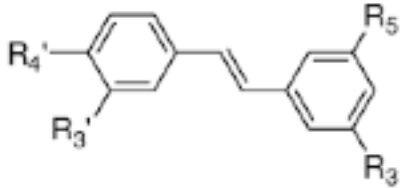
Φαινολικές ενώσεις είναι οι ενώσεις που περιέχουν τη χαρακτηριστική ομάδα της φαινόλης σε αρωματικό βενζολικό δακτύλιο (εικόνα 4.23). Απλές φαινόλες ονομάζονται οι χημικές ενώσεις που περιλαμβάνουν έναν αρωματικό δακτύλιο με ένα ή περισσότερα υδροξύλια ως υποκαταστάτες, ενώ πολυφαινόλες ονομάζονται οι ενώσεις που περιλαμβάνουν πολλαπλούς φαινολικούς δακτυλίους στη δομή τους. Στον οίνο συναντάμε δύο κατηγορίες: τις μη φλαβονοειδείς φαινόλες, που περιλαμβάνουν τα φαινολικά οξέα (εικόνα 4.24) και τα στυλβένια (εικόνα 4.25), και τις φλαβονοειδείς φαινόλες, που περιλαμβάνουν τις φλαβονόλες (εικόνα 4.26), τις φλαβόνες (εικόνα 4.27), τις φλαβανόνες, τις ανθοκυάνες (εικόνα 4.28) και τις κατεχίνες (εικόνα 4.29).



Εικόνα 4.23: Η χαρακτηριστική ομάδα των φαινολικών ενώσεων.

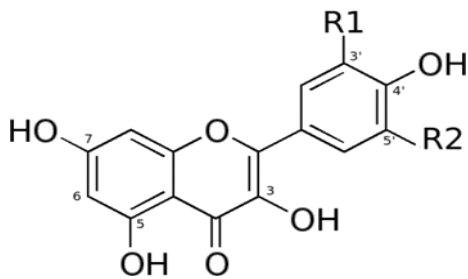


Εικόνα 4.24: Η δομή του βενζοϊκού οξέος.

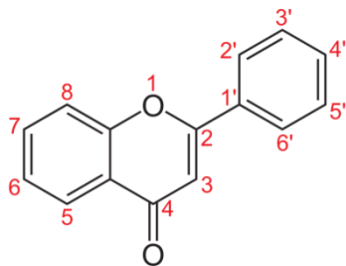


Resveratrol: $R_4' = \text{OH}$, $R_3' = \text{H}$, $R_3 = R_5 = \text{OH}$
Piceatannol: $R_3' = R_4' = R_3 = R_5 = \text{OH}$
Pinosylvin: $R_3 = R_5 = \text{OH}$

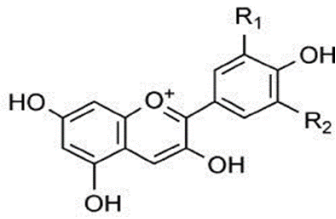
Εικόνα 4.25: Η δομή των στιλβενίων.



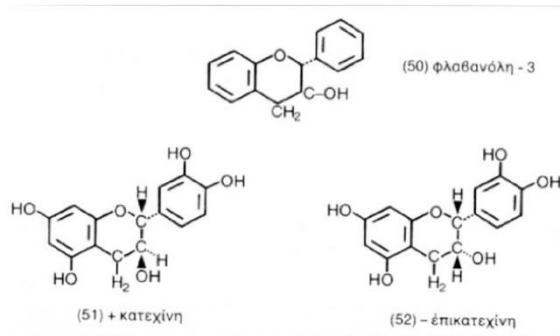
Εικόνα 4.26: Η δομή της φλαβονόλης.



Εικόνα 4.27: Η δομή της φλαβόνης.

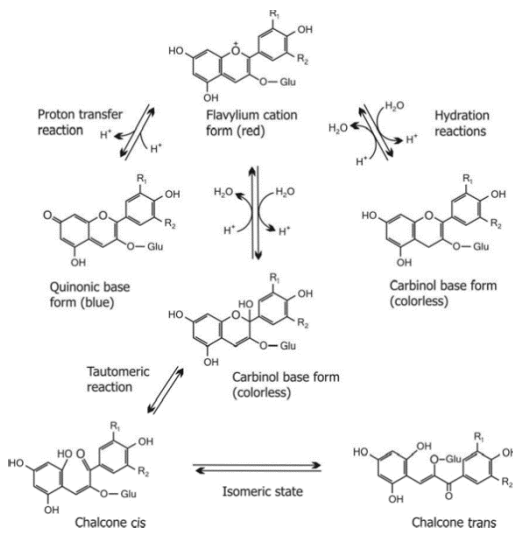


Εικόνα 4.28: Η δομή των ανθοκυανών.

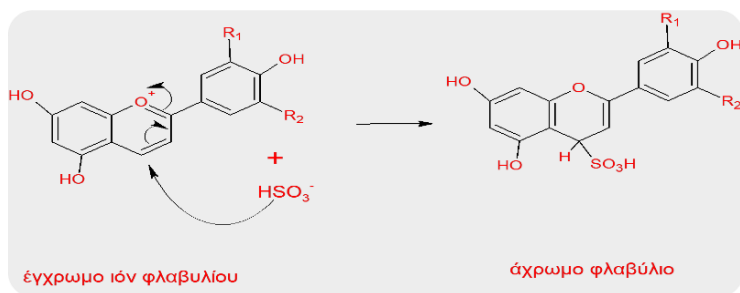


Εικόνα 4.29: Η δομή των κατεχινών.

Οι ανθοκυάνες σε υδατικό διάλυμα βρίσκονται σε τέσσερις διαφορετικές μορφές ανάλογα με το pH (εικόνα 4.30), ενώ στον οίνο υπάρχει ισορροπία μεταξύ τους (Α. Σεχάντε και Β. Νικολού 2021). Οι ελεύθερες ανθοκυάνες μπορούν να δεσμεύσουν το θειώδες (1g/L ανθοκυανών δεσμεύει 20 mg/L θειώδους), και το αποτέλεσμα γίνεται αντιληπτό από τον αποχρωματισμό των ερυθρών νέων οίνων λόγω καταστροφής της συζυγίας των απλών - διπλών δεσμών του μορίου τους (εικόνα 4.31) (Β. Νικολού).



Εικόνα 4.30: Οι διάφορες μορφές των ανθοκυανών ανάλογα με το pH.



Εικόνα 4.31: Η αντίδραση μεταξύ φλαβυλίου και θειώδους.

4.3 Ο ρόλος του Θειώδους στην Οινοποίηση

4.3.1 Ο σχηματισμός θειώδους από τις ζύμες

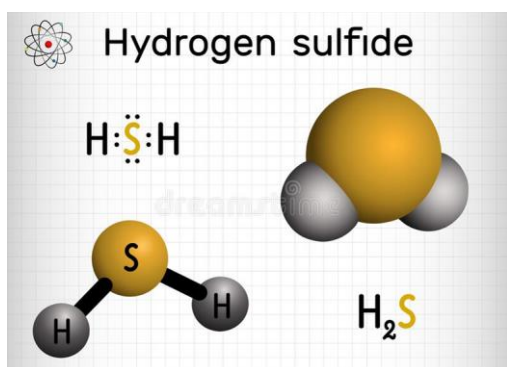
Τα στελέχη του *S. cerevisiae* παράγουν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης μία μικρή ποσότητα SO₂, συνήθως 10-30 mg/L. Κάποια στελέχη, οι λεγόμενες «ζύμες-παραγωγοί θειώδους», είναι σε θέση να παράγουν θειώδες σε μεγαλύτερες ποσότητες που υπερβαίνουν ακόμη και τα 100 mg/L. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι οίνοι να περιέχουν ποσότητα θειώδους μεγαλύτερη από την επιτρεπόμενη. Το φαινόμενο αυτό, μάλλον, οφείλεται στο γεγονός ότι παρατηρείται μη φυσιολογική αλλαγή της δραστηριότητας ορισμένων ενζύμων που παίρνουν μέρος στην αναγωγική διαδικασία των θειϊκών ανιόντων. Επίσης, στελέχη με μεγάλη παραγωγή θειώδους απορροφούν πολύ μεγαλύτερη ποσότητα θειϊκών ανιόντων από το υπόστρωμα. Τα στελέχη αυτά δείχνουν μικρή ζυμωτική ικανότητα, γεγονός που πιθανώς να οφείλεται στην αρνητική επίδραση του θειώδους στις μεταβολικές διαδικασίες του κυττάρου. Ο σχηματισμός μεγάλης ποσότητας θειώδους, ανήκει στα αρνητικά ζυμωτικά χαρακτηριστικά ενός στελέχους *S. cerevisiae* και είναι ένα πιθανό ενδεχόμενο σε μία αυθόρμητη ζύμωση. Ο καλύτερος τρόπος για να αποφευχθεί ένα τέτοιο ενδεχόμενο, είναι ο εμβολιασμός του γλεύκους με ένα επιλεγμένο στέλεχος ζύμης (Α. Καψοπούλου, Λογοθέτης).

4.3.2 Ο σχηματισμός υδρόθειου

Το υδρόθειο (εικόνα 4.32) σχηματίζεται σε μικρές ποσότητες κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης ως ενδιάμεσο προϊόν κατά τη βιοσύνθεση των θειούχων αμινοξέων. Το κατώφλι αντίληψης, κυμαίνεται μεταξύ 50 και 80 μg/L. Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις προκαλεί τη γνωστή δυσάρεστη οσμή του κλούβιου αυγού (Α. Καψοπούλου).

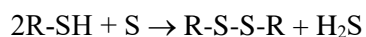
Ο σχηματισμός του εξαρτάται κατά κύριο λόγο από το στέλεχος του *S. cerevisiae*. Υπάρχουν στελέχη που παράγουν πάνω από 1 mg/L υδρόθειο. Η αυξημένη παραγωγή εξαρτάται και από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η σύσταση του γλεύκους και οι συνθήκες ζύμωσης. Αυξημένη παραγωγή έχει παρατηρηθεί σε υψηλές τιμές pH και σε υψηλές θερμοκρασίες. Η ζύμωση σε δεξαμενές μεγάλο όγκου που επιτρέπουν την μεγαλύτερη άνοδο της θερμοκρασίας

και επομένως την πιο έντονη και γρήγορη ζύμωση, μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη παραγωγή υδρόθειου. Η έλλειψη αφομοιώσιμου αζώτου υπό την μορφή αμμωνιακών αλάτων, είναι μια σοβαρή αιτία αυξημένης παραγωγής υδρόθειου από τις ζύμες, οι οποίες για να εκμεταλλευθούν το άζωτο των πρωτεϊνών παράγουν ενδοκυτταρικά πρωτεολυτικά ένζυμα, τα οποία υδρολύουν τις πρωτεΐνες του γλεύκους και έτσι παράγεται περισσότερο υδρόθειο από τα θειούχα αμινοξέα που ελευθερώνονται. Η προσθήκη αμμωνιακών αλάτων στο γλεύκος για την εξασφάλιση μίας επαρκούς πηγής αζώτου περιορίζει τον σχηματισμό υδροθείου. Η περιεκτικότητα του γλεύκους σε στερεό υπόλειμμα των σταφυλιών αυξάνει την ποσότητα του υδρόθειου λόγω της εκμετάλλευσης των πρωτεϊνών που περιέχονται σε αυτά. Το θειώδες που προστίθεται στο γλεύκος αποτελεί μία ακόμη πηγή για την αυξημένη παραγωγή υδροθείου καθώς επίσης και το μοριακό θείο που χρησιμοποιείται στο θειάφισμα των αμπελιών για την καταπολέμηση των παρασίτων (Λογοθέτης, Α. Καψοπούλου).

