ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ IV: ΣΥΝΘΕΣΗΣ & ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΞΕΛΙΞΗΣ ΤΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΟΥ ΚΡΑΣΙΟΥ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΣΕ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΑΤΜΟΣΦΑΙΡΑ

ΤΣΕΛΕΠΟΣ ΑΡΗΣ

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΩΡΑΙΟΠΟΥΛΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΗ

ΑΘΗΝΑ, ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2015

Περίληψη

Η παρούσα διπλωματική εργασία έχει ως στόχο να μελετήσει τη φαινολική σύσταση διαφορετικών λευκών και ερυθρών κρασιών από ελληνικές και διεθνείς ποικιλίες, να εξετάσει τις μεταβολές που παρατηρούνται στο ολικό φαινολικό φορτίο και στις επιμέρους υποομάδες του κατά την οινοποίηση και αποθήκευση του κρασιού καθώς και να μελετήσει την επίδραση της ατμόσφαιρας αποθήκευσης στην εξέλιξη της φαινολικής του σύστασης. Μελετήθηκε η οινοποίηση κρασιού από την ποικιλία Cabernet Sauvignon, έγινε ποιοτική και ποσοτική ανάλυση του φαινολικού προφίλ πέντε (5) φρέσκων κρασιών (ποικιλίες Ασύρτικο, Αγιωργίτικο, Cabernet Sauvignon και Merlot) μέσω HPLC-DAD και LC-ESI-MS/MS και μελετήθηκε η επίδραση τροποποιημένων ατμοσφαιρών αζώτου, διοξείδίου του άνθρακα και μίγματος αζώτου-διοξειδίου του άνθρακα στην εξέλιξη των φαινολικών συστατικών των δύο κρασιών από τις ποικιλίες Αγιωργίτικό και Ασύρτικο για διάρκεια ενός χρόνου αποθήκευσης σε πολυστρωματικές συσκευασίες.

Η μελέτη της εκχύλισης των φαινολικών συστατικών του κρασιού κατά τη διάρκεια της οινοποίησης, έδειξε ότι οι ανθοκυάνες, τα κινναμωμικά παράγωγα και οι φλαβονόλες εκχυλίζονται άμεσα από τις πρώτες κιόλας ημέρες τις οινοποίησης. Αντίθετα η εκχύλιση των φλαβ-3-ολών εμφανίζει μια φάση υστέρησης. Κατά τη διάρκεια της διεργασίας της κρυοεκχύλισης αυξημένο ρυθμό παρουσίασαν τα πιο πολικά και υδατοδιαλυτά φαινολικά συστατικά, ενώ η εκχύλιση των φλαβαν-3-ολών ήταν περιορισμένη.

Η μελέτη του φαινολικού προφίλ 5 ελληνικών κρασιών με χρήση HPLC-DAD και LC-ESI-MS/MS επέτρεψε την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση περισσοτέρων από 20 φαινολικών ενώσεων. Τα φαινολικά αυτά μόρια ανήκουν στις ομάδες των φαινολικών οξέων (κουταρικό & καφταρικό οξύ), φλαβονολών (κερκετίνη, μυρικετίνη), φλαβαν-3-ολών (κατεχίνη) και ανθοκυανών (μαλβιδίνη).

Για τα μελετώμενα ερυθρά κρασιά, ο υπολογισμός των λόγων των περιεκτικοτήτων κάποιων χαρακτηριστικών συνόλων ανθοκυανών (π.χ. Σγλυκοζυλιωμένων/Σακετλιωμένων) επέτρεψε ως ένα βαθμό την διάκριση των ποικιλιών. Τα δύο κρασιά από την ποικιλία Αγιωργίτικο, εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε όλους τους λόγους που μελετήθηκαν όταν συγκρίθηκαν με

τους αντίστοιχους λόγους από τα κρασιά των διεθνών ποικιλιών Cabernet Sauvignon και Merlot.

Κατά την αποθήκευση των κρασιών διάρκειας ενός χρόνου σε διαφορετικές τροποποιημένες ατμόσφαιρες, παρατηρήθηκε ότι η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών όπως και των φλαβονολών δεν παρουσίασε σημαντική μείωση κατά την αποθήκευση των δύο κρασιών, σε καμία ατμόσφαιρα αποθήκευσης.

Τα κινναμωμικά οξέα στο Ασύρτικο κατά την αποθήκευση μειώθηκαν σε ποσοστό 20-30%. Η μείωση αυτή ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στην ατμόσφαιρα του λεπτού στρώματος αέρα, όπου προσέγγισε το 50%. Αντίστοιχη μείωση δε παρατηρήθηκε στο Αγιωργίτικο. Σε όλες τις στμόσφαιρες αποθήκευσης στο Αγιωργίτικο, οι τρυγικοί εστέρες υδρολύθηκαν σε ποσοστό περίπου 50% προς τα αντίστοιχα κινναμωμικά οξέα εκτός από την ατμόσφαιρα διοξειδίου του άνθρακα, όπου οι τρυγικοί εστέρες υδρολύθηκαν σε ποσοστό μεγαλύτερο του 70%. Η υδρόλυση αυτή που καταλύεται ενζυμικά δεν παρατηρήθηκε στη λευκή ποικιλία όπου δεν έχει προηγηθεί εκχύλιση.

Η ατμόσφαιρα λεπτού στρώματος αέρα παρουσίασε σημαντικά μεγαλύτερο ρυθμό μείωσης των ελεύθερων ανθοκυανών σε σύγκριση με τις τρεις τροποποιημένες ατμόσφαιρες. Ο ρυθμός μείωσης των ελεύθερων ανθοκυανών για την ατμόσφαιρα του αέρα ήταν $k_1=0.0305\ days^{-1}$ ενώ για τις τροποποιημένες ατμόσφαιρες του αζώτου, του διοξειδίου του άνθρακα και του μίγματος οι ρυθμοί μείωσης ήταν $k_2=0.0053\ days^{-1}$, $k_3=0.0051\ days^{-1}$ και $k_4=0.0062\ days^{-1}$ αντίστοιχα. Οι τροποποιημένες ατμόσφαιρες δεν παρουσίασαν μεταξύ τους στατιστικά σημαντικές διαφορές

Η ένταση του χρώματος (CI) και η λαμπρότητα (dA%) παρουσίασαν μια τάση μείωσης κατά τη διάρκεια αποθήκευσης του ερυθρού κρασιού. Αντίθετα, η απόχρωση (HUE) αυξήθηκε και στις τέσσερις ατμόσφαιρες αποθήκευσης. Οι διαφορές μεταξύ των ατμοσφαιρών αποθήκευσης δεν ήταν στατιστικά σημαντικές.

Περιεχόμενα

1 Εισαγωγή 13

2 Το σταφύλι 16

2.1 Σύσταση του σταφυλιού 16
2.2 Ωρίμανση του σταφυλιού 19
2.3 Εξέλιξη των φαινολικών συστατικών κατά την ωρίμανση του σταφυλιού . 20
2.4 Χαρακτηριστικές καλλιεργήσιμες ποικιλίες 22
2.4.1 Ασύρτικο 23
2.4.2 Αγιωργίτικο 24
2.4.3 Cabernet Sauvignon 24
2.4.4 Merlot 25

3 Η χημεία του κρασιού 26

3.1 Αλκοολική ζύμωση 26
3.2 Μηλογαλακτική ζύμωση 27
3.3 Η χημική σύσταση του κρασιού 28
3.3.1 Αλκοόλες 29
3.3.2 Σάκχαρα 30
3.3.3 Οργανικά Οξέα 31
3.3.4 Άλλες κατηγορίες ενώσεων 33

4 Φαινολικά συστατικά του σταφυλιού και του κρασιού 35

4.1 Μη φλαβονοειδή 36
4.2 Φλαβονοειδή 39
4.2.1 Φλαβονόλες 40
4.2.2 Φλαβαν-3-όλες (κατεχίνες) και προκυανιδίνες 41
4.2.3 Ανθοκυάνες 42
4.2.4 Τανίνες 46

5 Οινοποίηση 50

5.1 Προζυμωτικές διεργασίες 50
5.1.1 Διαλογή των σταφυλιών 50
5.1.2 Αποβοστρύχωση 51
5.1.3 Έκθλιψη («σπάσιμο ή εκραγισμός») 52
5.1.4 Διόρθωση του γλεύκους 52

5.2 Λευκή οινοποίηση ... 53
5.2.1 Στράγγιση ή διαχωρισμός ... 54
5.2.2 «Συμπίεση» ... 54
5.2.3 Θείωση ... 55
5.2.4 Απολάσπωση ... 55
5.2.5 Προζυμωτική κρυοεκχύλιση ... 56
5.2.6 Ζύμωση ... 58
5.3 Ερυθρή οινοποίηση ... 58
5.3.1 Προζυμωτική κρυοεκχύλιση ... 59
5.3.2 Κλασσική μέθοδος ερυθρής οινοποίησης ... 59
5.3.3 Θερμοοινοποίηση ... 64
5.3.4 Ανθρακική αναεροβίωση ... 66
5.4 Μεταζυμωτικές διεργασίες ... 68
5.4.1 Διαύγαση ... 69
5.4.2 Σταθεροποίηση ... 70
6 Αποθήκευση-παλαίωση ... 72
6.1 Διαλυμένο οξυγόνο στο κρασί ... 72
6.2 Συσκευασία ... 73
6.3 Χρήση αδρανών αερίων κατά την οινοποίηση και την αποθήκευση ... 76
7 Εκχύλιση και αντιδράσεις φαινολικών συστατικών ... 82
7.1 Εκχύλιση φαινολικών συστατικών ... 82
7.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την εκχύλιση των φαινολικών ... 84
7.2.1 Χρόνος παραμονής των στεμφύλων με το γλεύκος ... 84
7.2.2 Θερμοκρασία αλκοολικής ζύμωσης ... 85
7.2.3 Επίδραση προζυμωτικής κρυοεκχύλισης ... 85
7.2.4 Λοιποί παράγοντες ... 86
7.3 Αντιδράσεις φαινολικών συστατικών ... 88
7.3.1 Ενζυμικές δράσεις ... 89
7.3.2 Χημικές αντιδράσεις ... 92
8 Υλικά και μέθοδοι ... 95
8.1 Διαδικασίες οινοποιήσεων και σχεδιασμός πειραμάτων ... 95
8.1.1 Οινοποίηση λευκού κρασιού από την ποικιλία Ασύρτικο ... 95
8.1.2 Κλασσική ερυθρή οινοποίηση κρασιού από την ποικιλία Αγιωργίτικο 95

8.1.3 Οινοποίηση ερυθρού κρασιού από την ποικιλία Αγιωργίτικο με προζυμωτική κρυοεκχύλιση 96

8.1.4 Οινοποίηση ερυθρού κρασιού από την ποικιλία Cabernet Sauvignon με προζυμωτική κρυοεκχύλιση 96

8.1.5 Οινοποίηση ερυθρού κρασιού από την ποικιλία Merlot με προζυμωτική κρυοεκχύλιση 97

8.1.6 Διαδικασία συσκευασίας και αποθήκευσης δειγμάτων 97

8.2 Συσκευές 98

8.3 Αναλυτικές μέθοδοι 98

8.3.1 Ταυτοποίηση φαινολικών ενώσεων μέσω LC-MS 98

8.3.2 Ποσοτικός προσδιορισμός φαινολικών συστατικών μέσω HPLC-DAD 99

8.3.3 Ποσοτικός προσδιορισμός ολικών φαινολικών συστατικών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu 99

8.3.4 Ποσοτικός προσδιορισμός ολικών και επιμέρους ομάδων φαινολικών συστατικών με φασματοφωτομετρική μέθοδο 100

8.3.5 Ποσοτικός προσδιορισμός φλαβαν-3-ολών με τη μέθοδο DMACA ...101

8.3.6 Προσδιορισμός χρωματικών παραμέτρων κρασιού με φασματοφωτομετρική μέθοδο 102

9 Αποτελέσματα-συζήτηση 103

9.1 Μελέτη εξέλιξης φαινολικών συστατικών κατά την οινοποίηση 103

9.1.1 Εκχύλιση φαινολικών συστατικών κατά την ερυθρή οινοποίηση Cabernet Sauvignon με προζυμωτική κρυοεκχύλιση 103

9.2 Ανάλυση του φαινολικού προφίλ φρέσκων κρασιών 105

9.2.1 Ταυτοποίηση φαινολικών συστατικών 106

9.2.2 Ποσοτικοποίηση φαινολικών συστατικών 107

9.2.3 Διάκριση ερυθρών ποικιλιών με βάση το φαινολικό τους προφίλ 111

9.3 Μελέτη εξέλιξης φαινολικών κατά την αποθήκευση κρασιού από τις ποικιλίες Ασύρτικο και Αγιωργίτικο υπό τροποποιημένη ατμόσφαιρα αζώτου (N_2) 113

9.3.1 Εξέλιξη ολικών φαινολικών κατά την αποθήκευση 114

9.3.2 Εξέλιξη φαινολικών οξέων 116

9.3.3 Εξέλιξη φλαβονολών 120

9.3.4 Εξέλιξη ανθοκυανών 123

9.3.5 Εξέλιξη χρώματος 126

9.4 Σύγκριση εξέλιξης φαινολικών κατά την αποθήκευση κρασιού υπό διαφορετικές τροποποιημένες ατμόσφαιρες 128

9.4.1 Ολικό φαινολικό φορτίο 129

9.4.2 Φαινολικά οξέα 131
9.4.3 Φλαβονόλες 135
9.4.4 Ανθοκυάνες 138
9.4.5 Χρώμα 140
10 Συμπεράσματα 143
11 Βιβλιογραφία 145
11.1 Διεθνής Βιβλιογραφία 145
11.2 Ελληνική Βιβλιογραφία 150

Πίνακες

Πίνακας 2.1 % κατά βάρος περιεκτικότητα συστατικών στους βόστρυχους εκτός των ξυλώδων ιστών 17
Πίνακας 2.2 % κατά βάρος περιεκτικότητα συστατικών των φλοιών της ράγας των σταφυλιών 18
Πίνακας 2.3 % κατά βάρος περιεκτικότητα συστατικών στα γίγαρτα της ράγας του σταφυλιού 19
Πίνακας 7.1 % σύσταση φαινολικών στα μέρη του σταφυλιου 83
Πίνακας 9.1 Χρόνοι έκλουσης, μέγιστα απορρόφησης, ιονισμένα κατιόντα/ανιόντα και κύρια θραύσματα των φαινολικών συστατικών που ταυτοποιήθηκαν σε πέντε (5) φρέσκα κρασιά των ποικιλιών Αγιωργίτικο, Ασύρτικο, Cabernet Sauvignon και Merlot (*$[M-H]^-$ και κύριο θραύσμα) 107
Πίνακας 9.2 Συγκεντρώσεις των φαινολικών οξέων και των εστέρων τους σε ισοδύναμα mg/L καφεϊκού οξέος [CAE] 108
Πίνακας 9.3 Συγκέντρωση επιμέρους φλαβονών σε ισοδύναμα mg/L κερκετίνης [*Quercetin eq.*] 109
Πίνακας 9.4 Συγκεντρώσεις κύριων ανθκυανικών συστατικών σε ισοδύναμα mg/L του 3-γλυκοζίτη της μαλβιδίνης [Mv-3-glc eq.] 110
Πίνακας 9.5 Συγκεντρώσεις ολικών φαινολικών, μονομερών ανθοκυανών, ολικών φλαβονολών, ποσόστωση επιμέρους ομάδων των ανθοκυανών και φλαβονολών, και λόγοι που χρησιμοποιούνται για τη διάκριση των ποικιλιών 112
Πίνακας 9.6 Ρυθμοί μείωσης και συντελεστές συσχέτισης ελεύθερων (μονομερών) ανθοκυανών (σε μέρες^{-1}), για τους γλυκοζίτε, τους ακετυλιωμένους γλυκοζίτες, τους κουμαριλιωμένους γλυκοζίτες και για τις ολικές ελεύθερες ανθοκυάνες υπό τις ατμόσφαιρες αποθήκευσης λεπτού στρώματος αέρα, αζώτου (N_2), διοξειδίου του άνθρακα (CO_2) και μίγματος αζώτου-διοξειδίου 140

Διαγράμματα

Διάγραμμα 9.1 Εκχύλιση ολικών φαινολικών και επιμέρους κύριων ομάδων κατά την ερυθρή οινοποίηση σταφυλιών Cabernet Sauvignon με προζυμωτική κρυοεκχύλιση. (TP: ολικό φαινολικό φορτίο (ισοδύναμα γαλλικού οξέος), TAntho: ανθοκυάνες (ισοδύναμα γλυκοζίτη-3 μαλβιδίνης), TCat: φλαβαν-3-όλες (ισοδύναμα κατεχίνης), TCAcids: τρυγικοί εστέρες (ισοδύναμα καφεϊκού οξέος), TFlav: φλαβονόλες (ισοδύναμα κερκετίνης)) 104

Διάγραμμα 9.2 Εξέλιξη συγκέντρωσης ολικών φαινολικών συστατικών, εκφρασμένα σε mg/L ισοδύναμα γαλλικού οξέος [GAE], με τη φωτομετρική μέθοδο και με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu κατά την αποθήκευση κρασιού από την ποικιλία Ασύρτικο σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα N_2 114

Διάγραμμα 9.3 Εξέλιξη συγκέντρωσης ολικών φαινολικών συστατικών σε mg/L ισοδύναμα γαλλικού οξέος [GAE], με τη φωτομετρική μέθοδο και με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu κατά την αποθήκευση κρασιού από την ποικιλία Αγιωργίτικο σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα N_2 115

Διάγραμμα 9.4 Εξέλιξη συγκέντρωσης ολικών κιναμωμικών σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος με τη φωτομετρική και με τη χρωματογραφική μέθοδο κατά την παλαίωση κρασιού από την ποικιλία Ασύρτικο σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα N_2 117

Διάγραμμα 9.5 Εξέλιξη συγκέντρωσης ολικών κιναμωμικών σε ισοδύναμα καφεϊκού οξέος [CAE], με τη φωτομετρική και με τη χρωματογραφική μέθοδο κατά την παλαίωση κρασιού από την ποικιλία Αγιωργίτικο σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα N2 117

Διάγραμμα 9.6 Εξέλιξη συγκεντρώσεων τρυγικών εστέρων και κιναμωμικών οξέων σε ισοδύναμα καφεϊκού οξέος (CAE), κατά την αποθήκευση κρασιού από την ποικιλία Ασύρτικο σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα N_2 με τη χρωματογραφική μέθοδο 119

Διάγραμμα 9.7 Εξέλιξη συγκέντρωσης ολικών κιναμωμικών καθώς και των επιμέρους συγκεντρώσεων τρυγικών εστέρων και κιναμωμικών οξέων κατά την αποθήκευση κρασιού από την ποικιλία Αγιωγίτικο σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα N_2 μέσω χρωματογραφικής ανάλυσης 119

Διάγραμμα 9.8 Εξέλιξη συγκέντρωσης ολικών φλαβονολών σε ισοδύναμα κερκετίνης, (Q eq.) με τη φωτομετρική και τη χρωματογραφική μέθοδο, κατά την

αποθήκευση κρασιού από την ποικιλία Ασύρτικο σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα N_2 120
Διάγραμμα 9.9 Εξέλιξη ολικών φλαβονολών σε ισοδύναμα κερκετίνης, (Q. eq.) με τη φωτομετρική και τη χρωματογραφική μέθοδο, κατά την αποθήκευση κρασιού από την ποικιλία Αγιωργίτικο σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα N_2.....121
Διάγραμμα 9.10 Εξέλιξη συγκεντρώσεων ολικών φλαβονολών και των κύριων υποομάδων τους (γλυκοζυλιωμένές και άγλυκες φλαβονόλες) σε ισοδύναμα κερκετίνης (Q. eq.) κατά την αποθήκευση κρασιού από την ποικιλία Αγιωργίτικο σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα N_2 με τη χρωματογραφική μέθοδο.....122
Διάγραμμα 9.11 Εξέλιξη συγκεντρώσεων ολικών φλαβονολών και των επιμέρους κύριων υποομάδων τους (γλυκοζυλιωμένές και άγλυκες φλαβονόλες) σε ισοδύναμα κερκετίνης κατά την αποθήκευση κρασιού από την ποικιλία Ασύρτικο σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα N_2 μέσω χρωματογραφικής ανάλυσης 122
Διάγραμμα 9.12 Εξέλιξη συγκέντρωσης μονομερών ανθοκυανών σε ισοδύναμα 3-γλυκοζίτη της μαλβιδίνης (mv-3-glc eq.) με τη φωτομετρική και τη χρωματογραφική μέθοδο κατά την αποθήκευση κρασιού από την ποικιλία Αγιωργίτικο σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα N2.....124
Διάγραμμα 9.13 Ρυθμός μείωσης 3-γλυκοζίτη της μαλβιδίνης- (mv-3-glc) κατά την αποθήκευση κρασιού από την ποικιλία Αγιωργίτικο σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα N_2 μέσω χρωματογραφικής ανάλυσης.....125
Διάγραμμα 9.14 Απορρόφηση στα 420 nm κατά τη διάρκεια αποθήκευσης για το κρασί από την ποικιλία Ασύρτικο υπό τροποποιημένη ατμόσφαιρα N_2.....126
Διάγραμμα 9.15 Εξέλιξη χρωματικών παραμέτρων CI, HUE και dA % κατά την αποθήκευση κρασιού από την ποικιλία Αγιωργίτικο σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα N_2.....127
Διάγραμμα 9.16 Εξέλιξη συγκέντρωσης ολικών φαινολικών συστατικών σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος [GAE] κατά την αποθήκευση κρασιού από την ποικιλία Ασύρτικο υπό διαφορετικές ατμόσφαιρες αέρα, αζώτου (N_2), διοξειδίου του άνθρακα (CO_2) και μίγματος αζώτου-διοξειδίου του άνθρακα σε αναλογία 50:50 μέσω χρωματογραφικής ανάλυσης.....129
Διάγραμμα 9.17 Εξέλιξη συγκέντρωσης ολικών φαινολικών συστατικών σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος [GAE] κατά την αποθήκευση κρασιού από την ποικιλία Αγιωργίτικο υπό διαφορετικές ατμόσφαιρες αέρα, αζώτου (N_2), διοξειδίου του

άνθρακα (CO_2) και μίγματος αζώτου-διοξειδίου του άνθρακα σε αναλογία 50:50 μέσω χρωματογραφικής ανάλυσης 130
Διάγραμμα 9.18 Εξέλιξη συγκέντρωσης ολικών κιναμωμικών σε ισοδύναμα καφεϊκού οξέος [CAE] κατά την αποθήκευση κρασιού από την ποικιλία Ασύρτικο υπό διαφορετικές ατμόσφαιρες αέρα, αζώτου (N_2), διοξειδίου του άνθρακα (CO_2) και μίγματος αζώτου-διοξειδίου του άνθρακα σε αναλογία 50:50 μέσω χρωματογραφικής ανάλυσης.....132
Διάγραμμα 9.19 Ποσοστιαία μείωση συγκέντρωσης ολικών κιναμωμικών κατά την αποθήκευση κρασιού από την ποικιλία Ασύρτικο σε ατμόσφαιρες αέρα, αζώτου (N_2), διοξειδίου του άνθρακα (CO_2) και μίγματος αζώτου-διοξειδίου του άνθρακα σε αναλογία 50:50.....133
Διάγραμμα 9.20 Ποσοστιαία μείωση συγκέντρωσης ολικών κιναμωμικών κατά την αποθήκευση κρασιού από την ποικιλία Ασύρτικο σε ατμόσφαιρες αέρα, αζώτου (N_2), διοξειδίου του άνθρακα (CO_2) και μίγματος αζώτου-διοξειδίου του άνθρακα σε αναλογία 50:50.....134
Διάγραμμα 9.21 Εξέλιξη επιμέρους συγκεντρώσεων τρυγικών εστέρων και κιναμωμικών οξέων κατά την αποθήκευση κρασιού από την ποικιλία Αγιωργίτικο στις τέσσερις (4) διαφορετικές ατμόσφαιρες αέρα, αζώτου (N_2), διοξειδίου του άνθρακα (CO_2) και μίγματος αζώτου-διοξειδίου του άνθρακα σε αναλογία 50:50 μέσω χρωματογραφικής ανάλυσης 135
Διάγραμμα 9.22 Εξέλιξη συγκέντρωσης ολικών φλαβονολών σε ισοδύναμα κερκετίνης κατά την αποθήκευση κρασιού από την ποικιλία Ασύρτικο υπό διαφορετικές ατμόσφαιρες αέρα, αζώτου (N_2), διοξειδίου του άνθρακα (CO_2) και μίγματος αζώτου-διοξειδίου τοθ άνθρακα σε αναλογία 50:50 μέσω χρωματογραφικής ανάλυσης.....136
Διάγραμμα 9.23 Εξέλιξη συγκέντρωσης ολικών φλαβονολών σε ισοδύναμα κερκετίνης κατά την αποθήκευση κρασιού από την ποικιλία Αγιωργίτικο υπό διαφορετικές ατμόσφαιρες αέρα, αζώτου (N_2), διοξειδίου του άνθρακα (CO_2) και μίγματος αζώτου-διοξειδίου του άνθρακα σε αναλογία 50:50 μέσω χρωματογραφικής ανάλυσης.....137
Διάγραμμα 9.24 Εξέλιξη συγκέντρωσης επιμέρους υποομάδων φλαβονολών (γλυκοζυλιωμένων και άγλυκων) σε ισοδύναμα κερκετίνης κατά την αποθήκευση κρασιού από την ποικιλία Αγιωργίτικο στις τέσσερις (4) διαφορετικές ατμόσφαιρες

αέρα, αζώτου (N_2), διοξειδίου του άνθρακα (CO_2) και μίγματος αζώτου-διοξειδίου του άνθρακα σε αναλογία 50:50 μέσω χρωματογραφικής ανάλυσης.....138
Διάγραμμα 9.25 Εξέλιξη συγκέντρωσης μονομερών ανθοκυανών σε ισοδύναμα μαλβιδίνης-3-γλυκοζίτη κατά την αποθήκευση κρασιού από την ποικιλία Αγιωργίτικο υπό διαφορετικές ατμόσφαιρες αέρα, αζώτου (N_2), διοξειδίου του άνθρακα (CO_2) και μίγματος αζώτου-διοξειδίου του άνθρακα σε αναλογία 50:50 μέσω χρωματογραφικής ανάλυσης.....139
Διάγραμμα 9.26 Εξέλιξη χρωματικής έντασης (CI) κατά την αποθήκευση κρασιού από την ποικιλία Αγιωργίτικο υπό διαφορετικές ατμόσφαιρες αέρα, αζώτου (N_2), διοξειδίου του άνθρακα (CO_2) και μίγματος αζώτου-διοξειδίου τοθ άνθρακα σε αναλογία 50:50.....141
Διάγραμμα 9.27 Εξέλιξη χρωματικής παραμέτρου HUE (απόχρωση) κατά την αποθήκευση κρασιού από την ποικιλία Αγιωργίτικο υπό διαφορετικές ατμόσφαιρες αέρα, αζώτου (N_2), διοξειδίου του άνθρακα (CO_2) και μίγματος αζώτου-διοξειδίου τοθ άνθρακα σε αναλογία 50:50 141
Διάγραμμα 9.28 Εξέλιξη χρωματικής παραμέτρου dA% (λαμπρότητα) κατά την αποθήκευση κρασιού από την ποικιλία Αγιωργίτικο υπό διαφορετικές ατμόσφαιρες αέρα, αζώτου (N_2), διοξειδίου του άνθρακα (CO_2) και μίγματος αζώτου-διοξειδίου του άνθρακα σε αναλογία 50:50 142

1 Εισαγωγή

Το σταφύλι αποτελεί τον καρπό του φυτού της αμπέλου, ενός αναρριχητικού φυτού, η μεγάλη προσαρμοστικότητα του οποίου σε ένα ευρύ φάσμα κλιματικών συνθηκών, είχε ως αποτέλεσμα την καθιέρωσή του, από την αρχαιότητα κιόλας, ως ένα από τα βασικά καλλιεργήσιμα γεωργικά αγαθά. Το σταφύλι μπορεί να καταναλωθεί ωμό, ενώ ο χυμός του σταφυλιού (γλεύκος) χρησιμοποιείται, ακόμα, ως πρώτη ύλη για την παραγωγή κρασιού, η οποία πραγματοποιείται με τη μετατροπή των σακχάρων του σταφυλιού σε αιθυλική αλκοόλη (αιθανόλη) μέσω του μεταβολισμού των ζυμομυκήτων, μια διαδικασία που ονομάζεται αλκοολική ζύμωση. Εκτός από το ότι αποτέλεσε ένα από τα πρώτα καταγεγραμμένα μεταποιητικά και εμπορικά προϊόντα της ιστορίας, η παραγωγή του οποίου χρονολογείται από το 5.000 π.Χ. στη Μέση Ανατολή, το κρασί θεωρείται διαχρονικά ως ένα κατεξοχήν πολιτισμικό αγαθό, αναπόσπαστο κομμάτι των κοινωνικών συναθροίσεων και μάρτυρας ευημερίας και ανάπτυξης του εκάστοτε, και δη του ελληνικού πολιτισμού.