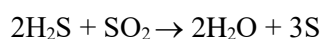


Εικόνα 4.32: Το υδρόθειο.

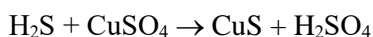
Το μοριακό θείο αντιδρά με θειούχες ενώσεις σε μη ενζυμικές αντιδράσεις και παράγει υδρόθειο σύμφωνα με την αντίδραση:



Το φαινόμενο αυτό είναι πιο έντονο σε γλεύκη που δεν έχουν διαυγαστεί. Σε κανονικές συνθήκες το υδρόθειο μπορεί να απομακρυνθεί μαζί με το διοξείδιο του άνθρακα σε μεγάλο ποσοστό, ενώ και ο αερισμός είναι βοηθητικός αλλά υπάρχει ο κίνδυνος οξειδωσης. Η μείωση του υδρόθειου με θείωση βασίζεται στην αντίδραση:



Η διαύγηση του γλεύκους, η χαμηλή θείωση, η προσθήκη αμμωνιακών αλάτων και το ράντισμα του αμπελιού με θειικό χαλκό αποτελούν ανασταλτικά μέτρα της παραγωγής υδρόθειου. Ο θειικός χαλκός αντιδρά στο γλεύκος με το υδρόθειο και σχηματίζεται θειούχος χαλκός σύμφωνα με την αντίδραση:



ο οποίος είναι αδιάλυτος και μπορεί να απομακρυνθεί αργότερα με τις οινολάσπες. Ένας επιπλέον τρόπος απομάκρυνσης του υδρόθειου είναι η προσθήκη θειικού χαλκού στον οίνο έως 20 mg/L, ώστε η περιεκτικότητα σε Cu να μην υπερβαίνει το 1mg/L (Α. Καψοπούλου).

4.3.3 Πλεονεκτήματα-Μειονεκτήματα Θειώδους στην Οινοποίηση

Παρά τα πλεονεκτήματα που έχει η χρήση θειώδους στους οίνους, λόγω των ευεργετικών ιδιοτήτων του που προαναφέρθηκαν στο κεφάλαιο 4.2.1, έχει και κάποια μειονεκτήματα. Όταν χρησιμοποιείται σε μεγάλες συγκεντρώσεις δίνει στον οίνο μια δυσάρεστη οσμή και γεύση. Αυτή η χαρακτηριστική γεύση λόγω θειώδους μπορεί να προκύψει και από εκτεταμένη παραμονή του οίνου με τις οινολάσπες. Ένα σοβαρό πρόβλημα που μπορεί επίσης να δημιουργηθεί από λανθασμένη θείωση, είναι η επιβράδυνση ή οριστική διακοπή της μηλογαλακτικής ζύμωσης των ερυθρών οίνων. Παράλληλα, είχε παρατηρηθεί ότι θειωμένα γλεύκη οδηγούν σε οίνους με μεγάλη οξύτητα (Pascal Ribereau-Gayon et al 2006). Φυσικά, δεν παραλείπεται το γεγονός της καθυστέρησης και της ίδιας της αλκοολικής ζύμωσης, λόγω της αδρανοποίησης των ζυμών από τη μεγάλη ποσότητα του θειώδους. Πολλές φορές εξαιτίας της υπέρμετρης θείωσης στην οινοποίηση, παράγεται ακεταλδεύδη σε υψηλές συγκεντρώσεις. Αυτό έχει αρνητικό επακόλουθο στην διαχείριση της σχέσης του ελεύθερου και ολικού θειώδους και στα μετέπειτα βήματα προκειμένου να περιοριστεί η συγκέντρωση της ακεταλδεύδης. Πέραν των παραπάνω, ένα ακόμη μειονέκτημα είναι η ελάττωση της χρωματικής έντασης και η αύξηση της χρωματικής απόχρωσης των νέων κυρίως ερυθρών οίνων. Τέλος, ένα ακόμη χαρακτηριστικό των υπερθειωμένων οίνων είναι η δεικτική οσμή και μεταλλική γεύση.

5. Μέθοδοι προσδιορισμού Θειώδους

5.1 Μέθοδοι προσδιορισμού Ελεύθερου και Δεσμευμένου θειώδους σύμφωνα με τον OIV- Συνήθης Μέθοδος

Όργανα

Ογκομετρικές φιάλες με εσφυρισμένο πάμα των 250 ml.

Κωνικές φιάλες των 250 ml.

Σιφόνια των 2, 10, 20 και 50 ml.

Προχοΐδα 20 ή 50 ml.

Αντιδραστήρια

Διάλυμα H_2SO_4 10 %.

Διάλυμα NaOH 4 M.

Διάλυμα αμύλου 2,5 ‰ που περιέχει NaCl 20%.

Διάλυμα I_2 N/50 (N : 0,02).

Διάλυμα ακεταλδεύδης 7,0‰.

EDTA.

Ελεύθερο θειώδες

Το ελεύθερο θειώδες προσδιορίζεται με ιωδιομετρική ογκομέτρηση, παρουσία δείκτη αμύλου και βασίζεται στην παρακάτω αντίδραση οξειδοαναγωγής $H_2SO_3 + I_2 \rightarrow H_2SO_4 + 2HI$. Πριν την ογκομέτρηση το δείγμα του οίνου πρέπει να οξινισθεί με 10 % H_2SO_4 για να μην οξειδωθούν από το ιώδιο οι πολυφαινόλες του οίνου. Ωστόσο, ένα μέρος του ιωδίου δεσμεύεται από τις πολυφαινόλες και τις ανθοκυάνες και για αυτόν τον λόγο γίνεται και ένας λευκός προσδιορισμός.

Πείραμα

Σε κωνική φιάλη των 250 ml μεταφέρεται με σιφόνιο 50 ml οίνου.

Προστίθενται 3 ml διαλύματος H_2SO_4 10%, 3 ml διαλύματος αμύλου και περίπου 30 mg EDTA.

Ακολουθεί άμεσα τιτλοδότηση με διάλυμα ιωδίου N/50 μέχρι να εμφανιστεί κυανό χρώμα το οποίο θα μένει σταθερό για τουλάχιστον 10 δευτερόλεπτα. Έστω n_0 η κατανάλωση του ιωδίου σε ml.

Για τον λευκό προσδιορισμό:

Σε ογκομετρική φιάλη των 250 ml μεταφέρεται με σιφόνιο 50 ml του ίδιου οίνου και προστίθενται 5 ml διαλύματος ακεταλδεύδης 7‰ w/v, πωματίζεται και αφήνεται σε ηρεμία για τουλάχιστον 30 λεπτά.

Προστίθενται 3 ml διαλύματος H_2SO_4 10% και 3 ml διαλύματος αμύλου.

Ακολουθεί άμεσα τιτλοδότηση με διάλυμα ιωδίου N/50 μέχρι να εμφανιστεί κυανό χρώμα το οποίο θα μένει σταθερό για τουλάχιστον 10 δευτερόλεπτα. Έστω n'' η κατανάλωση του ιωδίου σε ml.

Η διορθωμένη κατανάλωση του ιωδίου (n_1) για το ελεύθερο θειώδες δίνεται από τον τύπο:

$$n_1 = (n_0 - n'') \text{ ml}$$

Δεσμευμένο θειώδες

Το δεσμευμένο θειώδες προσδιορίζεται με ιωδιομετρική ογκομέτρηση παρουσία δείκτη αμύλου, αφού έχει προηγηθεί οξύνιση του οίνου όπως και στο ελεύθερο θειώδες, με την

διαφορά ότι απαιτείται προηγουμένως αλκαλική υδρόλυση με διάλυμα NaOH 4M των σουλφονικών παραγώγων.

Πείραμα

Στον οίνο από την προηγούμενη διαδικασία προστίθενται 8 ml διαλύματος NaOH 4M, αναδεύεται μία φορά και αφήνεται σε ηρεμία για 5 λεπτά.

Προστίθενται 10 ml διαλύματος H₂SO₄ 10%.

Ακολουθεί άμεσα τιτλοδότηση με διάλυμα ιωδίου N/50 μέχρι να εμφανιστεί κυανό χρώμα το οποίο θα μένει σταθερό για τουλάχιστον 10 δευτερόλεπτα. Έστω n₂ η κατανάλωση του ιωδίου σε ml.

Στο ίδιο δείγμα προστίθενται ξανά 20 ml διαλύματος NaOH 4M, αναδεύεται μία φορά και αφήνεται σε ηρεμία για 5 λεπτά.

Προστίθενται 30 ml διαλύματος H₂SO₄

Ακολουθεί άμεσα τιτλοδότηση με διάλυμα ιωδίου N/50 μέχρι να εμφανιστεί κυανό χρώμα το οποίο θα μένει σταθερό για τουλάχιστον 10 δευτερόλεπτα. Έστω n₃ η κατανάλωση του ιωδίου σε ml.

Υπολογισμοί

Γενικός τύπος: θειώδες οξύ (mg/L) = $(n \times N \times 32 \times 100) / V$

Όπου n: Ο όγκος διαλύματος ιωδίου που καταναλώθηκε για τον προσδιορισμό σε ml.

N: Η κανονικότητα του διαλύματος ιωδίου.

V: Ο όγκος του οίνου που χρησιμοποιήθηκε στον προσδιορισμό.

Για το δείγμα ισχύει:

Ελεύθερο θειώδες = $n_1 \times 12,8 \text{ mg/L}$

Δεσμευμένο θειώδες = $(n_2 + n_3) \times 12,8 \text{ mg/L}$

Ολικό θειώδες = $(n_1 + n_2 + n_3) \times 12,8 \text{ mg/L}$

Παρατηρήσεις

Στους ερυθρούς οίνους η χρωματική μεταβολή είναι δύσκολη για αυτό απαιτείται ευρύλαιμη κωνική φιάλη και υποβοήθηση με κίτρινο φωτισμό.

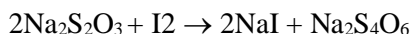
Σε περίπτωση που ξεπεραστεί το ισοδύναμο σημείο, μπορεί να χρησιμοποιηθεί διάλυμα θειοθειϊκού νατρίου (Na₂S₂O₃) N/100 για επαναφορά ή διόρθωση.

Η κατανάλωση του λευκού προσδιορισμού είναι γενικά μικρή (0,2 -0,3 ml ιωδίου). Όμως σε περίπτωση που στον οίνο έχει πρόσφατα προστεθεί ασκορβικό οξύ η κατανάλωση αυξάνεται σημαντικά (1 ml ιωδίου N/20 οξειδώνει 4,4 mg ασκορβικού οξέος).

Η διατήρηση των δειγμάτων που πρόκειται να εξεταστούν για το ελεύθερο θειώδες πρέπει να είναι στους 20 °C και να μην ξεπερνά τις 4 ημέρες.

Το διάλυμα ιωδίου με το οποίο προσδιορίζεται ο θειώδης ανυδρίτης, πρέπει να ελέγχεται σε τακτά χρονικά διαστήματα σχετικά με την κανονικότητά του. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιούμε ένα πρότυπο διάλυμα θειοθειικού νατρίου 0,1 N. Με σιφόνιο μεταφέρονται 10 ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 N σε κωνική φιάλη των 250ml, προστίθενται μερικές σταγόνες δείκτη αμύλου 1% και τιτλοδοτείται με το διάλυμα του ιωδίου.