Η ύπαρξη χιλιάδων διαφορετικών καλλιεργήσιμων ποικιλιών σταφυλιού σε συνδυασμό με τον διαφορετικό χαρακτήρα που προσδίδουν στο κρασί οι κλιματικές συνθήκες, η σύσταση του εδάφους και οι τεχνικές οινοποίησης δίνουν έναν εξαιρετικά μεγάλο αριθμό διαφορετικών ειδών παραγόμενων κρασιών, το καθένα από τα οποία έχει ξεχωριστό γευστικό και αρωματικό χαρακτήρα. Τα στοιχεία αυτά έχουν καθιερώσει, σήμερα, την οινική βιομηχανία σε βασικό πυλώνα του κλάδου των αλκοολούχων ποτών. Σήμερα, καλλιεργούνται παγκοσμίως περίπου 75,000 τετραγωνικά χιλιόμετρα εκτάσεων αμπέλου, για την παραγωγή σταφυλιών, το 71% των οποίων προορίζεται για την παραγωγή κρασιού. Στην Ελλάδα έχει σημειωθεί ιδιαίτερη ανάπτυξη του κλάδου τα τελευταία 50 χρόνια, ενώ η πληθώρα των μοναδικών ελληνικών ποικιλιών, η ιδιαιτερότητα των εδαφών (όπως το ηφαιστιογενές έδαφος της Σαντορίνης) και το ιδανικό γεωγραφικό πλάτος στο οποίο βρίσκεται η χώρα, αποτελούν παράγοντες που ευνοούν την παραγωγή ακόμα ποιοτικότερων κρασιών.

Επιπλέον, εκτεταμένες έρευνες έχουν αναδείξει τα τελευταία χρόνια τα θετικά οφέλη που μπορεί να έχει η ελεγχόμενη κατανάλωση κρασιού στην υγεία του ατόμου. Μεταξύ άλλων, η με μέτρο κατανάλωση κρασιού μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο

εμφάνισης στεφανιαίων και καρδιοαγγειακών παθήσεων καθώς και διάφορων μορφών καρκίνου, να βελτιώσει τη κυκλοφορία του αίματος, να μειώσει το άγχος και να έχει αντιοξειδωτική δράση περιορίζοντας τον κίνδυνο καρδιακών επεισοδίων και εγκεφαλικών. Μπορεί ακόμα να βελτιώσει το μεταβολισμό, καταπολεμώντας την παχυσαρκία, ενώ έχει αντιφλεγμονώδη και αντιγηραντική δράση, εμποδίζοντας ή καθυστερώντας την εμφάνιση εκφυλιστικών ασθενειών του εγκεφάλου.

Οι περισσότερες από τις ευεργετικές δράσεις του κρασιού οφείλονται σε μια κατηγορία οργανικών ενώσεων που περιέχονται στο κρασί, τα φαινολικά συστατικά. Τα φαινολικά συστατικά εκτός από τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες και τα γενικότερα οφέλη τους στην υγεία, συμβάλλουν στη δομή και την πολυπλοκότητα του κρασιού και καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό τον οργανονοληπτικό του χαρακτήρα και το χρώμα του. Η σύσταση του κάθε κρασιού σε φαινολικά είναι μοναδική, λόγω του πλήθους των ενώσεων που απαρτίζουν τα φαινολικά συστατικά και των διαφορετικών ιδιοτήτων που τα διακρίνουν. Η σύσταση αυτή δεν εξαρτάται μόνο από την ποικιλία του σταφυλιού από το οποίο προέρχονται, αλλά και σε ένα σύνολο άλλων παραμέτρων που αφορούν την οινοποίηση, μεταξύ των οποίων είναι ο χρόνος επαφής των στεμφύλων με το γλεύκος (χρόνος εκχύλισης), οι προζυμωτικές και μεταζυμωτικές διεργασίες που υφίσταται το γλεύκος και το κρασί αντίστοιχα, η χρήση πηκτινολητικών ενζύμων, η παλαίωση σε δρύινα βαρέλια και η ατμόσφαιρα αποθήκευσης του κρασιού.

Η παρούσα διπλωματική εργασία έχει ως στόχο να μελετήσει τη φαινολική σύσταση διαφορετικών λευκών και ερυθρών κρασιών από ελληνικές και διεθνείς ποικιλίες, να εξετάσει τις μεταβολές που παρατηρούνται στο ολικό φαινολικό φορτίο και στις επιμέρους υποομάδες του κατά την οινοποίηση και αποθήκευση του κρασιού και να μελετήσει την επίδραση που μπορεί να έχει η ατμόσφαιρα αποθήκευσης στο φαινολικό προφίλ τους.

Η ανάλυση της φαινολικής σύστασης ελληνικών ποικιλιών έχει μεγάλο ενδιαφέρον αφού τα τελευταία χρόνια γίνεται μια προσπάθεια «χαρακτηρισμου» (“profiling”) όλων των καλλιεργήσιμων ποικιλιών παγκοσμίως, ενώ παρόμοιο ενδιαφέρον έχει και η μελέτη της προσαρμογής της φαινολικής σύστασης των διεθνών ποικιλιών στις κλιματικές συνθήκες και τα εδάφη της ελληνικής επικράτειας.

Ενώ η ποικιλία του σταφυλιού επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τη φαινολική σύσταση του μετέπειτα κρασιού στο σύνολο των περιπτώσεων, η εκχύλιση κατά την οινοποίηση αποτελεί το στάδιο που δίνει την ευκαιρία στον οινοπαραγωγό να επέμβει και να διαφοροποιήσει τη σύσταση αυτή για να δημιουργήσει το επιθυμητό για αυτόν τελικό προϊόν για αυτό και κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθεί η εξέλιξη της εκχύλισης των φαινολικών κατά την οινοποίηση σε βιομηχανική κλίμακα ενός ερυθρού κρασιού.

Τέλος, μεγάλη σημασία έχει η σωστή αποθήκευση ενός κρασιού τόσο κατά την οινοποίηση όσο και την αποθήκευση-παλαίωση στη συσκευασία. Αν και η χρήση τροποποιημένων ατμοσφαιρών για την προστασία του κρασιού από οξειδωτικές δράσεις είναι ευρέως διαδεδομένη, εντούτοις υπάρχουν ελάχιστα ερευνητικά δεδομένα για το πώς η σύσταση της ατμόσφαιρας επηρεάζει την εξέλιξη του κρασιού. Συνήθως η επιλογή της τροποποιημένης ατμόσφαιρας στη βιομηχανία γίνεται εμπειρικά και με βάση τα εμπορικώς διαθέσιμα αέρια. Για το λόγο αυτό, μελετήθηκε η επίδραση διαφορετικής σύστασης τροποποιημένων ατμοσφαιρών στην εξέλιξη της φαινολικής σύστασης κρασιών κατά την αποθήκευση τους για ένα χρόνο.

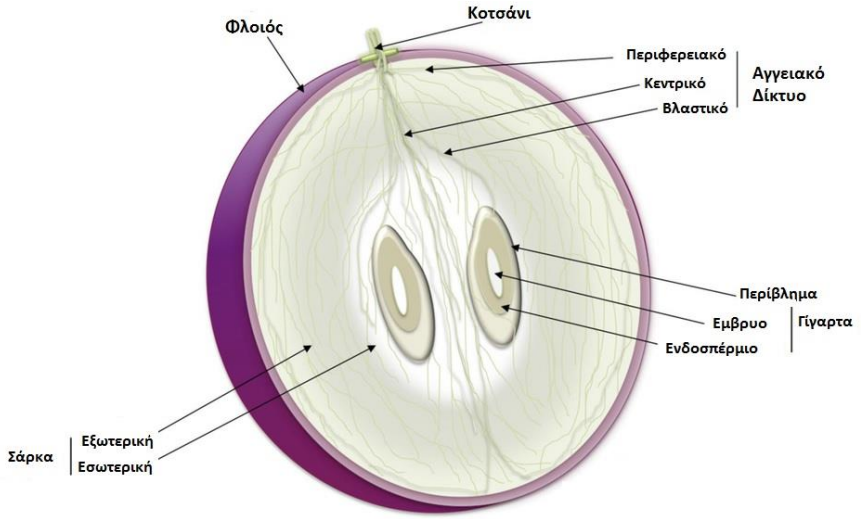
2 Το σταφύλι

2.1 Σύσταση του σταφυλιού

Το σταφύλι αποτελεί τον καρπό του ξυλώδους φυτού της αμπέλου, του βοτανικού γένους Vitis. Πιο συγκεκριμένα, το σταφύλι κυρίως από το είδος Vitis Vinifera, που περιλαμβάνει 5.000-10.000 διαφορετικές ποικιλίες, αποτελεί την πρώτη ύλη για την παραγωγή του οίνου σε παγκόσμια κλίμακα. Ως πρώτη ύλη ασκεί σπουδαία επίδραση στη σύσταση, στον τύπο και στην ποιότητα του οίνου.

Κάθε βότρυς (ή τσαμπί) του σταφυλιού απαρτίζεται από δύο κύρια μέρη:

- Το ξυλώδες μέρος που ονομάζεται βόστρυχας ή κοτσάνι και
- Τις ράγες (ή ρόγες), οι οποίες αποτελούν το εδώδιμο και οινοποιήσιμο τμήμα του σταφυλιού.



Εικόνα 2.1 Τα βασικά μέρη της ράγας του σταφυλιού

Η επί τις % αναλογία των δύο αυτών μερών του σταφυλιού δεν είναι σταθερή αλλά εξαρτάται από έναν αριθμό παραγόντων όπως η ποικιλία, οι κλιματολογικές συνθήκες, το έδαφος, η ηλικία των πρέμνων, ο χρόνος του τρυγητού κ.α. Στις οινοποιήσιμες ποικιλίες σταφυλιών η διακύμανση του μεγέθους των βοτρύων είναι ακόμα μεγαλύτερη σε σχέση με τα επιτραπέζια σταφύλια.

Κατά μέσο όρο πάντως, η σύνθεση του σταφυλιού κυμαίνεται στις παρακάτω αναλογίες:

- Βόστρυχοι 3-7 % κ.β. και 30 % κ.ο.
- Ράγες 93-97 % κ.β. και 70 % κ.ο.

Οι βόστρυχοι αποτελούνται κυρίως από νερό σε ποσοστό ακόμα και 90% κ.β. αρχικά ενώ στη συνέχεια κατά την ξυλοποίηση το ποσοστό αυτό μειώνεται σε 70-80 % και παράλληλα αυξάνεται το ποσοστό ξηρής ουσίας που φτάνει στο 25-30%. Το μεγαλύτερο μέρος της ξηράς ουσία αποτελείται από τις ξυλώδεις ουσίες (μέχρι 15%) ενώ το υπόλοιπο από τις ουσίες που εμφανίζονται στον Πίνακα 1.1 (Σουφλερός, 1997):

Συστατικά στους βόστρυχους	***περιεκτικότητα κ.β.***
ρητίνες	1 %
αζωτούχες ενώσεις	2.5 %
ανόργανες ενώσεις (τέφρα πλούσια σε κάλιο)	5 - 6 %
φαινολικά παράγωγα	1 - 3 %
άλατα οργανικών οξέων	2 - 3%

Πίνακας 2.1 % κατά βάρος περιεκτικότητα συστατικών στους βόστρυχους εκτός των ξυλώδων ιστών

Η σύσταση και συγκεκριμένα η περιεκτικότητα των βοστρύχων σε νερό, τανίνες και ανόργανα άλατα επηρεάζουν το παραγόμενο κρασί, ιδιαίτερα κατά την ερυθρή οινοποίηση, όπου η ζύμωση του γλεύκους γίνεται παρουσία των στεμφύλων.

Η ράγα αποτελείται από τα παρακάτω τρία μέρη:

- Τον φλοιό σε ποσοστό 10-20 % κ.β.
- Την σάρκα σε ποσοστό 74-87 % κ.β.
- Τα γίγαρτα σε ποσοστό 3-6 % κ.β. (τα οποία όμως σε ορισμένες περιπτώσεις απουσιάζουν εντελώς)

Ο φλοιός με τη σειρά του αποτελείται από τρία στρώματα: την εφυμενίδα, την επιδερμίδα και το υπόδερμα το οποίο περιέχει ***ανθοκυάνες***. Επιπλέον, ο φλοιός

περιέχει ελάχιστη ποσότητα σακχάρων και είναι πλούσιους σε αδιάλυτες πηκτίνες, σε κυτταρίνη και σε πρωτεΐνες. Το μηλικό και τρυγικό οξύ βρίσκονται σε μικρές συγκεντρώσεις ενώ το κιτρικό οξύ υπερέχει ποσοτικά σε σχέση με τα άλλα οξέα. Η σύσταση του φλοιού φαίνεται στον Πίνακα 1.2 (Κουράκου 1998):

συστατικά των φλοιών	***κ.β. σύσταση***
Νερό	75 - 80 %
Τανίνες	1 - 2 %
όξινες ενώσεις	1 - 1.5 %
ανόργανες ενώσεις	1.5 - 2 %
αζωτούχες ενώσεις	1.5 - 2 %
λοιπές ουσίες	10 - 15 %

Πίνακας 2.2 % κατά βάρος περιεκτικότητα συστατικών των φλοιών της ράγας των σταφυλιών

Η σάρκα αποτελεί το τμήμα εκείνο της ράγας που περιέχει σχεδόν αποκλειστικά τον χυμό του σταφυλιού, ο οποίος αφού παραληφθεί με κατάλληλη επεξεργασία θα αποτελέσει το προς οινοποίηση γλεύκος. Για το λόγο αυτό, η χημική σύσταση της σάρκας είναι σε μεγάλο ποσοστό ίδια με τη σύσταση του γλεύκους (Souquet et al., 2000).