Η αντίδραση του θειοθειικού νατρίου με το ιώδιο φαίνεται παρακάτω:



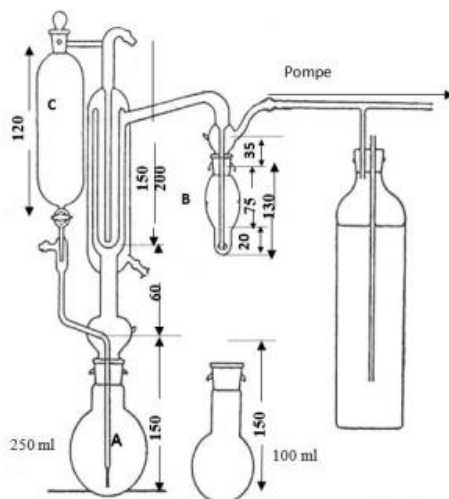
Όταν η περιεκτικότητα του θειώδους οξέος στους οίνους είναι παραπλήσια ή υπερβαίνει τα ανώτατα επιτρεπόμενα όρια, ο προσδιορισμός πρέπει να γίνεται με τη μέθοδο αναφοράς και πρέπει να γίνεται και προσδιορισμός των θειικών αλάτων.

5.2 Μέθοδοι προσδιορισμού Ελεύθερου και Δεσμευμένου θειώδους σύμφωνα με τον ΟΙV- Μέθοδος Αναφοράς

Όργανα

Συσκευή με ψυκτήρα (Εικόνα 5.1) ο οποίος αποτελείται από 4 ομόκεντρους σωλήνες με εσωτερικές διαμέτρους 45,34 27 και 10 mm.

Μετρητής παροχής αερίου έτσι ώστε να ελέγχεται και να ρυθμίζεται η υποπίεση που δημιουργείται από την αντλία νερού.



Εικόνα 5.1: Η συσκευή με ψυκτήρα.

Αντιδραστήρια

Φωσφορικό οξύ (H_3PO_4) 85% ($d_{20}=1,71 \text{ g/ml}$).

Διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) περιεκτικότητας 9,1 g/L.

Δείκτης: ερυθρό του μεθυλίου 100mg, κυανό του μεθυλενίου 50mg, αλκοόλη 50% 100ml.

Διάλυμα καυστικού νατρίου (NaOH) 0,01 M.

Ελεύθερο θειώδες

Το θειώδες παρασύρεται με ρεύμα αέρα ή αζώτου και διοχετεύεται σε αραιό και ουδέτερο διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου, όπου δεσμεύεται και οξειδώνεται σε θειικό οξύ. Το σχηματιζόμενο θειικό οξύ προσδιορίζεται με τιτροδοτημένο διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου. Το ελεύθερο θειώδες παρασύρεται με διοχέτευση αέρα αζώτου εν ψυχρώ.

Πείραμα

Ο οίνος πριν τον προσδιορισμό πρέπει να διατηρηθεί σε γεμάτη και πωματισμένη φιάλη για 2 ημέρες.

Στη φιάλη Β φέρονται 2 έως 3 ml διαλύματος H_2O_2 , δύο σταγόνες δείκτη και το διάλυμα του H_2O_2 εξουδετερώνεται από το διάλυμα NaOH 0,01M. Έπειτα η φιάλη Β προσαρμόζεται στη συσκευή.

Στη φιάλη Α χωρητικότητας 250ml που αποτελεί τμήμα της συσκευής, φέρονται 50 ml οίνου και 15 ml διαλύματος H_3PO_4 και προσαρμόζεται στη συσκευή.

Διοχετεύεται αέρας ή άζωτο για 15 λεπτά.

Η φιάλη Β αποσυνδέεται από τη συσκευή και το οξύ που έχει σχηματιστεί ογκομετρείται με διάλυμα NaOH 0.01M. Έστω κ τα ml που καταναλώθηκαν.

Σημείωση: Για περιεκτικότητα ολικού θειώδους οξέος < 50mg/L στη φιάλη Α των 250 ml φέρονται 50 ml δείγματος και 15 ml διαλύματος H_3PO_4 . Για περιεκτικότητα ολικού θειώδους οξέος > 50mg/L στη φιάλη Α των 100 ml φέρονται 20 ml δείγματος και 5 ml διαλύματος H_3PO_4 .

Δεσμευμένο θειώδες

Εάν η παραπάνω διαδικασία γίνει σε θερμοκρασία 100 °C τότε αποδεσμεύεται το θειώδες από τις ενώσεις του, παρασύρεται και διοχετεύεται σε αραιό και ουδέτερο διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου, όπου δεσμεύεται και οξειδώνεται σε θειικό οξύ.

Πείραμα

Για τον προσδιορισμό του ολικού θειώδους οξέος ακολουθείται η ίδια διαδικασία με τη διαφορά ότι η φιάλη Α θερμαίνεται με τρόπο ώστε να αποφεύγεται η πυρόλυση. Ο βρασμός διαρκεί όση ώρα διαβιβάζεται το αέριο ρεύμα. Έστω κ' τα ml NaOH που καταναλώθηκαν.

Υπολογισμοί

Ολικό θειώδες οξύ σε mg/L:

Δείγματα οίνου 50 ml : $6,4 \times \kappa$ mg/L

Δείγματα οίνου 20 ml : $16 \times \kappa'$ mg/L

6. Πρακτικές συνέπειες της παρουσίας του Θειώδους στον Οίνο

6.1 Επίδραση pH-Θερμοκρασίας-Αλκοολικού τίτλου (vol %)

Το θειώδες στον οίνο εξαρτάται και επηρεάζεται άμεσα από το pH, την θερμοκρασία και τον αλκοολικό τίτλο του οίνου. Η αύξηση της θερμοκρασίας προκαλεί μεγάλη αύξηση στο ποσοστό του ελεύθερου θειώδους και μείωση του δεσμευμένου. Αυτό συμβαίνει επειδή οι αυξημένες θερμοκρασίες προκαλούν μερική διάσπαση της δεσμευμένης μορφής του θειώδους, με αποτέλεσμα να αυξάνεται το ελεύθερο θειώδες και συνεπώς και το μοριακό. Για παράδειγμα, ένα κρασί που περιέχει 68 mg ελεύθερου θειώδους στους 0°C θα περιέχει 85 mg στους 15°C και 100 mg στους 30°C (Peynaud, 1984). Ο Sudraud (1977) έδειξε, ότι 64 mg/L ελεύθερου θειώδους στους 16°C αυξήθηκαν σε 120 mg/L στους 48°C και σε 200 mg/L στους 80°C.

(<http://www.brsquared.org/wine/Articles/SO2/SO2.htm>).

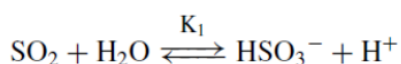
Πίνακας 6.1: Η επίδραση του αλκοολικού τίτλου και της θερμοκρασίας στη pK1 του θειώδους.

% vol	Θερμοκρασία (C°)						
	19	22	25	28	31	34	37
0	1,78	1,85	2,00	2,14	2,25	2,31	2,37
5	1,88	1,96	2,11	2,24	2,34	2,40	2,47
10	1,98	2,06	2,21	2,34	2,44	2,50	2,57
15	2,08	2,16	2,31	2,45	2,54	2,61	2,67
20	2,18	2,26	2,41	2,55	2,64	2,72	2,78

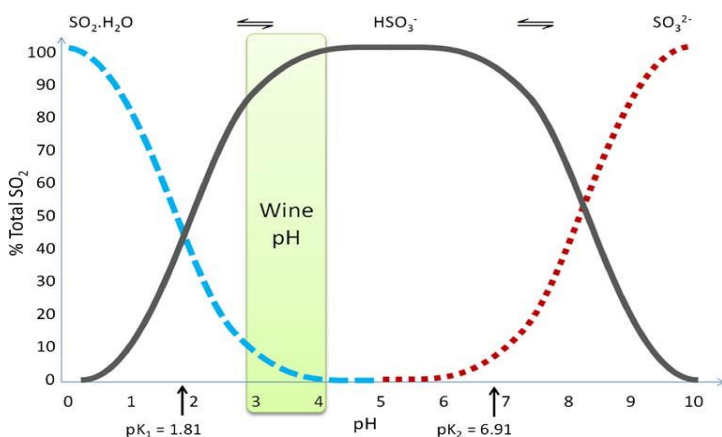
Sulphur dioxide	Temperature		
	0°C	15°C	30°C
Total sulfur dioxide	412	412	412
Free sulfur dioxide	68	85	100
Bound sulfur dioxide (SO ₂ C)	344	327	312
SO ₂ C (to ethanal)	104	104	104
SO ₂ C (to other substances)	240	223	208

Εικόνα 6.1: Η επίδραση της θερμοκρασίας στις μορφές του θειώδους σε γλυκό οίνο προσβεβλημένο από Βοτρίνη (σάκχαρα 74 g/L, ακεταλδεύδη 70 mg/L) (Pascal Ribereau-Gayon et al 2006).

Όσο αυξάνεται το pH, τόσο μικραίνει το ποσοστό του μοριακού θειώδους (πίνακας 6.2). Για το ίδιο pH και την ίδια συγκέντρωση ελεύθερου θειώδους, η συγκέντρωση του μοριακού θειώδους είναι ανάλογη του αλκοολικού τίτλου του διαλύματος. Ο λόγος που συμβαίνουν τα παραπάνω είναι διότι επηρεάζεται η pK₁ της διάστασης του θειώδους (εικόνα 6.2).



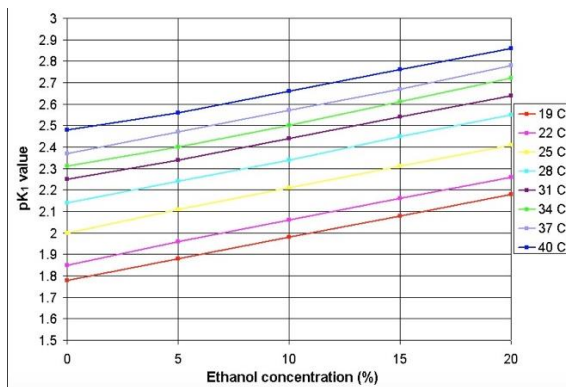
Εικόνα 6.2: Η αμφίδρομη αντίδραση διάστασης του θειώδους.



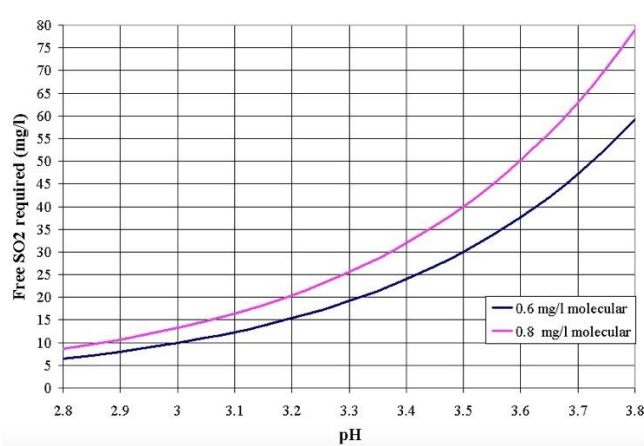
Εικόνα 6.3: Διάγραμμα της συνολικής περιεκτικότητας του SO₂ συναρτήσει του pH.

Πίνακας 6.2: Επίδραση του pH στη συγκέντρωση του μοριακού SO₂, σε κρασί το οποίο έχει 50 mg/L ολικό θειώδες.

pH	Μοριακό SO ₂ (mg/L)	% ελεύθερου SO ₂
2.8	4.64	9.28
3.0	3.03	6.06
3.2	1.96	3.91
3.4	1.25	2.51
3.6	0.80	1.60
3.8	0.51	1.01
4.0	0,32	0,64
4.2	0,20	0,41



Εικόνα 6.4: pK σε συνάρτηση με την θερμοκρασία και την περιεκτικότητα σε αιθανόλη.



Εικόνα 6.5: Η ποσότητα ελεύθερου θειώδους που χρειάζεται για 0,6 και 0,8 mg/L μοριακού θειώδους σε συνάρτηση με το pH.

6.2. Καμπύλη Θείωσης και η χρήση της στην οινοποίηση

Προκειμένου να γίνει σωστά η θείωση και να επιτευχθούν τα επιθυμητά αποτελέσματα, είναι σημαντικό να γίνει η καμπύλη θείωσης για να υπολογιστούν οι κατάλληλες ποσότητες προσθήκης θειώδους. Για την κατασκευή της καμπύλης θείωσης ενός οίνου γίνεται το εξής πείραμα.

Μεθοδολογία 1

Αντιδραστήρια

Οίνος μετά το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης.

Διάλυμα $K_2S_2O_5$ 10% w/v (potassium metabisulfite): αποδίδει περίπου 50% θειώδες οξύ.

Αντιδραστήρια για τον προσδιορισμό του θειώδη ανυδρίτη.

Φιάλες με πόμα των 100 ml.

Σιφόνια και ογκομετρικές φιάλες.

Προετοιμασία δειγμάτων

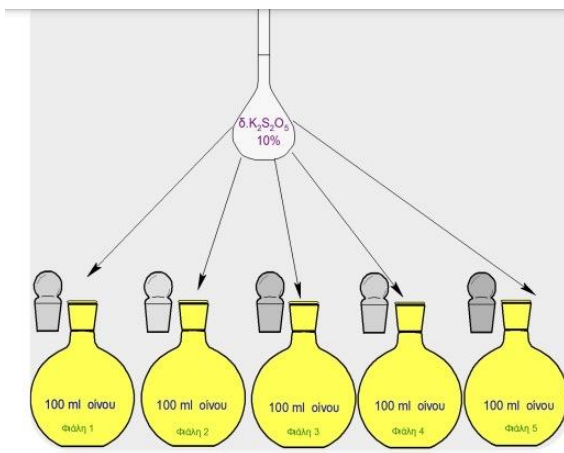
Μεταφέρεται σε κάθε φιάλη με πόμα 100 ml οίνου.

Προστίθονται με σιφόνιο ποσότητες διαλύματος $K_2S_2O_5$ 10% w/v, έτσι ώστε να διαμορφωθούν προσθήκες: 0, 50, 100, 150, 200mg/L θειώδους οξέος (H_2SO_3).

Πωματίζονται καλά οι φιάλες και παραμένουν 48 ώρες σε θερμοκρασία 20°C.

Γίνεται προσδιορισμός ελευθέρου και δεσμευμένου θειώδη ανυδρίτη (mg/L).

Με τα δεδομένα αυτά κατασκευάζουμε την καμπύλη θείωσης.



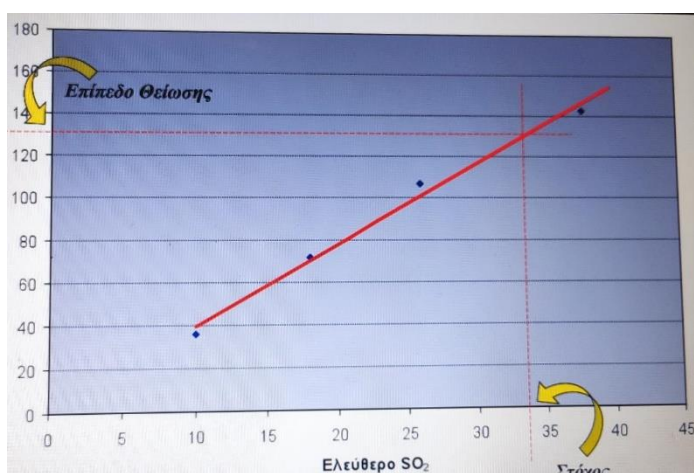
Εικόνα 6.6: Πείραμα για την καμπύλη θείωσης.

Μεθοδολογία 2

1. Σε 100ml H₂O προσθέτουμε X mg metabisulfite (πυκνό διάλυμα θειώδους).
2. Σε 4 κωνικές (Α, Β, Γ, Δ) των 250ml προσθέτουμε 150ml του υπό μελέτη οίνου.
3. Στις παραπάνω κωνικές προσθέτουμε διαδοχικά 1,0- 2,0- 3,0 και 4,0 ml από το πυκνό διάλυμα θειώδους και αντίστοιχα 3,0 – 2,0 – 1,0 – και 0,0 ml H₂O.
4. Μετά από τρείς μέρες σε θερμοκρασία δωματίου μετράμε στα δείγματα ελεύθερο και ολικό θειώδες καθώς και το δεσμευμένο (ολικό – ελεύθερο θειώδες).
5. Στη συνέχεια σχηματίζουμε τη καμπύλη θείωσης έχοντας στον άξονα των X τις συγκεντρώσεις του ελεύθερου θειώδους και στον άξονα των Y τις συγκεντρώσεις του δεσμευμένου θειώδους. (Σημειώσεις Ι. Παρασκευόπουλου, βασικές τεχνικές οινοποίησης θεωρία).

Metabisulfite X mgr /100 ml H ₂ O	Αντίστοιχη προσθήκη θειώδους σε mg/l			
	Κωνικές			
	Α	Β	Γ	Δ
400	13,0	26,0	39,0	51,9
500	16,2	32,5	48,7	64,9
600	19,5	39,0	58,4	77,9
700	22,7	45,5	68,2	90,9
800	26,0	51,9	77,9	103,9
900	29,2	58,4	87,7	116,9
1000	32,5	64,9	97,4	129,9
1100	35,7	71,4	107,1	142,9
1200	39,0	77,9	116,9	155,8

Εικόνα 7α: Ενδεικτικός πίνακας προσθηκών για τη δημιουργία καμπύλης.



Εικόνα 7β: Αναπαράσταση καμπύλης θείωσης.

Όπως είναι αντιληπτό από την καμπύλη βλέποντας στον άξονα των X την επιθυμητή συγκέντρωση ελεύθερου θειώδους με μια νοητή προέκταση στην εφαπτόμενη ευθεία πάνω στη καμπύλη, βρίσκουμε το ποσοστό της συγκέντρωσης του ολικού θειώδους που πρέπει να προστεθεί στο γλεύκος προκειμένου να επιτευχθεί το επιθυμητό ελεύθερο.

Η σημαντικότητα της καμπύλης θείωσης έγκειται στο γεγονός ότι οι απαιτήσεις για προσθήκη θειώδους είναι διαφορετικές για κάθε δεξαμενή. Για αυτό τον λόγο είναι απαραίτητο να γίνουν δοκιμές σε μικρές ποσότητες οίνου, έτσι ώστε να επιλεγεί η καταλληλότερη ποσότητα θειώδους.

Πρακτικοί κανόνες

Η προσθήκη του θειώδους στην ερυθρή οινοποίηση πρέπει να γίνεται αμέσως στον σταφυλοπολτό ή στο γλεύκος.

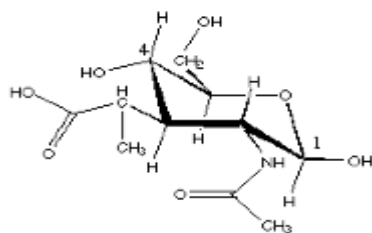
Η ελάχιστη προσθήκη είναι 50 – 70 mg/L και εξαρτάται από την υγιεινή κατάσταση των σταφυλιών. Διασφαλίζει αρχικά στο γλεύκος αντιοξειδωτική και αντισηπτική προστασία.

Στην λευκή οινοποίηση, η προσθήκη θειώδους οξέος στο γλεύκος μπορεί να ελαχιστοποιηθεί, σε συνδυασμό με την προζυμωτική απολάσπωση, τη ρύθμιση του pH (3,00 -3,45), τον εμβολιασμό του γλεύκους και την ελεγχόμενη ζύμωση (15 -20 °C) (Νικολού Β.).

7. Τρόποι Μείωσης της χρήσης του Θειώδους-Υποκατάστατα

Αντιμικροβιακά υποκατάστατα

Λυσοζύμη

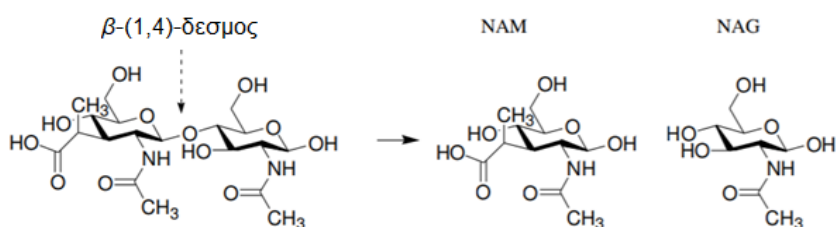


Εικόνα 7.1: Η δομή της λυσοζύμης.

Η λυσοζύμη ή μουραμιδάση (N-acetylmuramide glycanhydrolase) (Εικόνα 7.1) είναι ένα πολυπεπτιδίο με 129 αμινοξέα, το οποίο βρίσκεται στο ασπράδι του αυγού. Η δραστηριότητά της έναντι των gram θετικών βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένων και των γαλακτικών βακτηρίων, την καθιστά ένα σημαντικό αντιμικροβιακό εργαλείο για πολλά τρόφιμα (M. Azzolini et al 2010).

Στην οινοποίηση έχει προταθεί ως αντιμικροβιακός και ανασταλτικός παράγοντας για την μηλογαλακτική ζύμωση με απώτερο στόχο την μείωση του θειώδους που χρησιμοποιείται. Η σταθερότητα της και η δράση της σε pH 2,8 με 4,2 καθώς και η αποτελεσματικότητά της στο να διατηρηθούν χαμηλά τα επίπεδα ισταμίνης, είναι μερικά από τα πλεονεκτήματά της (Mickael C. Santos et al 2011 και M. Azzolini et al 2010).

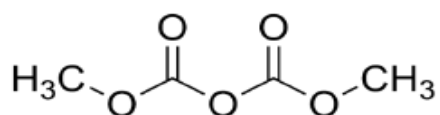
Ο τρόπος δράσης της κατά των βακτηρίων είναι καταλύοντας την υδρόλυση του β -1,4-γλυκοσιδικού δεσμού μεταξύ του *N*-ακετυλομουραμικού οξέος (NAM) και του *N*-ακετύλο-*D*-γλυκοσαμινικού άκρου (NAG) στην πεπτιδογλυκάνη (Εικόνα 7.2) που βρίσκεται στα κυτταρικά τοιχώματα των βακτηρίων, συγκεκριμένα των θετικά κατά Gram βακτηρίων (Wilfred Chung et al 2000).



Εικόνα 7.2: Η δράση της λυσοζύμης στον β -1,4- γλυκοσιδικό δεσμό.

Ωστόσο δεν είναι κατάλληλη για την πλήρη σταθεροποίηση του οίνου αφού δεν δρα κατά όλων των μικροοργανισμών (Wilfred Chung et al 2000). Μελέτες έχουν δείξει ότι η λυσοζύμη είναι πιο αποτελεσματική στους λευκούς οίνους από ότι στους ερυθρούς, κυρίως λόγω των πολυφαινόλων των ερυθρών οίνων οι οποίες επηρεάζουν την δράση της (Mickael C. Santos et al 2011). Σύμφωνα με μία έρευνα η λυσοζύμη έμεινε ενεργή σε ποσοστό 75-80% σε λευκούς οίνους 6 μηνών αλλά σε ερυθρούς οίνους μετά από 2 ημέρες δεν εντοπίστηκε καθόλου (Bartowsky et al). Μέχρι τώρα, η λυσοζύμη δεν έχει βρεθεί να έχει αρνητικές επιδράσεις στο οργανοληπτικό προφίλ του οίνου. Το μέγιστο όριο προσθήκης της που έχει οριστεί από τον OIV είναι τα 500 mg/L κατά την διάρκεια της ωρίμανσης του οίνου (Mickael C. Santos et al 2011, OIV 2009). Παρ' όλα αυτά δεν είναι δυνατόν να αντικαταστήσει το θειώδες πλήρως αφού δεν έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες.