Τα γίγαρτα βρίσκονται στο ενδοκάρπιο, το οποίο δε διακρίνεται με σαφή τρόπο από τη σάρκα. Ο ιστός του γίγαρτος είναι πλούσιος σε εφεδρικές ελαιώδεις και γλυκεροφοσφωρικές ουσίες. Τα γίγαρτα αποτελούν πλούσια πηγή τανινών και φαινολικών ενώσεων αλλά περιέχουν και ελαιώδεις ουσίες οι οποίες αποτελούν τη βάση για την εκδήλωση βουτυρικής ζύμωσης, η οποία προκαλεί αρνητική χαρακτηριστική οσμή. Η σύσταση των γιγάρτων δίνεται στον Πίνακα 1.3:

συστατικά των γιγάρτων	*κ.β. σύσταση*
Νερό	25- 45 %
Υδρογονάνθρακες	34 - 36 %
ελαιώδης ουσίες	13 -20 %
Τανίνες	4 - 6 %
αζωτούχες ενώσεις	4 - 6.5 %
ανόργανες ουσίες	2 - 4 %
λιπαρά οξέα	1 %

Πίνακας 2.3 % κατά βάρος περιεκτικότητα συστατικών στα γίγαρτα της ράγας του σταφυλιού

2.2 Ωρίμανση του σταφυλιού

Κατά τη διάρκεια της πρώτης περιόδου που είναι γνωστή και ως στάδιο του πράσινου σταφυλιού ή της άγουρης ράγας αρχίζει ο σχηματισμός του καρπού (ρόγα), ο ποίος λειτουργεί σαν όργανο που επεξεργάζεται και αφομοιώνει άμυλο. Σε όλο το πρώτο στάδιο έχουμε αύξηση του βάρους και του όγκου του καρπού. Τα οξέα που περιέχονται αυξάνονται φτάνοντας σε περιεκτικότητα 20 g/kg σταφυλιού ενώ τα σάκχαρα παραμένουν σταθερά και στο ίδιο περίπου ποσοστό με τα οξέα (20-25 g/kg σταφυλιού).

Η δεύτερη περίοδος που αποτελεί το στάδιο του περκασμού (veraison)κατά το οποίο η ρόγα αλλάζει χρώμα, φουσκώνει και γίνεται ελαστική. Οι ερυθρές χρωστικές εμφανίζονται στις ρόγες των ερυθρών ποικιλιών και οι αντίστοιχες χρωστικές στις λευκές ποικιλίες. Το φαινόμενο της αλλαγής χρώματος είναι απότομο, έτσι ώστε μία ρόγα να αλλάζει χρώμα σε μία μέρα ενώ για το σύνολο των ρογών του σταφυλιού μιας περιοχής χρειάζονται περίπου 15 μέρες. Ξεκινά η αύξηση και η συσσώρευση των σακχάρων που με τη σειρά της προκαλεί οσμωτική έλξη του νερού και άρα διόγκωση της ρόγας.. Τα οξέα μειώνονται τόσο λόγω της αραίωσης όσο και της εξουδετέρωσης τους από το νερό και τα ανόργανα άλατα που περιέχει.

Το στάδιο της ωρίμανσης (maturation) που ακολουθεί εκτείνεται από την ολοκλήρωση του περκασμού ως την πλήρη ωρίμανση η οποία δεν έχει ακριβή ορισμό αλλά μπορεί να οριστεί με διαφορετικούς τρόπους. Με βάση την οξύτητα, την περιεκτικότητα σε σάκχαρα, την περιεκτικότητα σε φαινολικά ή και τον όγκο παραγωγής. Δύο συνήθεις δείκτες που χρησιμοποιούνται στην πράξη είναι η σχέση των σακχάρων προς τα οξέα (ένδειξη ωρίμανσης) και το πηλίκο της συγκέντρωσης του τρυγικού οξέος προς το άθροισμα των συγκεντρώσεων του τρυγικού και του μηλικού οξέος. Η περίοδος της ωρίμανσης διαρκεί 40 με 50 μέρες.

Η υπερωρίμανση είναι η περίοδος που ακολουθεί την πλήρη ωρίμανση, κατά την οποία έχουμε απώλεια νερού και συμπύκνωση του χυμού. Έχει μεγάλη σημασία στην οινοποίηση κυρίως γλυκών οίνων και περιλαμβάνει ορισμένες φορές την προσβολή του αμπελώνα από το μύκητα *Botrytis cinerea* μια διαδικασία που είναι γνωστή και ως «ευγενής σήψη» (Τσακίρης, 1998).

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την ωρίμανση των σταφυλιών και κατ' επέκταση την ποιότητα του οίνου μπορούν να διακριθούν σε σταθερούς των οποίων η επίδραση δεν μεταβάλλεται από σοδειά σε σοδειά και σε μεταβλητούς οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για τη ποιότητα μιας συγκεκριμένης σοδειάς.

Στους σταθερούς παράγοντες περιλαμβάνονται η ποικιλία της αμπέλου, το υποκείμενο δηλαδή το ένριζο τμήμα του φυτού πάνω στο οποίο εμβολιάζεται η ποικιλία, το κλίμα και η σύσταση του εδάφους. Στους μεταβλητούς περιλαμβάνονται οι καιρικές συνθήκες, οι αποστάσεις φύτευσης, οι καλλιεργητικές τεχνικές καθώς και τυχόν ασθένειες που είναι πιθανόν να προσβάλλουν το αμπέλι (Σουφλερός, 1997, Cagnasso et al., 2008).

2.3 Εξέλιξη των φαινολικών συστατικών κατά την ωρίμανση του σταφυλιού

Οι ανθοκυάνες στις ερυθρές ποικιλίες αρχίζουν να εμφανίζονται στο στάδιο του περκασμού στη ράγα. Σχηματίζονται κατά κύριο λόγο στο υπόδερμα του φλοιού, όπως προαναφέρθηκε, και συσσωρεύονται στα χυμοτόπια ενώ σε ελάχιστες

περιπτώσεις εμφανίζονται και στην σάρκα. Οι αντίστοιχες χρωστικές στα λευκά ανήκουν στις φλαβόνες.

Για τον σχηματισμό των ανθοκυανών απαιτείται ένα ορισμένο ποσό ηλιακής ακτινοβολίας. Για το λόγο αυτό το μέρος των σταφυλιών που βρίσκεται στη σκιά είναι λιγότερο χρωματισμένο σε σχέση με εκείνο που είναι εκτεθειμένο στον ήλιο. Επιπροσθέτως, οι ερυθρές ποικιλίες για να χρωματιστούν κατάλληλα απαιτούν και ικανοποιητικές θερμοκρασίες. Έτσι, το όριο καλλιέργειας ερυθρών ποικιλιών περιορίζεται σε μικρότερο γεωγραφικό πλάτος σε σχέση με τις λευκές ποικιλίες. Εντούτοις, οι πολύ υψηλές θερμοκρασίες δεν ευνοούν το σχηματισμό ανθοκυανών. Σε θερμοκρασίες από 35° C και άνω έχει παρατηρηθεί ότι προκαλείται αναστολή της παραγωγής χρωστικών ουσιών. Για ημερήσιες θερμοκρασίες 25° C σε συνδυασμό με χαμηλές νυκτερινές θερμοκρασίες, ο χρωματισμός είναι ικανοποιητικός. Είναι αξιοσημείωτο, πως με μεγαλύτερο ημερήσιο εύρος θερμοκρασιών παρατηρείται αυξημένη παραγωγή χρωστικών.

Κατά το στάδιο της ωρίμανσης παράγονται και οι ταννίνες ή λευκοανθοκυάνες, το μεγαλύτερο ποσοστό των οποίων βρίσκεται στα γίγαρτα (65%), μια σημαντική ποσότητα στους βόστρυχες (22%), στον φλοιό (12%) ενώ η σάρκα περιέχει μόνο το 1 % περίπου των τανινών. Η περιεκτικότητα του φλοιού σε ταννίνες είναι σταθερή κατά τη περίοδο του περκασμού και της ωρίμανσης με όσες αυξομοιώσεις παρατηρούνται να οφείλονται στις μεταβολές της θερμοκρασία και την ηλιοφάνειας. Οι τανίνες των γιγάρτων περνούν από ένα μέγιστο στα μισά της περιόδου του περκασμού και κατόπιν ελαττώνονται γρήγορα, ενώ είναι σε σταθερή περιεκτικότητα κατά το στάδιο της ωρίμανσης.

Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή ανθοκυανών και γενικότερα των χρωστικών είναι η χρήση λιπασμάτων και η αύξηση στρεμματικών αποδόσεων. Και στις δύο περιπτώσεις έχει παρατηρηθεί μείωση τόσο των χρωστικών όσο και των ταννινών (Τσακίρης 1998, Cagnasso et al., 2008).

2.4 Χαρακτηριστικές καλλιεργήσιμες ποικιλίες

Υπάρχουν 60 διαφορετικά είδη αμπέλου ανά τον κόσμο αλλά ελάχιστα είναι αυτά που χρησιμοποιούνται στη μοντέρνα αμπελουργία. Τα πιο σημαντικά είναι:

Vitis Vinifera: Αποτελεί το κύριο ευρασιατικό είδος. Παράγει σχεδόν όλα τα σταφύλια που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή κρασιού, εδώ και πολλές χιλιάδες χρόνια. Όπως προαναφέρθηκε υπολογίζεται ότι υπάρχουν μεταξύ 5.000-10.000 ποικιλίες V. Vinifera.

Vitis riparia, Vitis rupestris, Vitis berlandieri: Τα τρία αυτά είδη είναι ενδημικά της Βορείου Αμερικής και σπάνια καλιεργούνται για την παραγωγή κρασιού. Παρόλα αυτά, σε αντίθεση με το V. Vinifera είναι ανθεκτικά στο παράσιτο της φυλλοξήρας που προσβάλει τις ρίζες της αμπέλου και έτσι χρησιμοποιούνται για να παρέχουν τα συστήματα ρίζας πάνω στα οποία μπολιάζονται οι άμπελοι V. Vinifera.

Ένας πληθυσμός αμπελιών ανήκει στην ίδια ποικιλία αν η καταγωγή κάθε φυτού ακολουθεί μια σειρά μοσχευμάτων που έχουν ληφθεί μέσω του ίδιου, μοναδικού αρχικού φυτού. Δύο άμπελοι προέρχονται από διαφορετικές ποικιλίες όταν ανιχνευθούν σε αυτές δυο διαφορετικές φύτρες. Οι 5.000-10.000 διαφορετικές ποικιλίες V. Vinifera που υπάρχουν σήμερα, διαφέρουν μεταξύ τους στο χρώμα τη γεύση και τη σύνθεση των σταφυλιών τους. Οι ποικιλίες σταφυλιού διαφέρουν, ακόμα, στο πόσο καλά ωριμάζουν σε διαφορετικό περιβάλλον, στην ανθεκτικότητα τους σε παράσιτα και ασθένειες, την παραγωγή τους καθώς και σε άλλους παράγοντες που μπορεί να έχουν σημασία για έναν αμπελουργό (Robinson et al., 2012).

Παρά το ότι υπάρχουν χιλιάδες διαφορετικές ποικιλίες σταφυλιού, οι περισσότερες αφορούν συγκεκριμένες περιοχές. Ως διεθνείς ποικιλίες χαρακτηρίζονται οι ποικιλίες που αναπτύχθηκαν επιτυχώς σε περιοχές πέραν τις αρχικής τους. Οι βασικότερες από τις οποίες είναι οι ακόλουθες: Το Chardonnay, το Riesling και το Sauvignon Blanc από λευκές ποικιλίες και το Cabernet Sauvignon, το Merlot, το Syrah και το Pinot Noir από τις ερυθρές ποικιλίες. Άλλες παγκοσμίως γνωστές ποικιλίες που ευδοκιμούν όμως, κυρίως σε μια συγκεκριμένη περιοχή αποτελούν: το Tempranillo και η Grenache στην Ισπανία, το Sangiovese στην Ιταλία, το Malbec στην Αργεντινή, το

Pinotage στη Νότια Αφρική και το Gewurztraminer στη Γερμανία και την Αυστρία. Στην Ελλάδα υπάρχουν περισσότερες από 200 γηγενείς ποικιλίες, ελάχιστες από τις οποίες καλλιεργούνται αλλού. Κάποιες από τις πιο σημαντικές και διεθνώς αναγνωρισμένες ελληνικές ποικιλίες αποτελούν το Μοσχοφίλερο (μια ερυθρωπή ποικιλία που παράγει λευκό κρασί όμως), το Ασύρτικο, επίσης λευκή ποικιλία καθώς και το Ξινόμαυρο και το Αγιωργίτικο που ανήκουν στις ερυθρές ποικιλίες.

Παρακάτω αναφέρονται κάποιες βασικές πληροφορίες για τις ποικιλίες που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία της παρούσας διπλωματικής εργασίας, δηλαδή για το Ασύρτικο, το Αγιωργίτικο, το Cabernet Sauvignon και το Merlot.

2.4.1 Ασύρτικο

Αποτελεί ποικιλία του Αιγαίου. Καλλιεργείται σε μεγάλη έκταση στην Σαντορίνη αλλά και σε άλλες περιοχές της Ελλάδας διάσπαρτα (Χαλκιδική, Στερεά Ελλάδα) καθώς έχει τη δυνατότητα να προσαρμόζεται εύκολα σε διαφορετικές κλιματικές συνθήκες αλλά και σε εδάφη διαφορετικής σύστασης. Το ηφαιστειογενές έδαφος της Σαντορίνης, προσδίδει στην ποικιλία ιδιαίτερα χαρακτηριστικά, που μεταδίδονται στο κρασί. Κρασιά που παράγονται από Ασύρτικο (μπορούν να συμμετέχουν και οι ποικιλίες Αθήρι και Αηδάνι) στην Σαντορίνη φέρουν την ένδειξη Ο.Π.Α.Π. (Ονομασία Προέλευση Ανωτέρας Ποιότητας)/Π.Ο.Π.. Στην Σαντορίνη αλλά και σε άλλες περιοχές, οι ισχυροί άνεμοι μπορούν να προκαλέσουν αναστολή της φωτοσύνθεσης, με αποτέλεσμα η διαδικασία της ωρίμανσης να επιβραδύνεται και τα επίπεδα της οξύτητας να παραμένουν υψηλά. Ταυτόχρονα, τα σταφύλια παραμένοντας αφυδατωμένα στο αμπέλι, συσσωρεύουν σάκχαρα. Για την παραγωγή γλυκού κρασιού (γνωστό και ως Vinsanto) τα σταφύλια συλλέγονται όψιμα και «λιάζονται» ως και 14 μέρες. Τα κρασιά αυτά παλαιώνονται σε βαρέλια παλαιάς δρυός (τουλάχιστον για 2 χρόνια τα γλυκά κρασιά) και οι στρεμματικές αποδόσεις δεν πρέπει να ξεπερνάνε τα 700 kg. Το Ασύρτικο αποδίδει ξηρά και γλυκά λευκά κρασιά, έντονα συμπυκνωμένα και αρωματικά, υψηλής οξύτητας και υψηλής περιεκτικότητας σε αλκοόλ (Robinson, 2012).

2.4.2 Αγιωργίτικο

Το Αγιωργίτικο αποτελεί μια πολυδύναμη, ερυθρή ελληνική ποικιλία που καλλιεργείται σχεδόν κατά αποκλειστικότητα στην περιοχή της Νεμέας, που αποτελεί επίσης ζώνη ΟΠΑΠ/ΠΟΠ, και υπόκειται σε περιορισμό απόδοσης που δεν μπορεί να ξεπερνά τα 800 kg/στρέμμα ενώ απαιτείται παλαίωση τουλάχιστον ενός χρόνου σε βαρέλι. Συνήθως προτιμώνται βαρέλια νέας δρυός. Οι αμπελώνες τις Νεμέας απλώνονται σε διαφορετικά υψόμετρα από 230 ως 900 μέτρα. Οι καλύτεροι καρποί θεωρείται ότι προέρχονται από αμπελώνες που βρίσκονται σε μεσαίο υψόμετρο διατηρώντας μια ισορροπία συμπύκνωσης και οξύτητας. Τα σταφύλια των χαμηλότερων πλαγιών μπορεί να είναι πιο συμπυκνωμένα και χαμηλής οξύτητας και συνήθως μετατρέπονται σε κρασιά πρόωρης κατανάλωσης. Από την άλλη, τα σταφύλια από τις ψηλότερες πλαγιές έχουν υψηλή οξύτητα και χαμηλότερο τανικό περιεχόμενο, με αποτέλεσμα να χρησιμοποιούνται κυρίως σε χαρμάνια ερυθρών και στην παραγωγή ροζέ κρασιών (Κουράκου, 1998). Γενικά, τα κρασιά από Αγιωργίτικο έχουν βαθύ ρουμπινί χρώμα, είναι πλούσια σε τανίνες, έχουν μέτρια οξύτητα και αρώματα κόκκινων φρούτων και μπαχαρικών.

Εικόνα 2.2 Ώριμός βότρυς (τσαμπί) από την ποικιλία Αγιωργίτικο λίγο πριν τον τρυγητό

2.4.3 Cabernet Sauvignon

Το Cabernet Sauvignon είναι ίσως η πιο γνωστή ερυθρή ποικιλία παγκοσμίως και αποτελεί διασταύρωση των ποικιλιών Cabernet Franc και Sauvignon Blanc.

Προέρχεται από το Bordeaux αλλά καλλιεργείται ευρέως σε όλον το Νέο Κόσμο και στις περισσότερες αμπελουργικές περιοχές. Ανθίζει αργά, μειώνοντας την πιθανότητα ζημιάς από τους παγετούς της άνοιξης. Τα τσαμπιά έχουν ανάριο σχηματισμό και τα σταφύλια παχύ φλοιό, με υψηλή αναλογία φλοιού/σάρκας ενώ είναι και ανθεκτικά στη σήψη και τα έντομα. Η υπερωρίμανση επηρεάζει αρνητικά την οξύτητα του και τα αρωματικά χαρακτηριστικά του. Ωριμάζει κυρίως σε θερμά κλίματα αλλά έχει καλή προσαρμογή και σε ψυχρότερα κλίματα με στρεμματικές αποδόσεις σχετικά μικρές. Προσφέρει παραγωγή έντονα τανικών ερυθρών κρασιών, συμπυκνωμένων, με υψηλή οξύτητα, που αντιδρούν καλά στην ωρίμανση σε δρύινα βαρέλια και αναπτύσσουν πολυπλοκότητα στην φιάλη (Robinson, 2012).

2.4.4 Merlot

Το Merlot προέρχεται και αυτό από το Bordeaux, καλλιεργείται επίσης ευρέως στις περισσότερες αμπελουργικές περιοχές και είναι κοινή πρακτική η δημιουργία χαρμανιών του με Cabernet Sauvignon. Έχει λεπτότερο φλοιό και παράγει κρασιά με χαμηλότερο τανικό περιεχόμενο και λιγότερο έντονο χρώμα σε σχέση με το Cabernet. Ακόμα, έχει υψηλότερα επίπεδα σακχάρων και χαμηλότερη οξύτητα. Ωριμάζει σχετικά πρόωρα με αποτέλεσμα να είναι ευάλωτο στους παγετούς αλλά και στην προσβολή του από περονόσπορο. Έχουν επικρατήσει δυο διαφορετικοί τρόποι οινοποίησης του Merlot: Ο ένας βασίζεται στην πρώιμη και ο άλλος στην όψιμη συγκομιδή του, δίνοντας κρασιά πολύ διαφορετικών προφίλ, με αποτέλεσμα τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του να διαφέρουν ανάλογα με το χρόνο τρυγητού (Τσέτουρας 2008, Robinson 2012).

3 Η χημεία του κρασιού

3.1 Αλκοολική ζύμωση

Η αλκοολική ζύμωση είναι η αναερόβια εξώθερμη αντίδραση μετασχηματισμού των σακχάρων, κυρίως της γλυκόζης και της φρουκτόζης, σε αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα. Η διεργασία αυτή που πραγματοποιείται από ζύμες αλλά και από ορισμένα βακτήρια όπως ο *Zymomonas mobilis* μπορεί να περιγραφεί από το γενικό τύπο αντίδρασης:

$$\boldsymbol{C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2\,CH_3CH_2OH + 2\,CO_2}$$

Παρόλα αυτά, η αλκοολική ζύμωση στο κρασί είναι μια πολύ πιο περίπλοκη διεργασία. Ενώ η παραπάνω γενική αντίδραση λαμβάνει χώρα, ένα πλήθος άλλων βιοχημικών, χημικών και φυσιοχημικών διεργασιών πραγματοποιούνται παράλληλα ώστε το γλεύκος να μετατραπεί τελικά σε κρασί. Εκτός της αιθανόλης, πολλές άλλες ενώσεις παράγονται κατά την αλκοολικά ζύμωση όπως ανώτερες αλκοόλες, εστέρες, γλυκερόλη, σουκινικό οξύ, διακετύλιο, ακετοΐνη και 2,3-βουτανεδιόλη. Ταυτόχρονα, και ορισμένα άλλα συστατικά του γλεύκους, εκτός των σακχάρων, μετασχηματίζονται από το μεταβολισμό των ζυμών. Χωρίς την παρουσία αυτών των παραπροϊόντων, το κρασί θα είχε πολύ περιορισμένο οργανοληπτικό ενδιαφέρον (Zamora, 2009).

Η μεταβολική διαδικασία της αλκοολικής ζύμωσης όπως και η διαδικασία της αναπνοής των ζυμών αρχίζουν με τον ίδιο τρόπο αποικοδόμησης της γλυκόζης προς πυροσταφυλικό οξύ. Ως δευτερέυον προιόν της ζύμωσης παράγεται επίσης και γλυκερόλη μέσω της μεταβολικής διαδικασίας της ***πυροσταφυλικής ζύμωσης***. Το κρασί περιέχει περίπου 8 g γλυκερόλης ανά 100 g αιθανόλης. Το μεγαλύτερο ποσοστό της γλυκερόλης παράγεται κατά το πρώτο στάδιο της ζύμωσης και στη συνέχεια ο ρυθμός της μειώνεται δραστικά, χωρίς ποτέ να μηδενιστεί. (Ribérau-Gayon et al., 2006)

Στην αρχή της οινοποίησης ένα πλήθος διαφορετικών ειδών ζυμών μπορεί να είναι παρών στο γλεύκος. Αυτή η βιοποικιλότητα εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως η ποικιλία του σταφυλιού, το στάδιο ωρίμανσης κατά τον τρυγητό, τις

αντιμυκητιακές δράσεις κατά την καλλιέργεια, τις κλιματικές συνθήκες της σοδειάς, τις μολύνσεις από μύκητες και γενικά τις αμπελουργικές μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν κατά την καλλιέργεια (Sapis-Domerq, 1980, Pretorius et al., 1999). Επιπλέον παράγοντες, που επηρεάζουν την τελική σύσταση των ζυμών πριν την αλκοολική ζύμωση, είναι όλες οι επαφές του σταφυλιού, κατά τον τρυγητό, τις μεταφορές του σταφυλιού καθώς και τις προζυμωτικές διεργασίες στο οινοποιείο (Constantí et al., 1997, Mortimer and Polsinelli, 1999).

Διαφορετικές ζύμες συμμετέχουν στην αυθόρμητη αλκοολική ζύμωση ακόμα και υπό την παρουσία διοξειδίου του θείου (θειώδης ανυδρίτης) (Beltran et al., 2002). Συνήθως τα είδη Kloeckera, Hanseniaspora και Candida κυριαρχούν στα πρώτα στάδια της ζύμωση ενώ κατά τα ενδιάμεσα στάδια επικρατούν τα είδη Pichia και Metschnikowia. Στα τελευταία στάδια, επικρατεί κυρίως ο Saccharomyces cerevisiae λόγω της αντοχής του σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης. Κάποιες άλλες ζύμες που μπορεί να είναι παρούσες κατά την αλκοολική ζύμωση αλλά και στο τελικό προϊόν μπορεί να έχουν αρνητική οργανοληπτική επίδραση στο κρασί. Για να αποτραπεί το φαινόμενο αυτό, προστίθεται θειώδης ανιδύτρης και εμβολιάζεται το γλεύκος με ορισμένα στελέχη ξηρών ζυμών (Saccharomyces cerevisiae). Η δραστική επιλεκτική δράση του θειώδη ανιδρύτη στην ανάπτυξη των ζυμών σε συνδυασμό με την υψηλή αντοχή του S. cerevisiae ευνοεί την ανάπτυξη του και την αύξηση του πληθυσμού του.

Τα τελευταία χρόνια τα περισσότερα οινοποιεία επιλέγουν τον εμβολιασμό με ξηρές ζύμες ώστε να εξασφαλίσουν ότι η αλκοολική ζύμωση θα πραγματοποιηθεί με μεγαλύτερο έλεγχο. Αντίθετα, κάποια οινοποιεία, κατά κύριο λόγω παραδοσιακά κελάρια (wine-cellars) συνεχίζουν να πραγματοποιούν μόνο την αυθόρμητη αλκοολική ζύμωση καθώς θεωρούν ότι ενισχύει την πολυπλοκότητα των κρασιών τους (Ribérau-Gayon et al., 2006, Zamora, 2009).

3.2 Μηλογαλακτική ζύμωση

Η μηλογαλακτική ζύμωση στο κρασί είναι η ενζυμική μετατροπή του L-μηλικού οξέος σε L-γαλακτικό οξύ, μια δευτερεύουσα δράση που συνήθως ακολουθεί την αλκοολική ζύμωση ενώ σε κάποιες περιπτώσεις μπορεί να συμβαίνουν και παράλληλα. Η μετατροπή του μηλικού οξέος σε γαλακτικό οξύ δεν είναι πραγματική

ζύμωση αλλά μια ενζυμική αντίδραση που πραγματοποιείται από τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος, όταν έχει ολοκληρωθεί η εκθετική φάση ανάπτυξής τους (Constantini et al., 2009).

Η μηλογαλακτική ζύμωση πραγματοποιείται κυρίως από το βακτήριο Oenococcus oeni, ένα είδος το οποίο μπορεί να αντέξει στο χαμηλό pH (<3,5), στην υψηλή αλκοόλη (>10 vol. %) καθώς και στα υψηλά επίπεδα διοξειδίου του θείου (50 mg/L), συνθήκες που υπάρχουν στο κρασί. Πιο ανθεκτικά στελέχη του Lactobacillus, του Leuconostoc και του Pediococcus μπορούν, επίσης, να αναπτυχθούν στο κρασί και να συνεισφέρουν στη μηλογαλακτική ζύμωση, ειδικά αν το pH του κρασιού υπερβαίνει την τιμή του 3,5 (Davis et al., 1986).

Τα πιο σημαντικά οφέλη της μηλογαλακτικής ζύμωσης είναι η μείωση της οξύτητας σε κρασιά πολύ υψηλής οξύτητας ψυχρών κλιμάτων ενώ ακόμα το γαλακτικό οξύ και τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος συνεισφέρουν στα γευστικά, στα αρωματικά χαρακτηριστικά και στην πολυπλοκότητα του κρασιού. Επιπλέον, βελτιώνει την μικροβιακή σταθερότητα του κρασιού (Lonvaud-Funel 1999, Moreno-Arribas, and Polo 2005).

Από την άλλη πλευρά, η μη ελεγχόμενη μηλογαλακτική ζύμωση παρουσιάζει το ρίσκο αλλοίωσης του κρασιού λόγω παραγωγής ουσιών ανεπιθύμητων οργανοληπτικών χαρακτηριστικών (αρωματικών και γευστικών) όπως το οξικό οξύ και ορισμένα πτητικά φαινολικά. Μπορεί, επίσης, να παράγει και ουσίες που αποτελούν κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία όπως τον καρβαμιδικό αιθυλεστέρα και βιογενείς αμίνες (Constantini et al., 2009).

Στα ελληνικά γλεύκη η ποσότητα του μηλικού οξέος που περιέχεται είναι πολύ μικρή κι πολλές φορές ελάχιστη, λόγω της καλής ωρίμανσης των σταφυλιών όμως η μηλογαλακτική ζύμωση σχεδόν πάντα αναπτύσσεται. Μετά τη διάσπαση του μηλικού, ακολουθεί η προσβολή του κιτρικού οξέος του κρασιού με παραγωγή οξικού οξέος που αυξάνει την πτητική οξύτητα (Τσέτουρας, 1998).

3.3 Η χημική σύσταση του κρασιού

Το κρασί είναι ένα πολυσύνθετο υδρο-αλκοολικό διάλυμα που περιέχει ένα σύνολο 800-1000 χημικών ενώσεων. Τα δύο κύρια συστατικά από τα οποία αποτελείται σε

ποσοστό 98-99% το κρασί είναι το νερό και η αιθανόλη. Εντούτοις, τα βασικά αρωματικά και γευστικά χαρακτηριστικά του κρασιού εξαρτώνται από ένα πλήθος τουλάχιστον 20 επιπλέον ενώσεων, ενώ οι ελαφριές οργανοληπτικές διαφορές ανάμεσα σε κρασιά από διαφορετικές ποικιλίες, οφείλονται σε έναν ακόμα μεγαλύτερο αριθμό συστατικών που περιέχονται στο κρασί (Jackson, 1998).

Κυρίαρχο ρόλο στα φυσιολογικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του κρασιού παίζουν τα φαινολικά συστατικά. Καθώς αποτελούν βασικό αντικείμενο μελέτης της παρούσας διπλωματικής εργασίας θα αναλυθούν ξεχωριστά σε επόμενο κεφάλαιο.