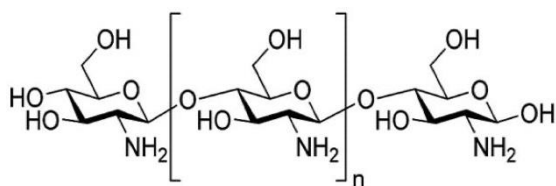
Δικαρβονικός Διμεθυλεστέρας



Εικόνα 7.3: Η δομή του δικαρβονικού διμεθυλεστέρα.

Ο δικαρβονικός διμεθυλεστέρας είναι μια οργανική ένωση (Εικόνα 7.3) που έχει εγκριθεί πρόσφατα από την Ευρωπαϊκή Ένωση ως συντηρητικό κατά την εμφιάλωση οίνων με περισσότερα από 5 g/L υπολειμματικών σακχάρων σε ποσότητα μέχρι 200 mg/L (Mickael C. Santos et al 2011, Regulation (EC) No 643/2006). Ο τρόπος δράσης του είναι αναστέλλοντας ένζυμα της γλυκόλυσης, όπως η αλκοολική αφυδρογονάση και η αφυδρογονάση της 3-φωσφο-γλυκεραλδεύδης, αλλά και μεθοξυκαρβονυλιώνοντας πυρηνόφιλες ενώσεις (ιμιδαζόλια, αμίνες και θειόλες), με αποτέλεσμα την αναστολή της κυτταρικής αύξησης. Η αντιμικροβιακή δράση του στο κρασί, εξαρτάται από παράγοντες όπως η θερμοκρασία, το pH, η ποσότητα της αιθανόλης, ο αρχικός μικροβιακός πληθυσμός καθώς και το είδος των μικροοργανισμών (Mickael C. Santos et al 2011). Αρκετές αναφορές δείχνουν ότι τα γαλακτικά βακτήρια του οίνου είναι πιο ανθεκτικά στον δικαρβονικό διμεθυλεστέρα σε σχέση με τις ζύμες (A. Costa et al 2007). Από τις ζύμες τα είδη *Chizosaccharomyces pombe*, *Dekkera bruxellensis*, *Saccharomyces cerevisiae* και *Pichia guilliermondii* φαίνονται να είναι πιο ανθεκτικά σε σχέση με τα είδη *Zygosaccharomyces bailii*, *Zygoascus hellenicus* και *Lachancea thermotolerans* (Mickael C. Santos et al 2011). Η υδρόλυση του δικαρβονικού διμεθυλεστέρα οδηγεί στην παραγωγή μεθανόλης, ενώ η αντίδρασή του με πολυφαινόλες και οργανικά οξέα του οίνου οδηγεί στον σχηματισμό ανθρακικού μεθυλεστέρα και ανθρακικών αλκυλίων. Τέλος, η αντίδρασή του με αμμώνιο και αμινοξέα οδηγεί στο σχηματισμό καρβαμικού μεθυλίου. Τόσο η συγκέντρωση της μεθανόλης όσο και η συγκέντρωση του καρβαμικού μεθυλίου, είναι τόσο μικρές ώστε να μην δημιουργούνται ούτε θέματα τοξικότητας, ούτε προβλήματα με την οσμή και την γεύση. Ένα πλεονέκτημα της χρήσης του δικαρβονικού διμεθυλεστέρα στους ερυθρούς οίνους είναι η αύξηση της έντασης του χρώματος λόγω πιθανής αλληλεπίδρασης του δικαρβονικού διμεθυλεστέρα με τις ανθοκυάνες (Mickael C. Santos et al 2011). Λόγω των παραπάνω δεν είναι κατάλληλο υποκατάστατο του θειώδους και θα πρέπει να χρησιμοποιείται συνδυαστικά με αυτό για την πλήρη προστασία του οίνου.

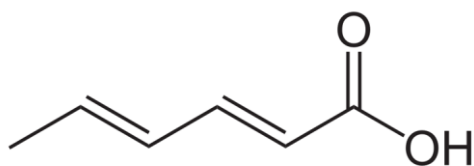
Χιτοζάνη



Εικόνα 7.4: Η δομή της χιτοζάνης.

Η χιτοζάνη (Εικόνα 7.4) είναι ένα γραμμικό πολυμερές *D*-γλυκοζαμίνης συνδεδεμένο με β -1,4 δεσμούς, που λαμβάνεται συνήθως από την αποακετυλίωση της χιτίνης, ενός ομοπολυμερούς *N*-ακετυλογλυκοζαμίνης που εξάγεται από έντομα, καρκινοειδή ή μύκητες. Η αντιμικροβιακή δράση αυτού του μη τοξικού και βιοδιασπώμενου βιοπολυμερούς οφείλεται στην πολυκατιονική του δράση, ενώ η παρουσία αμινοομάδων και υδροξυλομάδων του δίνουν αξιοσημείωτη ισχύ χηλίωσης μετάλλων (Antonio Castro Marín et al). Στην οινοποίηση, η χρήση της χιτοζάνης ως πρόσθετο έχει εγκριθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση από το 2011 με μέγιστη ποσότητα το 0,1g/L (Regulation (EC) No.53/2011). Η προσθήκη της στον οίνο, μπορεί να συμβάλει στην απομάκρυνση βαρέων μετάλλων και της ωχροτοξίνης Α και να μειώσει ανεπιθύμητους πληθυσμούς μικροοργανισμών και κυρίως τον *B. bruxellensis* (Biljana Petrova et al 2016). Ωστόσο, η δράση της έναντι του *B. bruxellensis* εξαρτάται από το αρχικό μικροβιακό φορτίο και από την επιρρέπεια του οίνου στην ανάπτυξη μικροβίων (Patricia Taillandier et al 2018). Τέλος, δρα ως παράγοντας κατά της αμαύρωσης στους λευκούς οίνους (Spagna et al 1996).

Σορβικό οξύ



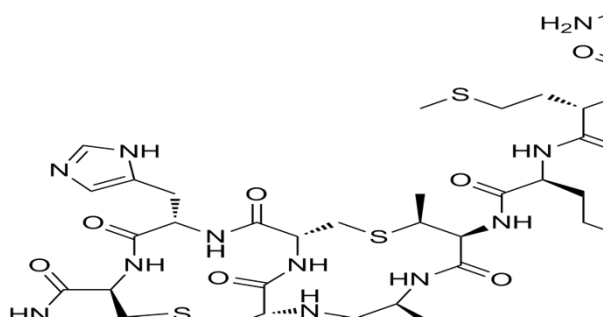
Εικόνα 7.5: Η δομή του σορβικού οξέος

Το σορβικό οξύ (Εικόνα 7.5) ή 2,4-εξαδιενοϊκό οξύ, είναι ένα ακόρεστο, αλειφατικό, ευθείας αλυσίδας, μονοκαρβοξυλικό λιπαρό οξύ και χρησιμοποιείται ως συντηρητικό σε πολλά τρόφιμα εδώ και χρόνια είτε με την μορφή του οξέος, είτε ως άλατα του νατρίου, του ασβεστίου και του καλίου. Στον οίνο μπορεί να προστεθεί ως σορβικό κάλιο, σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με άλλα τρόφιμα λόγω του χαμηλού pH και της ποσότητας της αλκοόλης του οίνου. Δρα ενάντια των ζυμών αλλά όχι ενάντια των βακτηρίων. Τα γαλακτικά βακτήρια μπορούν να

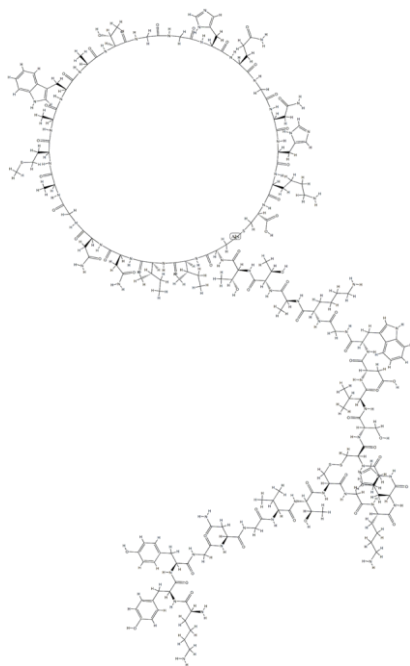
μεταβολίσουν το σορβικό με αποτέλεσμα να παράγεται οσμή φύλλων γερανιού (Edinger και Splitstoesser). Επομένως, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μοναδικό αντισηπτικό πρόσθετο στον οίνο, καθώς οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται δεν είναι επαρκείς για την αναστολή της εξάπλωσης γαλακτικών βακτηρίων (Edinger και Splitstoesser). Χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με το θειώδες, κυρίως σε γλυκούς οίνους για την αποφυγή αναζυμώσεων. Τα μέγιστα νομικά όρια είναι 200 mg/L στην Ευρωπαϊκή Ένωση.

Βακτηριοσίνες

Οι βακτηριοσίνες είναι πολυπεπίδια τα οποία έχουν ανασταλτική δράση απέναντι σε κάποια βακτηριακά είδη, αφού δρουν στην κυτταροπλασματική τους μεμβράνη καθιστώντας την διαπερατή σε ιόντα και οδηγούν στην λύση του κυττάρου (Wilfred Chung, Robert E.W. Hancock 2000). Θεωρούνται ιδανικά συντηρητικά έναντι των gram-θετικών βακτηρίων αφού δεν έχουν οσμή ή γεύση και δεν είναι τοξικές (Mickael C. Santos 2011). Μελέτες έχουν δείξει ότι η νισίνη (εικόνα 7.6) σε συνδυασμό με το θειώδες είναι πολύ αποτελεσματική κατά των γαλακτικών βακτηρίων αλλά όχι τόσο αποτελεσματική κατά των οξικών (Rojo-Bezares et al., 2007). Η πεδιοσίνη (εικόνα 7.7), που προέρχεται από τον *Pediococcus damnosus* (R. Bauer et al 2004), φαίνεται να είναι δραστική έναντι των γαλακτικών βακτηρίων και συγκεκριμένα στελεχών της μηλογαλακτικής ζύμωσης (*Lactobacillus*, *Leuconostoc* και *Oenococcus*) (Mickael C. Santos et al 2011) και δρα κατά του σχηματισμού μικροβιακών υμένων στην επιφάνεια του γλεύκους (Nel et al 2002). Λόγω της περιορισμένης δράσης των βακτηριοσινών έναντι συγκεκριμένων μικροοργανισμών, δεν είναι δυνατό να αντικαταστήσουν πλήρως το θειώδες, μπορούν απλά να συμβάλουν στην μείωσή του. Ωστόσο, δεν έχει εγκριθεί ακόμα η χρήση τους στον οίνο.



Εικόνα 7.6: Η δομή της νισίνης.



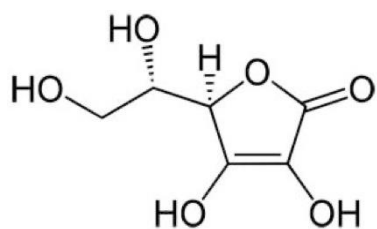
Εικόνα 7.7: Η δομή της πεδιοσίνης.