Ορισμένες από τις βασικότερες κατηγορίες ενώσεων που εμφανίζονται στο κρασί αναλύονται παρακάτω:

3.3.1 Αλκοόλες

Η αιθανόλη, όπως προαναφέρθηκε , αποτελεί το κύριο προϊόν της αλκοολικής ζύμωσης και είναι η πιο σημαντική αλκοόλη του οίνου. Σε συνήθεις συνθήκες οινοποίησης η περιεκτικότητα σε αιθανόλη ανέρχεται έως και 14-15% vol, ενώ υψηλότερες συγκεντρώσεις μπορούν να επιτευχθούν με τη προσθήκης σακχάρων ή συμπυκνωμένου γλεύκος, μια διαδικασία που ονομάζεται ενίσχυση του κρασιού. Οι βασικοί παράγοντες που ελέγχουν την παραγωγή αιθανόλης είναι το περιεχόμενο σε σάκχαρα, η θερμοκρασία της οινοποίησης και το γένος των ζυμών που χρησιμοποιούνται. Η μεγάλη αντοχή του S. Cerevisiae στην αιθανόλη δικαιολογεί την ευρεία επικράτηση της χρήσης του στη βιομηχανία.

Η παρουσία της αιθανόλης είναι πρωτεύουσας σημασίας για την σταθεροποίηση του κρασιού, για την παλαίωση του, καθώς και για τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του. Η ιδιότητα της να σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου την καθιστά ως έναν αφυδατικό παράγοντα που επιδρά κατά την κροκίδωση υδρόφιλων κολλοειδών, πρωτεϊνών και πολυσακχαριτών. Παράλληλα, της προσδίδει απολυμαντικό χαρακτήρα, ο οποίος σε συνδυασμό με την οξύτητα επιτρέπει στο κρασί να διατηρηθεί σε βάθος χρόνου. Κατά την παλαίωση αντιδρά, με αργό ρυθμό, με οργανικά οξέα για την παραγωγή εστέρων ενώ επηρεάζει και την σταθερότητα αυτών. Τέλος, αντιδρά αργά με αλδεΰδες για την παραγωγή ακεταλών.

Επιπλέον, μέσω της επίδρασης που έχει στη μεταβολική δραστηριότητα των ζυμών καθορίζει το είδος και την ποσότητα των αρωματικών ενώσεων που παράγονται και παράλληλα αποτελεί αντιδρών αντιδρόν για το σχηματισμό ορισμένων σημαντικών πτητικών ουσιών.

Η αιθανόλη αποτελεί βασικό συνδιαλύτη σε συνδυασμό με το νερό για την εκχύλιση συστατικών από τα σταφύλια (με πιο βασικά τα φαινολικά συστατικά) και πιο συγκεκριμένα για την διάλυση μη πολικών αρωματικών ενώσεων. Υποβοηθά ακόμα, τη διάλυση πτητικών ενώσεων που παράγονται κατά τη ζύμωση καθώς και κατά την παλαίωση σε ξύλινα βαρέλια ενώ εμποδίζει και την απομάκρυνση αρωματικών ενώσεων με το διοξείδιο του άνθρακα κατά τη ζύμωση.

Η μεθανόλη είναι παρούσα στο κρασί σε πολύ μικρές περιεκτικότητες (30-35 mg/l) και δεν ανιχνεύεται οργανοληπτικά. Μεταβολίζεται σε φορμαλδεΰδη και φορμικό οξύ τα οποία έχουν τοξική δράση και γι' αυτό η παρουσία της στο κρασί είναι πάντα σε συγκεντρώσεις πολύ μικρότερες του επιτρεπτού ορίου. Παράγεται κυρίως από την διάσπαση των πηκτινών.

Ανώτερες αλκοόλες βρίσκονται συνήθως σε μικρές συγκεντρώσεις με μόνη εξαίρεση της εξανόλες. Αποτελούν συνήθως παραπροϊόντα της ζύμωσης και μπορούν να συνεισφέρουν μέχρι και το 50% των αρωματικών συστατικών του οίνου. Επιπρόσθετα, στον οίνο περιέχονται κάποιες διόλες και πολυόλες (ή πολυ-αλκοόλες), με σημαντικότερη πολυόλη, την γλυκερόλη. Η γλυκερόλη είναι συνήθως η ουσία με την μεγαλύτερη συγκέντρωση μετά το νερό και την αιθανόλη, επιδρά στο ιξώδες του κρασιού και προσδίδει μια γλυκιά γεύση στα ξηρά κρασιά, όταν η συγκέντρωση της ξεπερνά το όριο ανίχνευσης (Ribérau-Gayon et al., 2006).

3.3.2 Σάκχαρα

Τα βασικά σάκχαρα που περιέχονται στο σταφύλι είναι η γλυκόζη και η φρουκτόζη, με τα υπόλοιπα σάκχαρα που υπάρχουν να βρίσκονται σε ίχνη. Συνήθως εμφανίζονται σε ίση ποσότητα με τον λόγο γλυκόζη/φρουκτόζη περίπου ίσο με 0,95 στο γλεύκος. Η βασική οινική ζύμη Saccharromyces cerevisiae αντλεί το μεγαλύτερο μέρος της μεταβολικής ενέργειας από την γλυκόζη και την φρουκτόζη και επειδή η ικανότητα της να ζυμώνει άλλες ουσίες είναι περιορισμένη, είναι σημαντικό η

μεγαλύτερη ποσότητα των θρεπτικών συστατικών στο γλεύκος να είναι σε μορφή γλυκόζης και φρουκτόζης. Τα ζυμώσιμα σάκχαρα εκτός της παραγωγής αιθανόλης ως βασικού προϊόντος της αλκοολικής ζύμωσης μπορούν να δώσουν ως παραπροϊόντα υψηλότερες αλκοόλες, εστέρες λιπαρών οξέων καθώς και αλδεΰδες.

Όσα σάκχαρα δεν ζυμωθούν αναφέρονται ως υπολειπόμενα σάκχαρα. Στα ξηρά κρασιά τα υπολειπόμενα σάκχαρα αποτελούνται κυρίως από πεντόζες, όπως αραβινόζη και ξυλόζη καθώς και από μικρά ποσοστά αζύμωτης γλυκόζης και φρουκτόζης. Η περιεκτικότητα των υπολειπόμενων σακχάρων στα ξηρά κρασιά είναι συνήθως χαμηλότερη από 1,5 g/L, και μπορεί να αυξηθεί ελαφρά κατά την παλαίωση σε δρύινα βαρέλια λόγω της διάλυσης γλυκοζιδίων από το ξύλο και της διάσπασής τους. (Ribérau-Gayon et al., 2006, Moreno-Arribas, 2009).

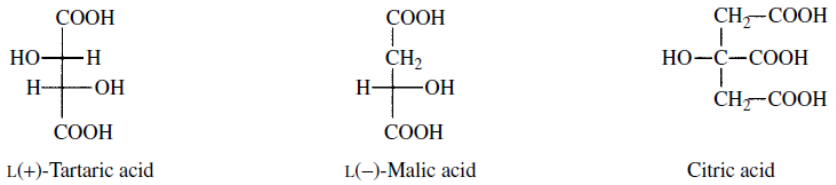
3.3.3 Οργανικά Οξέα

Τα οργανικά οξέα έχουν σημαντική συνεισφορά στην σύσταση, στην σταθερότητα και στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των κρασιών, και ιδιαίτερα των λευκών κρασιών ενώ παράλληλα βελτιώνουν τη μικροβιολογική και φυσικοχημική σταθερότητα του οίνου. Λευκά νεαρά κρασιά με υψηλή οξύτητα εμφανίζουν μεγαλύτερες δυνατότητες παλαίωσης. Τα κόκκινα κρασιά μπορούν να σταθεροποιηθούν σε χαμηλότερη οξύτητα λόγω της παρουσίας των φαινολών, οι οποίες ενισχύουν την οξύτητα και βοηθούν στη διατήρηση της σταθερότητας του οίνου κατά την παλαίωση.

Το τρυγικό οξύ αποτελεί ένα από τα κυρίαρχα οξέα τόσο στα ανώριμα σταφύλια όσο και στο γλεύκος. Δεν είναι ιδιαίτερα διαδεδομένο στη φύση αλλά συγκεκριμένα στο σταφύλι για αυτό και είναι γνωστό ως οξύ του κρασιού (“wine acid”). Πριν την ωρίμανση η συγκέντρωση του σταφυλιού σε τρυγικό οξύ μπορεί να φτάσει έως και τα 15 g/L. Σε γλεύκος αμπελώνων βόρειων περιοχών οι συγκεντρώσεις συνήθως ξεπερνούν τα 6 g/L ενώ σε νότιους αμπελώνες μπορεί να 2-3 g/L . Οι εστέρες και τα άλατα του τρυγικού οξέος που προέρχονται από τις οινοβιομηχανίες είναι η κύρια πηγή τρυγικού οξέος που τροφοδοτεί ολόκληρο τον κλάδο της βιομηχανίας τροφίμων και ποτών (αναψυκτικά, σοκολάτες κονσέρβες κ.α.) (Ribereau-Gayon et al., 2006)

Λόγω του ότι μεταβολίζεται από μικρό αριθμό μικροοργανισμών, συνήθως προτιμάται ως προσθήκη για την αύξηση της οξύτητας σε κρασιά υψηλού pH. Κατά την παλαίωση, τα διαλυτοποιημένα παράγωγα του τρυγικού οξέος τείνουν να κρυσταλλοποιούνται με αποτέλεσμα να καθιζάνουν και να ιζηματοποιούνται. Επειδή η ψύξη επιταχύνει αυτή τη διαδικασία, κατά το τέλος της οινοποίησης το κρασί ψύχεται ώστε να πραγματοποιηθεί πρώιμος σχηματισμός ιζήματος και να αποφευχθεί η κρυσταλλοποίηση στη φιάλη (Jackson, 1998).

Το μηλικό οξύ αποτελεί το άλλο βασικό οξύ του σταφυλιού. Η συγκέντρωση του στα ανώριμα σταφύλια είναι πολύ υψηλή και μπορεί να φτάσει ως και τα 25 g/L. Στη συνέχεια όμως, και κατά τις 2 βδομάδες του περκασμού, η συγκέντρωσή του πέφτει στο ήμισυ. Όταν έχει ωριμάσει το σταφύλι η συγκέντρωση ποικίλει από 4-6,5 g/L σε βόρειες περιοχές και μειώνεται αισθητά στο νότο σε συγκεντρώσεις 1-2 g/L. Συνεισφέρει περίπου 50% στην ολική οξύτητα και του σταφυλιού και του κρασιού και προσδίδει μια ξινή γεύση. Το περιεχόμενο σε μηλικό οξύ αποτελεί ένα βασικό δείκτη για τον καθορισμό της αρχής του τρύγου.



Εικόνα 3.1 Τα τρία κύρια οργανικά οξέα του σταφυλιού: τρυγικό, μηλικό και κιτρικό οξύ

Επιπλέον το σταφύλι περιέχει σε μικρότερες συγκεντρώσεις κιτρικό οξύ (0,5-1 g/L) και ασκορβικό οξύ, το οποίο όμως καταναλώνεται από τις ζύμες και δεν υπάρχει στο τελικό προϊόν. Το γλεύκος περιέχει και ουρονικά οξέα (γαλακτουρονικό οξύ και γλυκουρονικό οξύ) καθώς και φαινολικά οξέα της κιναμωμικής ομάδας (κουμαρικό οξύ) τα οποία εστεροποιούνται με παράγωγα του τρυγικού οξέος.

Τα περισσότερα οργανικά οξέα του γλεύκους και του κρασιού αποτελούνται από πολυ-λειτουργικά μόρια, πολλά από τα οποία είναι υδροξυ-οξέα. Οι δύο αυτές

λειτουργικές ομάδες προσδίδουν στα οξέα πολικά και υδρόφιλα χαρακτηριστικά. Σαν αποτέλεσμα, είναι διαλυτά τόσο στο νερό όσο και σε αραιά αλκοολικά διαλύματα όπως είναι το κρασί. Αυτός ακριβώς ο πολυ-λειτουργικός χαρακτήρας είναι υπεύθυνος για την χημική ενεργότητά τους που τους επιτρέπει να εξελίσσονται κατά την παλαίωση. (Jackson, 1998, Σουφλερός, 1998).

3.3.4 Άλλες κατηγορίες ενώσεων

Η παραγωγή εστέρων στο κρασί έχει διπλή προέλευση: Σχηματίζονται είτε μέσω ενζυμικής εστεροποίησης κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, είτε μέσω χημικής εστεροποίησης κατά τη μακράς διάρκειας παλαίωση. Για το λόγο αυτό, η περιεκτικότητα σε εστέρες αυξάνεται σημαντικά κατά την παλαίωση με αποτέλεσμα παλαιωμένα κρασιά να περιέχουν 2-3 φορές περισσότερους εστέρες σε σχέση με τα νεαρά κρασιά. Η σημασία των εστέρων έγκειται στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους. Ενώ ο οξικός αιθυλεστέρας, ο οποίος αντιπροσωπεύει το 80% των πτητικών εστέρων, προσδίδει δυσάρεστη οσμή στο κρασί, οι οξικοί εστέρες του 2-μεθυλοπροπυλίου, του 3-μεθυλοβουτυλίου,του 2-φαινυλο αιθυλίου καθώς και οι αιθυλεστέρες των λιπαρών οξέων με ζυγό αριθμό ατόμων άνθρακα αποτελούν βασικά συστατικά του αρώματος του οίνου. Οι παράγοντες που επιδρούν στον σχηματισμό ανώτερων εστέρων κατά την αλκοολική ζύμωση είναι το γένος και το είδος των ζυμών, η θερμοκρασία της ζύμωσης, το pH, ο αερισμός του γλεύκους και η τεχνική της οινοποίησης (Ribereau-Gayon et al. 2006, Σουφλερός 1997).

Στο σταφύλι υπάρχει ένας μικρός αριθμός κετονών, οι περισσότερες από τις οποίες όμως διατηρούνται και μετά την αλκοολική ζύμωση. Τα έντονα αρώματα εξωτικών λουλουδιών ή τριαντάφυλλου της β-δαμασκηνόνης (β-damascenone) καθώς και το χαμηλό όριο ανίχνευσής της οργανοληπτικά, υποδεικνύουν το σημαντικό της ρόλο στο άρωμα πολλών λευκών, κυρίως, ποικιλιών, συμπεριλαμβανομένου του Chardonnay (Simpson and Miller, 1984) και του Riesling (Strauss, Wilson, Anderson et al., 1993). Επιπλέον, στις ερυθρές ποικιλίες η β-ιονίνη (β-ionone) προσδίδει χαρακτηριστικά αρώματα βιολέτας και σμέουρου (“raspberry”) (Ferreira et al., 1993). Αν και πλήθος κετονών παράγεται κατά την αλκοολική ζύμωση, ελάχιστες από αυτές έχουν σημαντική οργανοληπτική σημασία (Jackson, 1998).