Κολλοειδές σύμπλοκο αργύρου

Ο άργυρος είναι γνωστός από την αρχαιότητα για την αντιμικροβιακή του δράση απέναντι στα gram-θετικά και στα gram-αρνητικά βακτήρια και στους μύκητες (T. Garde-Cerdan et al 2014). Δρα παρόμοια με το θειώδες έναντι των μικροοργανισμών, μειώνοντας ταυτόχρονα την περιεκτικότητα σε αιθανόλη ενώ παρατηρήθηκε και μείωση των ανθοκυανινών και των φλαβονολών (Pedro M. Izquierdo-Cañas et al 2012). Πειράματα έδειξαν επίσης, ότι οι λευκοί οίνοι που είχαν το σύμπλοκο, εμφανίστηκαν περισσότερο οξειδωμένοι, είχαν λιγότερη φωτεινότητα και πιο κίτρινο χρώμα. Το σύμπλοκο αργύρου δεν παρουσιάζει αντιοξειδωτική δράση, οπότε δεν μπορεί να αντικαταστήσει πλήρως το θειώδες, ενώ η χρήση του στον οίνο δεν επιτρέπεται ακόμα (Pedro M. Izquierdo-Cañas et al 2012).

Αντιοξειδωτικά υποκατάστατα

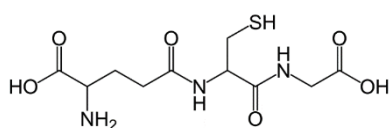
Ασκορβικό οξύ



Εικόνα 7.8: Η δομή του ασκορβικού οξέος.

Το ασκορβικό οξύ ή βιταμίνη C (εικόνα 7.8) είναι ένα αντιοξειδωτικό που χρησιμοποιείται στην οينوποίηση. Δεσμεύει το οξυγόνο με αποτέλεσμα να αποφεύγεται η οξείδωση των φαινολικών ενώσεων, ενώ δρα και ως προ-οξειδωτικό δημιουργώντας οξειδωτικό στρες (Gow-Chin Yen et al 2002). Μελέτες έχουν δείξει ότι σε συνδυασμό με το θειώδες οι λευκοί οίνοι παρουσιάζουν καλύτερο άρωμα, γεύση και διαύγεια (C. Barril et al). Το ανώτατο όριο στη συγκέντρωση του ασκορβικού οξέος στον τελικό οίνο είναι 250 mg/L.

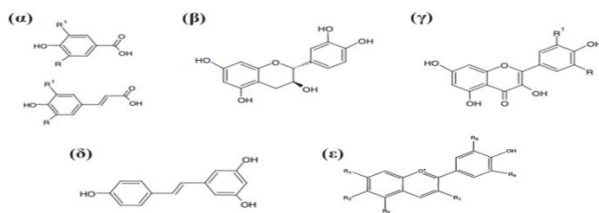
Γλουταθειόνη



Εικόνα 7.9: Η δομή της γλουταθειόνης.

Η γλουταθειόνη (εικόνα 7.9) είναι ένα τριπεπτιδίο αποτελούμενο από L-γλουταμινικό οξύ, L-κυστεΐνη και γλυκίνη, το οποίο αποτελεί φυσικό αντιοξειδωτικό και προέρχεται από τα σταφύλια. Έχει την ικανότητα να περιορίζει το καφέτιασμα του οίνου (εμποδίζοντας τον σχηματισμό ορθοκινωνών), να διατηρεί τις αρωματικές ενώσεις, καθώς και να αποτρέπει τον σχηματισμό δυσάρεστων οσμών (Badea and Antoce, 2015). Παρά τα θετικά αποτελέσματα όσον αφορά στη διατήρηση του αρώματος, παρατηρήθηκε αλλαγή στο χρώμα εμφιαλωμένου οίνου, αφού μπορεί να ευνοήσει τις κατεχίνες με αποτέλεσμα την δημιουργία κίτρινων αποχρώσεων. Η μέγιστη δόση που μπορεί να προστεθεί στον οίνο είναι τα 20 mg/L (Antoce et al 2016). Παρ'όλα αυτά δεν μπορεί να αντικαταστήσει πλήρως το θειώδες, αλλά η συμβολή της είναι αρκετά σημαντική ώστε να μειωθεί το θειώδες σε αρκετό βαθμό (Badea and Antoce, 2015). Σε συνδυασμό μάλιστα με το ασκορβικό οξύ μπορεί να αποτελέσει σημαντική λύση.

Φαινολικές ενώσεις



Εικόνα 7.10: Οι δομές διαφόρων φαινολικών ενώσεων α) φαινολικά οξέα β) φλαβανόλες γ) φλαβονόλες δ) στιλβένια ε) ανθοκυάνες.

Οι φαινολικές ενώσεις (εικόνα 7.10) είναι πολύ σημαντικές στον οίνο, καθώς είναι υπεύθυνες για το χρώμα και την στυπτικότητα. Επίσης, συνδέονται με τις θετικές επιδράσεις της μέτριας κατανάλωσης οίνου σχετικά με τις καρδιαγγειακές και εκφυλιστικές ασθένειες λόγω της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας (García-Ruiz 2007). Η δομή τους, τους επιτρέπει να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες που υπάρχουν στον οίνο. Οξειδώνονται διαδοχικά σε ημικινόνες και κινόνες, ενώ το οξυγόνο ανάγεται σε ρίζες υδρουπεροξυλίου και υπεροξειδίου του υδρογόνου. Η προσθήκη ταννινών αντί για θειώδες δεν φαίνεται να επηρεάζει αρνητικά την ζύμωση (Mickael C. Santos et al 2011). Αρκετές μελέτες έχουν δείξει την ανασταλτική δράση των φαινολών έναντι των γαλακτικών βακτηρίων και για αυτό, έχουν προταθεί ως υποκατάστατο του θειώδους. Η δράση τους αυτή οφείλεται στο γεγονός ότι μεταβάλλουν την δομή της κυτταρικής μεμβράνης των βακτηρίων με αποτέλεσμα να υπάρχει διαρροή κυτταρικών συστατικών όπως πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων και ανόργανων ιόντων (García-Ruiz 2011). Η δραστηριότητα των φαινολικών ενώσεων εξαρτάται από τη δομή τους, τον λιπόφιλο χαρακτήρα τους και την συγκέντρωση στην οποία προστίθενται (Campos et al 2009). Οι García-Ruiz et al διαπίστωσαν ότι οι φλαβονόλες και τα στιλβένια έχουν την μεγαλύτερη ανασταλτική δράση, τα φαινολικά οξέα και οι εστέρες έχουν μεσαία ανασταλτική δράση, ενώ οι φλαβανόλες έχουν την μικρότερη ανασταλτική δράση έναντι των γαλακτικών βακτηρίων. Η προσθήκη υψηλών συγκεντρώσεων φαινολών στον οίνο με σκοπό την αναστολή των γαλακτικών βακτηρίων πρέπει να γίνεται με προσοχή αφού μπορούν να προκαλέσουν φυσικοχημικές και οργανοληπτικές αλλοιώσεις. Ωστόσο, η αντιοξειδωτική τους δράση σε συνδυασμό με την αντιμικροβιακή δράση των βακτηριοσινών και του δικαρβονικού διμεθυλεστέρα θα μπορούσε να αποτελέσει λύση για την αντικατάσταση του θειώδους (Mickael C. Santos et al 2011).

Τεχνικές Υποκατάστασης

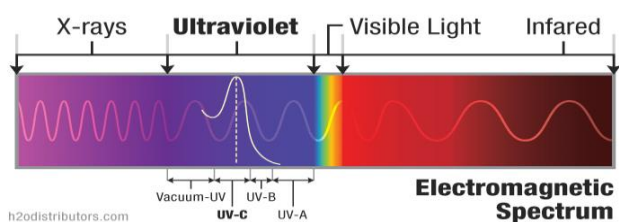
Υπέρηχοι



Εικόνα 7.11: Κύμα υπερήχου.

Οι υπέρηχοι (εικόνα 7.11) έχουν προταθεί ως εναλλακτική επιλογή επεξεργασίας για παστερίωση και αποστείρωση τροφίμων έναντι των κλασσικών θερμικών διαδικασιών. Η απενεργοποίηση παθογόνων και αλλοιογόνων μικροοργανισμών και ενζύμων μέσω της κατεργασίας με υπέρηχους, λαμβάνει χώρα κυρίως μέσω φυσικών ή/και χημικών φαινομένων (O'Donnell et al 2010). Όταν ένας ήχος υψηλής ισχύος διαπεράσει ένα υγρό, δημιουργούνται φυσαλίδες λόγω αλλαγών στη πίεση οι οποίες καταστρέφονται όταν έρθει το επόμενο υπερηχητικό κύμα. Η καταστροφή των φυσαλίδων έχει ως αποτέλεσμα τα μόρια να συγκρούονται βίαια και να δημιουργείται σοκ το οποίο επιφέρει την δημιουργία περιοχών με μεγάλη θερμοκρασία (5500 °C) και πίεση (50 MPa) και έτσι παστεριώνεται το υγρό χωρίς να αυξάνεται η συνολική του θερμοκρασία (Piyasena et al 2003). Στην οινοποίηση έχει προταθεί η χρήση υπερήχων σε διάφορα στάδια για την διατήρηση και συντήρηση του οίνου. Στο γλεύκος, για την μείωση του πληθυσμού μικροοργανισμών αλλοίωσης και στον οίνο για την ενίσχυση του χρώματος και των αρωματικών ενώσεων. Επιπλέον, κατά την διάρκεια της ζύμωσης μπορούν να φανούν χρήσιμοι για την μείωση των μολυσματικών μικροοργανισμών πριν τον εμβολιασμό με ζύμες ή την έναρξη της μηλογαλακτικής ζύμωσης (Mickael C. Santos et al 2011). Οι υπέρηχοι έχουν την δυνατότητα να αυξήσουν τις φαινολικές ενώσεις στον κόκκινο οίνο και να επιταχύνουν την παλαίωση (Nobuyoshi Masuzawa et al 2000). Παρόλα αυτά, η αποτελεσματικά τους εξαρτάται από την συχνότητα τους και από τον αρχικό πληθυσμό των μικροοργανισμών και απαιτείται περαιτέρω έρευνα για να διαπιστωθεί αν μπορούν να αντικαταστήσουν το θειώδες (Mickael C. Santos et al 2011).

Υπεριώδης ακτινοβολία

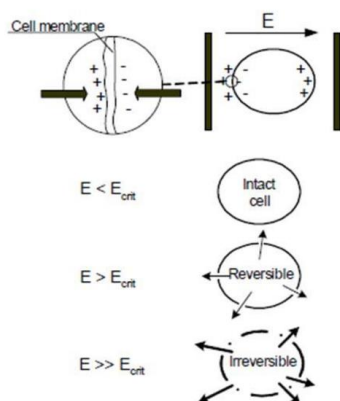


Εικόνα 7.12: Η υπεριώδης ακτινοβολία στο ηλεκτρομαγνητικό φάσμα.

Η υπεριώδης ακτινοβολία (UV) περιλαμβάνει τη χρήση ακτινοβολίας από το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα από 100 έως 400 nm και κατηγοριοποιείται ως UV-A (320- 400 nm), UV-B (280- 320 nm) και UV-C (200- 280 nm) (M.Begum et al 2008).

Η UV ακτινοβολία θεωρείται μια μη θερμική μέθοδος, αφού η χρήση της γίνεται σε χαμηλές θερμοκρασίες (Maricel Keyser et al 2007) και χρησιμοποιείται για την απολύμανση του νερού, επιφανειών και συσκευασιών στη βιομηχανία τροφίμων (Mickael C. Santos et al 2011). Τα πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου περιλαμβάνουν τον μη σχηματισμό τοξικών υποπροϊόντων, την ικανότητα να καταστρέφει οργανικά συστατικά και την μειωμένη ενέργεια που απαιτεί σε σχέση με θερμικές τεχνικές παστερίωσης. Η UV-C ακτινοβολία έχει χρησιμοποιηθεί για να απενεργοποιήσει βακτήρια, ζύμες και ένζυμα στην βιομηχανία τροφίμων, ενώ στον οίνο έχει δείξει ότι απενεργοποιεί τους μικροοργανισμούς *Brettanomyces*, *Saccharomyces*, *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, και *Oenococcus* (Mickael C. Santos et al 2011). Αυτή η δράση της οφείλεται στο γεγονός ότι μπορεί να προκαλέσει φυσική μετατόπιση ηλεκτρονίων και να διασπάσει δεσμούς στο DNA αυτών των μικροοργανισμών (M.Begum et al 2008), γεγονός που επηρεάζει άμεσα την ικανότητα τους να αναπαράγονται (Ilse N. Fredericks et al 2010). Η αποτελεσματικότητα της στον ερυθρό οίνο φαίνεται να είναι περιορισμένη, καθώς το κόκκινο χρώμα απορροφάει την ακτινοβολία στο συγκεκριμένο φάσμα, με αποτέλεσμα να μειώνεται η έντασή της, ενώ και στους λευκούς οίνους η χρήση της θα πρέπει να γίνεται στα τελευταία στάδια της οινοποίησης, όταν η θολερότητα είναι μικρή. Τέλος, ο μεγάλος χρόνος έκθεσης που απαιτείται και ο μικρός όγκος του οίνου που μπορεί να εκτεθεί στην ακτινοβολία, αποτελούν σημαντικά προβλήματα της συγκεκριμένης μεθόδου (Mickael C. Santos et al 2011).

Παλμικά ηλεκτρικά πεδία



Εικόνα 7.13: Η δράση των παλμικών ηλεκτρικών πεδίων.

Τα παλμικά ηλεκτρικά πεδία αποτελούν μία μη θερμική και γρήγορη τεχνική για την αδρανοποίηση παθογόνων μικροοργανισμών στα τρόφιμα, χωρίς να υπάρχει αλλοίωση στην ποιότητα τους (Mickael C. Santos et al 2011). Η διαδικασία περιλαμβάνει την εφαρμογή σύντομων παλμών υψηλής έντασης ηλεκτρικού πεδίου σε προϊόντα τοποθετημένα μεταξύ δύο ηλεκτροδίων, με αποτέλεσμα την ηλεκτροδιάτρηση των κυτταρικών μεμβρανών και την αύξηση της διαπερατότητάς τους. Πιο συγκεκριμένα, δημιουργείται ένα δυναμικό στις μεμβράνες που επικαλύπτει το φυσικό δυναμικό. Αν η διαφορά του δυναμικού μεταξύ της εξωτερικής και της εσωτερικής μεμβράνης περάσει μια τιμή, περίπου ενός Volt, προκαλείται πόλωση και τέλος διάσπαση της μεμβράνης. Ανάλογα με την ένταση η καταστροφή αυτή μπορεί να είναι προσωρινή ή μόνιμη (εικόνα 7.13) (Lucía González-Arenzana et al 2015). Η εφαρμογή της τεχνικής αυτής έχει εξεταστεί τα τελευταία χρόνια σε συσχέτιση με την ανθεκτικότητα κάποιων μικροοργανισμών αλλοίωσης στα παλμικά ηλεκτρικά πεδία, όπως των *Dekkera anomala*, *Dekkera bruxellensis*, *Lactobacillus hilgardii*, και *Lactobacillus plantarum*. Παρατηρήθηκε ότι στο γλεύκος και στον οίνο οι ζύμες παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευαισθησία σε σχέση με τα βακτήρια, ενώ δεν επηρεάζεται η συγκέντρωση των αζωτούχων ενώσεων, των λιπαρών οξέων και των θρεπτικών συστατικών για την ανάπτυξη των ζυμών (Mickael C. Santos et al 2011). Η ευαισθησία των μικροοργανισμών εξαρτάται από κάποια χαρακτηριστικά των κυττάρων, όπως η δομή και το μέγεθος, αλλά και από εξωγενείς παράγοντες όπως το νερό, το pH, τα διαλυμένα στερεά και η ηλεκτρική αγωγιμότητα (Lucía González-Arenzana et al 2015). Κάποια επιπρόσθετα θετικά που μπορεί να επιφέρει αυτή η τεχνική, είναι η μείωση του χρόνου διαβροχής, έως και 48 ώρες, η αύξηση της εκχύλισης των φαινολικών ενώσεων, καλύτερα χρωματικά χαρακτηριστικά, η μείωση του χρόνου ωρίμανσης και σημαντικές αλλαγές στις προανθοκυανίδες της κατεχίνης και της επικατεχίνης. Αυτά σε συνδυασμό με τη χαμηλή κατανάλωση ενέργειας και τους σύντομους χρόνους επεξεργασίας καθιστούν την συγκεκριμένη

τεχνική καλή πιθανή εναλλακτική λύση για το θειώδες, με μειονέκτημα την δημιουργία οίνων χωρίς περίπλοκο αρωματικό προφίλ (Mickael C. Santos et al 2011).

Υψηλή υδροστατική πίεση



Εικόνα 7.14: Μηχάνημα υψηλής υδροστατικής πίεσης.

Η υψηλή υδροστατική πίεση είναι μια τεχνική μη θερμικής επεξεργασίας, που υποβάλλει προϊόντα σε πιέσεις μεταξύ 100 και 1000 MPa ανεξάρτητα από το μέγεθος και τη γεωμετρία του προϊόντος. Το προϊόν τοποθετείται σε θάλαμο υψηλής πίεσης και το δοχείο κλείνει, γεμίζει με μέσο μετάδοσης πίεσης και συμπιέζεται (Mickael C. Santos et al 2011). Η μικροβιακή απενεργοποίηση από την υψηλή πίεση οφείλεται σε παρεμβολές σε κυτταρικές δομές και αλλαγές στη λειτουργία της μεμβράνης, του πυρήνα, του ενδοπλασματικού δικτύου, των ριβοσωμάτων και των ενζύμων με αποτέλεσμα την κυτταρική διαρροή. Πιο συγκεκριμένα, η υψηλή πίεση προκαλεί βλάβη στη μοριακή οργάνωση του συμπλόκου λιπιδίων-πεπτιδίων διαταράσσοντας τη δομή της μεμβράνης. Εκτός από τη βλάβη της μεμβράνης, παρατηρείται μείωση του pH λόγω της ενίσχυσης της ιοντικής διάστασης κατά τη διάρκεια κατεργασιών υψηλής πίεσης (Cláudia Nunes et al). Μελέτες δείχνουν ότι οι πιέσεις μεταξύ 200 και 500 MPa μπορούν να απενεργοποιήσουν τα βακτήρια και τις ζύμες σε ερυθρούς και λευκούς οίνους, χωρίς να προκαλέσουν σημαντικές αισθητηριακές αλλαγές (Mickael C. Santos et al 2013). Πιο συγκεκριμένα, είναι αποτελεσματική μέθοδος έναντι μικροοργανισμών όπως οι *Leuconostoc oenos*, *Lactobacillus spp.*, *Acetobacter* και *Botrytis cinerea* σε ένταση 400 MPa για 2 λεπτά στους 20°C. Μια πίεση 500 MPa για 5 λεπτά προκαλεί μείωση του αρχικού πληθυσμού μικροοργανισμών όπως *Saccharomyces cerevisiae*, *Brettanomyces bruxellensis* και *Oenococcus oeni* χωρίς να υπάρχουν αλλοιώσεις στον οίνο. Τα αερόβια βακτήρια φαίνεται να είναι πιο ευαίσθητα στην υψηλή πίεση από τις ζύμες και τα γαλακτικά βακτήρια (Cláudia Nunes et al, Mickael C. Santos et al 2011).

Οι κύριες μεταβολές που παρατηρούνται στον οίνο οφείλονται στην προώθηση αντιδράσεων συμπύκνωσης και οξειδωσης φαινολικών ενώσεων, οι οποίες οδηγούν στο σχηματισμό ενώσεων με υψηλότερο βαθμό πολυμερισμού. Επίσης, προωθεί αντιδράσεις Maillard κατά την

περίοδο αποθήκευσης του οίνου με αποτέλεσμα ο οίνος να αποκτά χαρακτηριστικά που θα αποκτούσε κατά την ωρίμανση (Cláudia Nunes et al). Η ομογενοποίηση υψηλής πίεσης είναι μία νέα τεχνική κατά την οποία μια αντλία χρησιμοποιείται για να ωθήσει το ρευστό στη βαλβίδα ομογενοποίησης μέσω ενός μικρού στομίου μεταξύ της βαλβίδας και της έδρας της βαλβίδας. Το υγρό βγαίνει από το διάκενο με τη μορφή ακτινικού πίδακα που σταματά σε ένα δακτύλιο πρόσκρουσης. Η εφαρμογή της διαδικασίας υψηλής πίεσης στην οινοποίηση εξακολουθεί να βρίσκεται σε πρώιμο στάδιο ανάπτυξης, ενώ η επίδραση στα φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά του οίνου είναι ακόμη σε μεγάλο βαθμό άγνωστη, ειδικά όσον αφορά στη σύνθεση του χρώματος, της αντιοξειδωτικής δράσης, των φαινολικών και των πτητικών ενώσεων (Mickael C. Santos et al 2011).

7.1 Βιολογικός οίνος

Πριν από το 2012, ο βιολογικός οίνος ήταν ο οίνος για τον οποίο είχαν χρησιμοποιηθεί σταφύλια πιστοποιημένα ως βιολογικά καλλιεργημένα. Η βιολογική καλλιέργεια απαγορεύει τη χρήση φυτοφαρμάκων, ζιζανιοκτόνων, τεχνητών λιπασμάτων και γενετικά τροποποιημένων οργανισμών. Τον Φεβρουάριο του 2012, η Ευρωπαϊκή Ένωση αποφάσισε να καταστήσει αυστηρότερους αυτούς τους κανονισμούς σχετικά με τη βιολογική γεωργία και να προσθέσει ορισμένους νέους για το «βιολογικό οίνο» (<https://www.winetourbooking.com/en/what-is-actually-a-biological-wine/>). Σύμφωνα με αυτούς τους νέους κανονισμούς, τα θειώδη θα πρέπει να μην ξεπερνούν μία μέγιστη συγκέντρωση (30 mg/L) ενώ επιτρέπονται μόνο πρόσθετα που έχουν πιστοποιηθεί ως βιολογικά, όπως ζύμες και ζάχαρη και απαγορεύουν τα μηλικά οξέα. Απαγορεύονται επίσης, η μερική συμπύκνωση με ψύξη, η απομάκρυνση του διοξειδίου του θείου με φυσικές διεργασίες, η επεξεργασία με ηλεκτροδιαπίδωση ή κατιοανταλάκτες για την τρυγική σταθεροποίηση και η μερική αφαίρεση αλκοόλης. Επιτρέπονται οι θερμικές επεξεργασίες χωρίς όμως η θερμοκρασία να ξεπερνά τους 70 βαθμούς, η φυγοκέντριση και η διήθηση με ή χωρίς αδρανές ενισχυτικό, με προϋπόθεση το μέγεθος των πόρων να μην είναι μικρότερο από 0,2 mm (Α.Τσακίρης 2016). Το γεγονός ότι ο βιολογικός οίνος προέρχεται από βιολογικά σταφύλια καθώς και το ότι περιέχει ελάχιστα πρόσθετα αυξάνει ολόένα και περισσότερο τη ζήτησή του στην αγορά. Ωστόσο, η παραγωγή και διάθεση ενός τέτοιου οίνου έχει και μειονεκτήματα. Λόγω της έλλειψης θειώδους όλες οι διαδικασίες θα πρέπει να γίνουν με πολύ μεγάλη προσοχή έτσι ώστε να αποφευχθούν επιμολύνσεις και αλλοιώσεις. Παράλληλα, η μεταφορά και η αποθήκευση θα πρέπει να γίνουν με τέτοιο τρόπο ώστε να μην καταστρέψουν το προϊόν το οποίο είναι πολύ ευαίσθητο στην θερμοκρασία. Η ιδανική θερμοκρασία είναι 14 βαθμοί από την εμφιάλωση μέχρι και την κατανάλωση. Όλα τα παραπάνω συμβάλουν στο να είναι αρκετά δύσκολη η μαζική παραγωγή βιολογικού οίνου με αποτέλεσμα να δημιουργούνται

προβλήματα κόστους για τους παραγωγούς (<https://www.morethanorganic.com/disadvantages-of-natural-wine>).