Οι αζωτούχες ενώσεις στο κρασί είναι κατά κύριο λόγο οργανικές ενώσεις (95%). Οι κύριες οργανικές αζωτούχες ενώσεις που εμφανίζονται στο κρασί είναι οι πρωτεΐνες, τα πεπτίδια, τα αμινοξέα και τα αμίδια. Ο κολλοειδής χαρακτήρας των πρωτεϊνών προκαλεί θόλωμα στο κρασί και στη συνέχεια υπό την επίδραση της θερμότητας και την παρουσία τανινών σχηματίζει ίζημα. Σήμερα η απομάκρυνση των πρωτεϊνών γίνεται αποτελεσματικά με την προσθήκη μπετονίτη ή τη χρήση πρωτεολυτικών ενζύμων (Σουφλερός, 1997). Τα αμινοξέα λειτουργούν ως θρεπτικά συστατικά των ζυμών τόσο στην αλκοολική όσο και στη μηλογαλακτική ζύμωση. Η συγκέντρωση και η σύσταση των αμινοξέων στον οίνο μπορεί να έχει σημαντική επίδραση και στην αρωματική πολυπλοκότητα του (Moreno-Arribas et al., 2009).

Το κρασί περιέχει, ακόμα, ένα πλήθος πηκτινικών ουσιών που περιλαμβάνειόπως τις πηκτίνες και τις οζάνες στις οποίες ανήκουν και τα κόμμεα. Αποτελούν συνήθως πολυμερή σακχαρωδών οξέων, διακλαδισμένων αλυσίδων (πολυσακχαρίτες) και δρουν ως προστατευτικά κολλοειδή που εμποδίζουν τη διαύγαση. Για το λόγο αυτό γίνεται χρήση πηκτινολυτικών ενζύμων για την αποικοδόμηση τους. (Τσακίρης, 1998)

Επιπρόσθετα, μια άλλη κατηγορία ενώσεων που περιέχει το κρασί είναι οι τερπενικές ενώσεις. Αποτελούν οργανικές ενώσεις 10 ατόμων άνθρακα και είναι αρωματικές ενώσεις υπεύθυνες για τα πρωτεύοντα αρώματα κάποιων έντονα αρωματικών ποικιλιών όπως το Μοσχάτο και το Riesling. Χαρακτηριστικές τερπενικές ενώσεις είναι η λιναλόλη, η (cis) γερανιόλη, η (trans) νερόλη και η α-τερπινεόλη.

Τέλος, στο κρασί υπάρχει ένα πλήθος βιταμινών, ενζύμων και ανόργανων ενώσεων που περιλαμβάνουν ανιόντα και κατιόντα ανόοργανων αλάτων (Baumes, 2009).

4 *Φαινολικά συστατικά του σταφυλιού και του κρασιού*

Τα φαινολικά συστατικά περιλαμβάνουν ένα ευρύ πλήθος χημικών ενώσεων, διαφορετικών δομών και λειτουργιών και αποτελούν μια από τις βασικές κατηγορίες των δευτερογενών μεταβολιτών. 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 (Waterhouse, 2002). Εντούτοις, ο ορισμός αυτός δεν είναι εντελώς ικανοποιητικός καθώς περιλαμβάνει και ενώσεις όπως η οιστρόνη, μια γυναικεία ορμόνη, που προέρχεται από τα τερπένια. Παράλληλα, δεν περιλαμβάνει ενώσεις που δεν έχουν υδροξύλια ως υποκαταστάτες στον αρωματικό δακτύλιο (και άρα αυστηρά δε μπορούν να χαρακτηριστούν ως φαινόλικά), όπως το κιναμωμικό οξύ, αλλά έχει επικρατήσει στην οινική βιβλιογραφία να εξετάζονται από κοινού με τα φαινολικά συστατικά (Jackson, 1998). Για το λόγο αυτό, προτιμάται συνήθως ένας ορισμός με βάση τη μεταβολική προέλευση τους. Έτσι ως φυτικά φαινολικά συστατικά χαρακτηρίζονται οι ενώσεις που παράγονται από το σικιμικό μεταβολικό μονοπάτι και τον φαινυλοπροπανοειδή μεταβολισμό (Robards et al., 1999).

Λόγω της πολυπλοκότητας και του μεγάλου εύρους δομών που περιλαμβάνουν, τα φαινολικά συστατικά επιτελούν ένα πλήθος σημαντικών και διαφορετικών λειτουργιών στο κρασί και επηρεάζουν σημαντικά την ποιότητα του. Οργανοληπτικά είναι υπεύθυνα τόσο για το χρώμα και την στυφότητα των κόκκινων κρασιών, όσο και για την κιτρινωπή απόχρωση των λευκών κρασιών. Λειτουργούν ως φυσικά συντηρητικά του κρασιού λόγω της αντιοξειδωτικής και αντιμικροβιακής τους δράσης και παίζουν σημαντικό ρόλο κατά την παλαίωση του κρασιού. Ευθύνονται, όμως, για τον σχηματισμό ιζημάτων και θολότητας, καθώς και για άλλα τεχνικά προβλήματα (συσσώρευση στην επιφάνεια των φίλτρων και ρόφηση στην επιφάνεια της δεξαμενής) (Cheynier, 2006, Jackson, 1998).

Τα φαινολικά συστατικά του κρασιού προέρχονται κατά κύριο λόγο από το σταφύλι και πιο συγκεκριμένα από τα στερεά του μέρη, τον φλοιό και τα γίγαρτα. Έτσι βρίσκονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στα ερυθρά κρασιά, στα οποία εκχυλίζεται το μεγαλύτερο μέρος, ύστερα από την επαφή με τα στέμφυλα.

Μικρότερες ποσότητες προσλαμβάνονται από το ξύλο των βαρελιών ενώ σε πολύ μικρές ποσότητες φαινολικά παράγονται από τον μεταβολισμό των ζυμών και μπορούν να εκχυλιστούν από τον φελλό της φιάλης αν έρθει σε επαφή με το κρασί (, Jackson, 1998, Conde et al., 2007).

Τα κύρια φαινολικά του κρασιού μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο βασικές κατηγορίες. Στα διφαινυλοπροπανοειδή γνωστά και ως φλαβονοειδή που περιλαμβάνουν τις φλαβονόλες, τις φλαβαν-3-όλες και τις ανθοκυάνες, και στα φαινυλοπροπανοειδή ή μη φλαβονοειδή που περιλαμβάνουν υδροξυ-βενζοϊκά και υδροξυ-κιναμωμικα οξέα (φαινολικά οξέα) (Minussi et al., 2003).

4.1 Μη φλαβονοειδή

Στα μη φλαβονοειδή του κρασιού που δεν έχει παλαιωθεί περιλαμβάνονται κυρίως τα φαινολικά οξέα και τα παραγωγά τους - και πιο συγκεκριμένα τα υδροξυ-κιναμωμικά και υδροξυ-βενζοϊκά οξέα - καθώς και οι πτητικές φαινόλες και τα στιλβένια. Βρίσκονται κυρίως στα χυμοτόπια των κυττάρων του φλοιού και της σάρκας και εκχυλίζονται εύκολα κατά τη θραύση των σταφυλιών. Η δομή τους είναι πιο απλή σε σχέση με τα φλαβονοειδή καθώς αποτελούνται από μία C_3-C_6 κεντρική αλυσίδα. Βρίσκονται σε συγκεντρώσεις 100-200 mg/L στα ερυθρά κρασιά και 10-20 mg/l στα λευκά. Τα φαινολικά οξέα είναι άχρωμα σε καθαρό αλκοολικό διάλυμα αλλά μπορεί να αποκτήσουν κίτρινη απόχρωση αν οξειδωθούν. Από οργανοληπτικής πλευράς, δεν έχουν συγκεκριμένα γευστικά η αρωματικά χαρακτηριστικά αλλά ορισμένα από τα παράγωγα τους κατά το μεταβολισμό των ζυμών αποτελούν πτητικά φαινολικά συστατικά που επηρεάζουν τον αρωματικό χαρακτήρα του κρασιού. (Jackson 1998, Rentzch et al., 2009)

Σε μεγαλύτερη αναλογία ποσοτικά υπάρχουν τα ***υδροξυ-κιναμωμικά οξέα*** και τα παράγωγά τους. Εμφανίζονται κυρίως ως εστέρες αντιδρώντας με το τρυγικό οξύ, αλλά μπορούν ακόμα να αντιδράσουν με σάκχαρα, διάφορες αλκοόλες και άλλα οργανικά οξέα. Από τις αντιδράσεις του τρυγικού οξέος με το καφταρικό, το κουταρικό και το φερταρικό οξύ προκύπτουν ως παράγωγα οι εστέρες του καφεϊκού, του p-κουμαρικού και του φερουλικού οξέος αντίστοιχα. Οι εστέρες αυτοί αποσυντίθενται στα μονομερή τους υπό την παρουσία της πηκτίνο-μεθυλο-εστεράσης ενώ ακόμα υδρολύονται αργά κατά την αλκοολική ζύμωση. Όταν τα κιναμωμικά

οξέα ενώνονται με ανθοκυανικούς μονοσακχαρίτες σχηματίζουν ακυλιωμένες ανθοκυάνες μέσω εστεροποίησης του καφεϊκού και του p-κουμαρικού με τη γλυκόζη του γλυκοζίτη. (Ribérau-Gayon et al., 2006, Rentzch et al., 2009)

Από τα ***βενζοϊκά οξέα***, 7 έχουν ταυτοποιηθεί στο κρασί. Η μεταξύ τους διαφοροποίηση αφορά τους υποκαταστάτες του βενζολικού τους δακτυλίου. Στα σταφύλια εμφανίζονται κυρίως ως συνδυασμοί γλυκοζιτών, από τους οποίους απελευθερώνονται με υδρόλυση παρουσία οξέος, αλλά και σε εστερική μορφή, από την οποία απελευθερώνονται με αλκαλική υδρόλυση. Σε ελεύθερη μορφή εμφανίζονται κυρίως σε ερυθρά κρασιά λόγω της υδρόλυσης των γλυκοζιτών αλλά και σε αντιδράσεις θερμικής αποσύνθεσης πιο πολύπλοκων ενώσεων, ειδικά των ανθοκυανών. (Ribérau-Gayon et al., 2006, Κοτσερίδης 2006).

Εικόνα 4.1 Χημική δομή βενζοϊκών και κιναμωμικών οξέων

(1) Benzoic acids	R2	R3	R4	R5	(2) Cinnamic acids
p-Hydroxybenzoic acid	H	H	OH	H	*p*-Coumaric acid
Protocatechic acid	H	OH	OH	H	Caffeic acid
Vanillic acid	H	OCH_3	OH	H	Ferulic acid
Gallic acid	H	OH	OH	OH	
Syringic acid	H	OCH_3	OH	OCH_3	Sinapic acid
Salicylic acid	OH	H	H	H	
Gentisic acid	OH	H	H	OH	

Το πιο κοινό μη φλανοειδές των σταφυλιών, το καφταρικό οξύ (μια ο-διφαινόλη) δρα ως ένα από τα βασικά υποστρώματα για την οξείδωση των πολυφαινολών και για το λόγο αυτό παίζει σημαντικό ρόλο στο οξειδωτικό μαύρισμα του γλεύκους. Τα οξειδωμένα παράγωγα του καφταρικού και κουταρικού οξέος συνεισφέρουν στην κιτρινωπή-χρυσή απόχρωση των λευκών κρασιών. Στα κόκκινα κρασιά, αντίθετα, η αφθονία των ανθοκυανών και των προκυανιδίνων καλύπτει την παρουσία των οξειδωμένων μη φλαβονειδών του σταφυλιού.

Τα κρασιά που έχουν παλαιωθεί σε δρύινα βαρέλια εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα υδροξυ-βενζοϊκού οξέος και των παραγώγων του, ειδικά του ελλαγικού οξέος, μια διλακτόνη που παράγεται από την ένωση δύο μορίων γαλλικού οξέος. Το ελλαγικό

οξύ παράγεται από την υδρολυτική διάσπαση των ελλαγι-τανινών που είναι πολυμερή του εξα-υδροδι-φενικού οξέος εστεροποιημένα με γλυκόζη. Οι γαλλο-τανίνες είναι άλλη μια ομάδα *υδρολύσιμων τανινών* που συντίθενταιι από μονομερή του γαλλικού οξέος αλλά αποτελούν μόνο το 5% των ολικών υδρολίσιμων τανινών του ξύλου του βαρελιού. Περισσότερα για τις ***υδρολύσιμες τανίνες***, των οποίων αποτελούν παράγωγα οι ενώσεις αυτές, θα αναφερθούν σε επόμενο υποκεφάλαιο. Οι εστέρες του ελλαγικού οξέος μπορούν να ενισχύουν το κόκκινο χρώμα του κρασιού σχηματίζοντας σύμπλοκα ("copigments") με τις ανθοκυάνες. Η δυνατότητα τους να οξειδώνονται εύκολα τους καθιστά ενεργούς στην κατανάλωση οξυγόνου σε κρασιά που παλαιώνουν σε δρύινα βαρέλια. Η εκχύλιση μη φαινολοειδών σε κρασιά που παλαιώνουν σε ξύλο καστανιάς είναι ελαφρώς διαφορετική με αντίστοιχες ενώσεις να εκχυλίζονται στην περίπτωση αυτή. (Jackson 1998, Ribérau-Gayon et al., 2006)

Η υποβάθμιση των λιγνινών της δρυός αποδεσμεύει, ακόμα, διάφορα πτητικά κιναμο-αλδεϋδικά και βενζο-αλδεϋδικά παράγωγα με κύρια τη βανιλίνη, σιναπαλδεΰδη, κονιφεραλδεΰδη και συρινγκαλδεΰδη ενώ εκχυλίζονται και μικρές ποσότητες άλλων φαινολικών όπως η εσκουλίνη και η σκοπολίνη, οι οποίες ανήκουν στις ***κουμαρίνες***. Οι κουμαρίνες αποτελούν παράγωγα του κιναμωμικού οξέος και σχηματίζονται από την ενδομοριακήεστεροποίηση ενός φαινολικού υδροξυλίοιυ. Η αργή μετατροπή της εσκουλίνης στην λιγότερο πικρή εσκουλετίνη θεωρείται ότι είναι υπεύθυνη κατά ένα μέρος για την μείωση της πικρίας σε κρασιά που παλαιώνουν σε δρύινα βαρέλια. (Ribérau-Gayon et al., 2006)

Ο μεταβολισμός των ζυμών μπορεί να αποδώσει κάποια μη φλαβονοειδή φαινολικά με επικρατέστερη την τυροσόλη και σε μικρότερες ποσότητες την τρυπτοφόλη. Μία επιπλέον κατηγορία πολυφαινολών που υπάρχουν στο κρασί είναι τα στιλβένια. Τα στιλβένια περιλαμβάνουν δύο βενζολικούς δακτυλίους και συνδέονται συνήθως με ένα αιθάνιο ή μια αιθυλενική αλυσίδα. Χαρακτηριστική τέτοια ένωση είναι η ρεσβερατρόλη, η οποία προέρχεται από τους φλοιούς του σταφυλιού, εκχυλίζεται κυρίως κατά την αλκοολική ζύμωση και έχει μελετηθεί η θετική της επίδραση στην υγεία. (Ribérau-Gayon et al., 2006, Κοτσερίδης 2006)

Τα μη φλαβονοειδή του σταφυλιού προέρχονται κυρίως από την φαινυλανανίνη (Hrazdina et al., 1984) ενώ αυτά που προέρχονται από της ζύμες είναι παράγωγα αιθανικού οξέος (Packter, 1980).