Συμπεράσματα-Συζήτηση

Κατά την διάρκεια της οινοποίησης μπορούν να αναπτυχθούν ανεπιθύμητοι μικροοργανισμοί αρχικά στο γλεύκος και πιο μετά στον οίνο. Το θειώδες είναι ένα πρόσθετο το οποίο χρησιμοποιείται γενικά στην βιομηχανία τροφίμων και στην οινοποίηση λόγω των πολλών ενεργητικών ιδιοτήτων του. Παρά τις τελευταίες προσπάθειες για πλήρη αντικατάστασή του στην οινοποίηση, δεν έχει βρεθεί κατάλληλο αντικατάστατο.

Εάν ένας οινολόγος θέλει να μειώσει την ποσότητα θειώδους που θα χρησιμοποιήσει μπορεί να χρησιμοποιήσει συνδυαστικά κάποιο από τα υποκατάστατα που αναφέρθηκαν παραπάνω. Μία πρόταση είναι η χρήση ασκορβικού οξέος, το οποίο έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες, σε συνδυασμό με μικρότερη ποσότητα θειώδους. Εναλλακτικά, το ασκορβικό οξύ και η γλουταθειόνη συνδυαστικά μπορούν να μειώσουν σημαντικά την ποσότητα θειώδους. Άλλη πρόταση είναι ο δικαρβονικός διμεθυλεστερας (αντιμικροβιακές ιδιότητες) σε συνδυασμό είτε με μικρότερη ποσότητα θειώδους ή συνδυαστικά με φαινολικές ενώσεις (αντιοξειδωτικές ιδιότητες – οι φαινόλες δρουν και κατά των γαλακτικών βακτηρίων) και τις βακτηριοσίνες (αν επιτραπεί η χρήση της στον οίνο). Τέλος, μειωμένη ποσότητα θειώδους μπορεί να χρησιμοποιηθεί εάν εφαρμοστούν στον οίνο υπέρηχοι ή παλμικά ηλεκτρικά πεδία, τεχνικές που έχουν προταθεί λόγω των θετικών αποτελεσμάτων που έχουν. Όλα τα παραπάνω μπορούν να συνδυαστούν με τους ήδη υπάρχοντες πρακτικούς κανόνες για χαμηλότερες ποσότητες θειώδους όπως την υγιεινή κατάσταση των σταφυλιών, την προζυμωτική απολάσπωση (στους λευκούς οίνους, την ψύξη και άλλα.

Παρά τις προτάσεις που έχουν γίνει από χημικούς και οινολόγους, είναι απαραίτητο να γίνουν περαιτέρω έρευνες και προσπάθειες εύρεσης υποκατάστατων. Ωστόσο θα είναι δύσκολο να βρεθεί κάποιο πρόσθετο που να έχει όλες τις ιδιότητες του θειώδους.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Νερατζής Η. , Ταταρίδης Π., Λογοθέτης Στ. «Βιοτεχνολογία και Βιομηχανικές ζυμώσεις» pp 54, pp 57.
- Νερατζής Η., Ταταρίδης Π., Λιούνη Μ., Βαρελάς Β., «Μικροβιολογία Οίνου», Αθήνα, Εκδόσεις Έμβρυο, pp73, pp 103, pp 108.
- Σημειώσεις Αικατερίνη Dr.ret.nat., Καψοπούλου, Μικροβιολογία Οίνων, Τμήμα Οινολογίας, pp2-15, pp 128, pp 45, pp 64, pp83, pp98.
- Σημειώσεις Νικολού Β., Σεχάντε, «Χημεία Οίνων και ποτών», «Χημεία Θειώδους», «Θειούχες ενώσεις στους οίνους».
- Ταταρίδης Π. , “Νομοθεσία Οίνων και ποτών”, σημειώσεις οινολογίας, pp 147, pp 149.
- Τσακίρης Α., «Οινολογία», Αθήνα, Εκδόσεις Ψυχάλου, 2009.
- Antoce, A.O., Badea, G.A. and Cojocar, G.A., 2016. Effects of glutathione and ascorbic acid addition on the CIELab chromatic characteristics of Muscat Ottonel wines. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 10, pp.206-214.
- Azzolini, M., Tosi, E., Veneri, G. and Zapparoli, G., 2010. Evaluating the efficacy of lysozyme against lactic acid bacteria under different winemaking scenarios. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 31(2), pp.99-105.
- Badea, G.A. and Antoce, A.O., 2015. Glutathione as a possible replacement of sulfur dioxide in winemaking technologies: a review. *Sci Pap B, Horticulture*, 59, pp.123-40.
- BARTOWSKY, E.J., Costello, P.J., VILLA, A. and HENSCHKE, P.A., 2004. The chemical and sensorial effects of lysozyme addition to red and white wines over six months' cellar storage. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 10(2), pp.143-150.
- Bauer, R., 2004. *Strategies for the control of malolactic fermentation: characterisation of Pediocin PD-1 and the gene for the malolactic enzyme from Pediococcus damnosus NCFB 1832* (Doctoral dissertation, Stellenbosch: Stellenbosch University).
- Bradshaw, M.P., Barril, C., Clark, A.C., Prenzler, P.D. and Scollary, G.R., 2011. Ascorbic acid: A review of its chemistry and reactivity in relation to a wine environment. *Critical reviews in food science and nutrition*, 51(6), pp.479-498.
- Braverman, J.B.S., 1953. The mechanism of the interaction of sulphur dioxide with certain sugars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 4(11), pp.540-547.
- Castro Marín, A., Colangelo, D., Lambri, M., Riponi, C. and Chinnici, F., 2020. Relevance and

- perspectives of the use of chitosan in winemaking: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, pp.1-15.
- Chung, W. and Hancock, R.E., 2000. Action of lysozyme and nisin mixtures against lactic acid bacteria. *International journal of food microbiology*, 60(1), pp.25-32.
- Clarke, A.G. and Radojevic, M., 1987. Oxidation of SO₂ in rainwater and its role in acid rain chemistry. *Atmospheric Environment (1967)*, 21(5), pp.1115-1123.
- Coetzee, C., Buica, A. and Du Toit, W.J., 2018. The use of SO₂ to bind acetaldehyde in wine: sensory implications. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 39(2), pp.1-6.
- Costa, A., Barata, A., Malfeito-Ferreira, M. and Loureiro, V., 2008. Evaluation of the inhibitory effect of dimethyl dicarbonate (DMDC) against wine microorganisms. *Food microbiology*, 25(2), pp.422-427.
- EDINGER, W.D. and SPLITTSTOESSER, D.F., 1986. Sorbate tolerance by lactic acid bacteria associated with grapes and wine. *Journal of Food Science*, 51(4), pp.1077-1078.
- Freedman, B.J., 1980. Sulphur dioxide in foods and beverages: its use as a preservative and its effect on asthma. *British journal of diseases of the chest*, 74, pp.128-134.
- Garde-Cerdán, T., López, R., Garijo, P., González-Arenzana, L., Gutiérrez, A.R., López-Alfaro, I. and Santamaría, P., 2014. Application of colloidal silver versus sulfur dioxide during vinification and storage of T empranillo red wines. *Australian journal of grape and wine research*, 20(1), pp.51-61.
- Izquierdo-Cañas, P.M., García-Romero, E., Huertas-Nebreda, B. and Gómez-Alonso, S., 2012. Colloidal silver complex as an alternative to sulphur dioxide in winemaking. *Food Control*, 23(1), pp.73-81.
- Keyser, M., Müller, I.A., Cilliers, F.P., Nel, W. and Gouws, P.A., 2008. Ultraviolet radiation as a non-thermal treatment for the inactivation of microorganisms in fruit juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(3), pp.348-354.
- Liu, S.Q. and Pilone, G.J., 2000. An overview of formation and roles of acetaldehyde in winemaking with emphasis on microbiological implications. *International journal of food science & technology*, 35(1), pp.49-61.
- López-Giral, N., González-Arenzana, L., González-Ferrero, C., López, R., Santamaría, P., López-Alfaro, I. and Garde-Cerdán, T., 2015. Pulsed electric field treatment to improve the phenolic compound extraction from Graciano, Tempranillo and Grenache grape varieties during two vintages. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 28, pp.31-39.

- Nel, H.A., Bauer, R., Wolfaardt, G.M. and Dicks, L.M.T., 2002. Effect of bacteriocins pediocin PD-1, plantaricin 423, and nisin on biofilms of *Oenococcus oeni* on a stainless steel surface. *American journal of enology and viticulture*, 53(3), pp.191-196.
- Nunes, C., Santos, M.C., Saraiva, J.A., Rocha, S.M. and Coimbra, M.A., 2017. Influence of high hydrostatic pressure technology on wine chemical and sensorial characteristics: Potentialities and drawbacks. In *Advances in food and nutrition research* (Vol. 82, pp. 205-235). Academic Press.
- Ough, C.S. and Crowell, E.A., 1987. Use of sulfur dioxide in winemaking. *Journal of Food Science*, 52(2), pp.386-388.
- Pascal Ribereau-Gayon et al (2006), Handbook of Enology Volume 1 The Microbiology of Wine and Vinifications 2nd Edition, chapter 8.
- Petrova, B., Cartwright, Z.M. and Edwards, C.G., 2016. Effectiveness of chitosan preparations against *Brettanomyces bruxellensis* grown in culture media and red wines. *Oeno One*, 50(1), pp.49-56.
- Roger Boulton, Singleton V. L. , Bisson L., Kunkee Ralph, Broken Hill Publishers 2018, Μετάφραση (2015, Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης)Βασίλειος Γ. Ντουρτόγλου pp 23, pp277, pp 499, pp393, pp.
- Rojo-Bezares, B., Sáenz, Y., Zarazaga, M., Torres, C. and Ruiz-Larrea, F., 2007. Antimicrobial activity of nisin against *Oenococcus oeni* and other wine bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 116(1), pp.32-36.
- Santos, M.C., Nunes, C., Saraiva, J.A. and Coimbra, M.A., 2012. Chemical and physical methodologies for the replacement/reduction of sulfur dioxide use during winemaking: Review of their potentialities and limitations. *European Food Research and Technology*, 234(1), pp.1-12.
- Schütz, M. and Kunkee, R.E., 1977. Formation of hydrogen sulfide from elemental sulfur during fermentation by wine yeast. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28(3), pp.137-144.
- Spagna, G., Pifferi, P.G., Rangoni, C., Mattivi, F., Nicolini, G. and Palmonari, R., 1996. The stabilization of white wines by adsorption of phenolic compounds on chitin and chitosan. *Food research international*, 29(3-4), pp.241-248.
- Taillandier, P., Joannis-Cassan, C., Jentzer, J.B., Gautier, S., Sieczkowski, N., Granes, D. and Brandam, C., 2015. Effect of a fungal chitosan preparation on *Brettanomyces bruxellensis*, a

wine contaminant. *Journal of Applied Microbiology*, 118(1), pp.123-131.

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

Yen, G.C., Duh, P.D. and Tsai, H.L., 2002. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. *Food chemistry*, 79(3), pp.307-313.