4.2 Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι μία μεγάλη ομάδα φυσικών μεταβολικών προϊόντων, πολύ διαδεδομένα στα ανώτερα φυτά αλλά και στα βρύα. Επιτελούν ένα πλήθος βιολογικών λειτουργιών στα φυτά όπως προστασία από την UV ακτινοβολία, ενζυμική διαμόρφωση και προστασία από μολυντικούς παράγοντες ενώ ως μέρος της ανθρώπινης διατροφής συνεισφέρουν θετικά στην υγεία κυρίως λόγω της αντιοξειδωτικής δράσης και της δέσμευσης ελευθέρων ριζών.

Δομικά, αποτελούνται από έναν C_6-C_3-C_6 σκελετό αποτελούμενο από δύο φαινολικούς δακτυλίους (A και B) που ενώνονται με έναν οξυγονωμένο ετερόκυκλο δακτύλιο (δακτύλιος πυρανίου). Ανάλογα με το αν ο ετερόκυκλος είναι κορεσμένος ή όχι τα φλαβονοειδή μπορούν να ταξινομηθούν σε φλαβανόνες και φλαβάνες, όταν είναι κορεσμένος, και σε ανθοκυάνες, φλαβόνες και φλαβονόλες, όταν είναι ακόρεστος. (Buckingham et al., 2015)

Σε κάθε επιμέρους κατηγορία φλαβονοειδών υπάρχει μεγάλη πολυμορφία ενώσεων που οφείλεται στις διάφορες τροποποιήσεις που μπορεί να υποστεί ο κεντρικός σκελετός και μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται:

- Η υδροξυλίωση
- Η μεθυλίωση ορισμένων φαινολικών υδροξυλίων
- Η γλυκοζυλίωση με διάφορα σάκχαρα
- Η ακυλίωση των αλκοολικών υδροξυλο-ομάδων
- Ο πολυμερισμός, ιδιαίτερα στην κατηγορία των φλαβανολών

Τα φλαβονοειδή στη φύση εμφανίζονται ως μονομερή, διμερή, ολιγομερή και πολυμερή μόρια. Τα περισσότερα δι-φλαβονοειδή ενώνονται με ένα δεσμό άνθρακα-άνθρακα δύο όμοιων μονομερών, αλλά έχουν βρεθεί και διμερή διαφορετικών ενώσεων (φλαβονολο-φλαβανόνες). Τα υψηλότερου μοριακού βάρους φλαβονοειδή αποτελούν τα ολιγομερή και πολυμερή των προανθοκυανιδινών, οι οποίες πρέρχονται

από τις φλαβαν-3-όλες. Συνήθως, τα περισσότερα φλαβονοειδή εμφανίζονται ενωμένα με σάκχαρα σε εστερική μορφή ως μονογλυκοζίτες, διγλυκοζίτες κ.λ., ενώ ακετυλιομένοι Ο-γλυκοζύτες προκύπτουν από την ένωση φλαβονοειδών με φαινολικά οξέα.

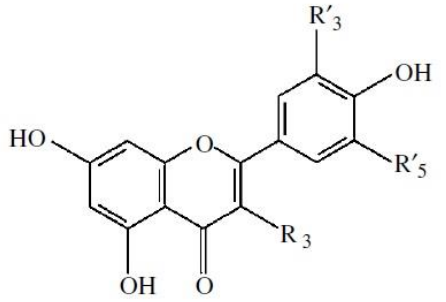
Τα φλαβονοειδή του σταφυλιού εμφανίζουν υδροξύλια (-OH) στους C5 και C7 άνθρακες του Α-δακτύλιου και στη θέση 4' του Β-δακτύλιου. Μπορούν ακόμα να έχουν υδροξύλια (-OH) στις θέσεις 3' ή 3' και 5' και να υποκαταστήσουυν το υδροξύλιο της θέση 3 από κάποιον γλυκοζίτη ή μια ακυλομάδα. Στο κρασί, τα πιο κοινά φλαβονοειδή αποτελούν οι φλαβονόλες, οι φλαβαν-3-όλες και οι ανθοκυάνες, ενώ σε μικρότερες ποσότητες υπάρχουν φλαβαν-3,4-διόλες (λευκοανθοκυάνες) (Cheynier 2006, Terrier et al., 2009).

4.2.1 Φλαβονόλες

Οι ***φλαβόνες*** είναι μια υπο-κατηγορία των πολυ-υδροξυ-φλαβονοειδών που βασίζονται στη δομή της φλαβόνης (2-φαινυλο-χρωμόνης). Οι ***φλαβονόλες*** είναι φλαβόνες με έναν 3-υδροξυ-υποκαταστάτη. (Buckingham et al., 2015)

Αποτελούν κίτρινες χρωστικές, οι οποίες στο σταφύλι εντοπίζονται στο φλοιό είτε ως 3-γλυκοζίτες της κερκετίνιης, της καιμπφερόλης, της μυρισετίνης και της ισοραμνετίνης είτε ως τα αντίστοιχα αγλυκονικά παράγωγα,σε μικρότερες ποσότητες, που παράγονται ύστερα από υδρόλυση κατά την αλκοολική ζύμωση. Και οι 4 παραπάνω φλαβόνες έχουν εντοπιστεί στα ερυθρά κρασιά ενώ στα λευκά έχουν ανιχνευτεί μόνο η κερκετίνη και η καιμπφερόλη. Στο κρασί μπορούν να σχηματίζουν σύμπλοκα ("copigments") με τις ανθοκυάνες. Η βασική λειτουργία τους είναι να προστατεύουν την σάρκα από την UV ακτινοβολία όπως έχει προαναφερθε. (Cheynier 2006, Ribérau-Gayon et al., 2006).

Εικόνα 4.2 Χημική δομή άγλυκης μορφής των τριών κύριων φλαβονολών: της καμπφερόλης, της κερκετίνης και της μυρικετίνης



a) R_3 = OH

R′3	R′5	Name of aglycone
H	H	Kaempferol
OH	H	Quercetin
OH	OH	Myricetin

Από τα φλαβονοειδή του κρασιού, οι φλαβονόλες βρίσκονται στη μικρότερη συγκέντρωση, σε ποσοστό που ποικίλει από 1-10% του συνολικού φαινολικού περιεχομένου και εξαρτάται από τις συνθήκες καλλιέργειας. Οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις τους είναι της τάξης των 100 mg/l στα ερυθρά και 1-3 mg/l στα λευκά απουσία εκχύλισης (Jackson, 1998).

4.2.2 Φλαβαν-3-όλες (κατεχίνες) και προκυανιδίνες

Οι ***φλαβαν-3-όλες*** αποτελούν ενδιάμεσο παράγωγο κατά την αποσύνθεση φλαβανονών προς φλαβάνες (Buckingham et al., 2015). Προκύπτουν με υδρογόνωση του κεντρικού ετερόκυλου δακτυλίου της φλαβονόλης. Η πιο ευρέως διαδεδομένη φλαβαν-3-όλη είναι η κατεχίνη, από το όνομα τις οποίας έχει επικρατήσει να χαρακτηρίζονται και όλες οι φλαβαν-3-όλες ως ***κατεχίνες***. Στο κρασί εμφανίζονται ως μονομερή, ολιγομερή και πολυμερή (Terrier et al., 2009). Στο σταφύλι εντοπίζονται κυρίως στους φλοιούς και στα γίγαρτα, ενώ σε ίχνη έχουν εντοπιστεί και στη σάρκα. Τα βασικά μονομερή των φλαβαν-3-ολών αποτελούν η (+)-κατεχίνη, η (-)-επικατεχίνη και ο (-)-3-γαλλικός εστέρας της επικατεχίνης (epicatechin-3-gallate). Επιπλέον, έχει ανιχνευτεί γαλλο-κατεχίνη σε σταφύλια *V. Vinifera* καθώς και άλλα μονομερή σε σταφύλια που δεν προέρχονται από το γένος *Vinifera* (Cheynier, 2006).

Οι ***προανθοκυανιδίνες*** είναι μια ομάδα ολιγομερών φλαβαν-3-ολών που προέρχονται από τον πολυμερισμό των έντονα ευοξείδωτων κατεχινών. Η ονομασία τους οφείλεται στο ότι κατά τη θέρμανση τους και υπό την παρουσία ανόργανων οξέων, αποσυντίθενται παράγοντας έγχρωμες ανθοκυανιδίνες. Επιπλέον, έχουν την ιδιότητα

να προσδένονται στις πρωτεΐνες. Η πιο γνωστή ομάδα προανθοκυανιδινών είναι οι ***προκυανιδίνες***, που αποτελούνται από μονομερή κατεχίνης και επικατεχίνης και με τη σειρά τους διασπώνται παράγοντας κυανιδίνη κατά τη θέρμανση τους υπό την παρουσία ανόργανων οξέων. Αντίστοιχα, οι προδελφινιδίνες υπό τις ίδιες συνθήκες παράγουν δελφινιδίνη (Buckingham et al., 2015).

Στο σταφύλι έχουν ανιχνευτεί μέχρι τετραμερείς προκυανιδίνες ενώ στο κρασί συνήθως εμφανίζονται διμερή. Οι προανθοκυανιδίνες που περιέχονται στο κρασί είναι, κατά κύριο λόγο, διμερή που ενώνονται συνήθως με έναν ομοιοπολικό δεσμό άνθρακα-άνθρακα στην θέση 8 του ενός μονομερούς με τον άνθρακα της θέσης 4 ενός γειτονικού μονομερούς (τύπου B_1-B_4). Εκτός αυτών, έχουν ταυτοποιηθεί και τριμερή καθώς και διμερή που προέρχονται τόσο από προκυανιδινικά όσο και από προδελφινιδικά μονομερή (Cheynier, 2006, Terrier et al., 2009).

Κατά την αποθήκευση και παλαίωση των κρασιών οι προκυανιδίνες ενώνονται μεταξύ τους και σχηματίζουν πολυμερή που αποτελούνται από 3-10 μονομερή φλαβανολών, μοριακού βάρους 2.000-3.000 που είναι γνωστά και ως ***συμπυκνωμένες τανίνες***. Οι συμπυκνωμένες τανίνες δεν θα πρέπει να συγχέονται με τις υδρολύσιμες τανίνες που αναφέρθηκαν πρωτύτερα και ανήκουν στα μη φλαβονοείδη. Οι τανίνες παίζουν καθοριστικό ρόλο στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του κρασιού και θα αναλυθούν περεταίρω σε παρακάτω υποκεφάλαιο.

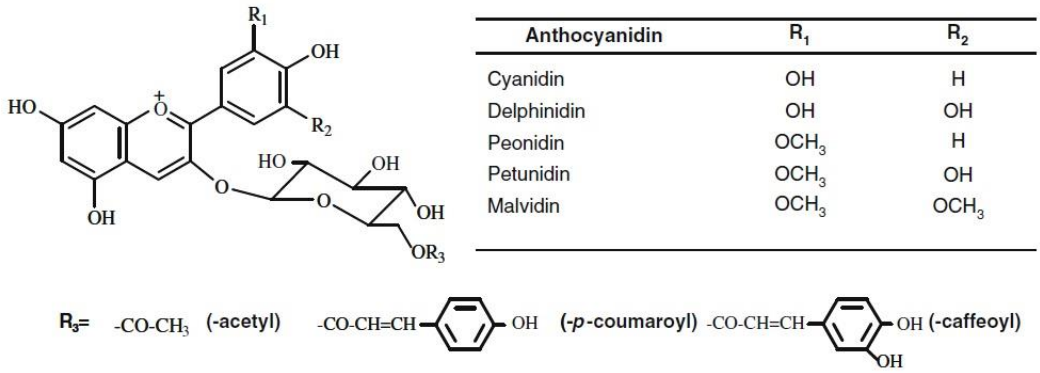
4.2.3 Ανθοκυάνες

Οι ανθοκυάνες αποτελούν μία από τις πιο βασικές ομάδες φλαβονοειδών υπεύθυνες, στο μεγαλύτερο ποσοστό, για το ερυθρό χρώμα των κρασιών. Εντοπίζονται κυρίως στον φλοιό των σταφυλιών και σε περιορισμένες περιπτώσεις, κυρίως σε κάποιες ερυθρές ποικιλίες και στη σάρκα τους για αυτό και η μελέτη τους επικεντρώνεται στα ερυθρά κρασιά στα οποία εκχυλίζονται από τα στέμφυλα.

Στη φύση, οι ανθοκυάνες βρίσκονται υπό μορφή ετεροζιτών. Τα μόρια αυτά υδρολύονται εύκολα σε ένα άγλυκο τμήμα και ένα η περισσότερα μόρια σακχάρων. Το άγλυκο μέρος που προκύπτει είναι μια ***ανθοκυανιδίνη*** με σκελετό C_6-C_3-C_6 ενώ τα σάκχαρα είναι αλδόζες, κυρίως γλυκόζη υπό την ετεροκυκλική μορφή του

πυρανίου. Οι ανθοκυανιδίνες έχουν τη βασική δομή του φλαβυλίου. Το μόριο τους αποτελείται από δύο βενζολικούς δακτύλιους (A και B) και ενδιάμεσα παρεμβάλεται ένας πυριλικός δακτύλιος. Ο δακτύλιος A φέρει πάντα δύο φαινολικά υδροξύλια στις θέσεις -5' και -7' και ο δακτύλιος B ένα φαινολικό υδροξύλιο στη θέση -4'.

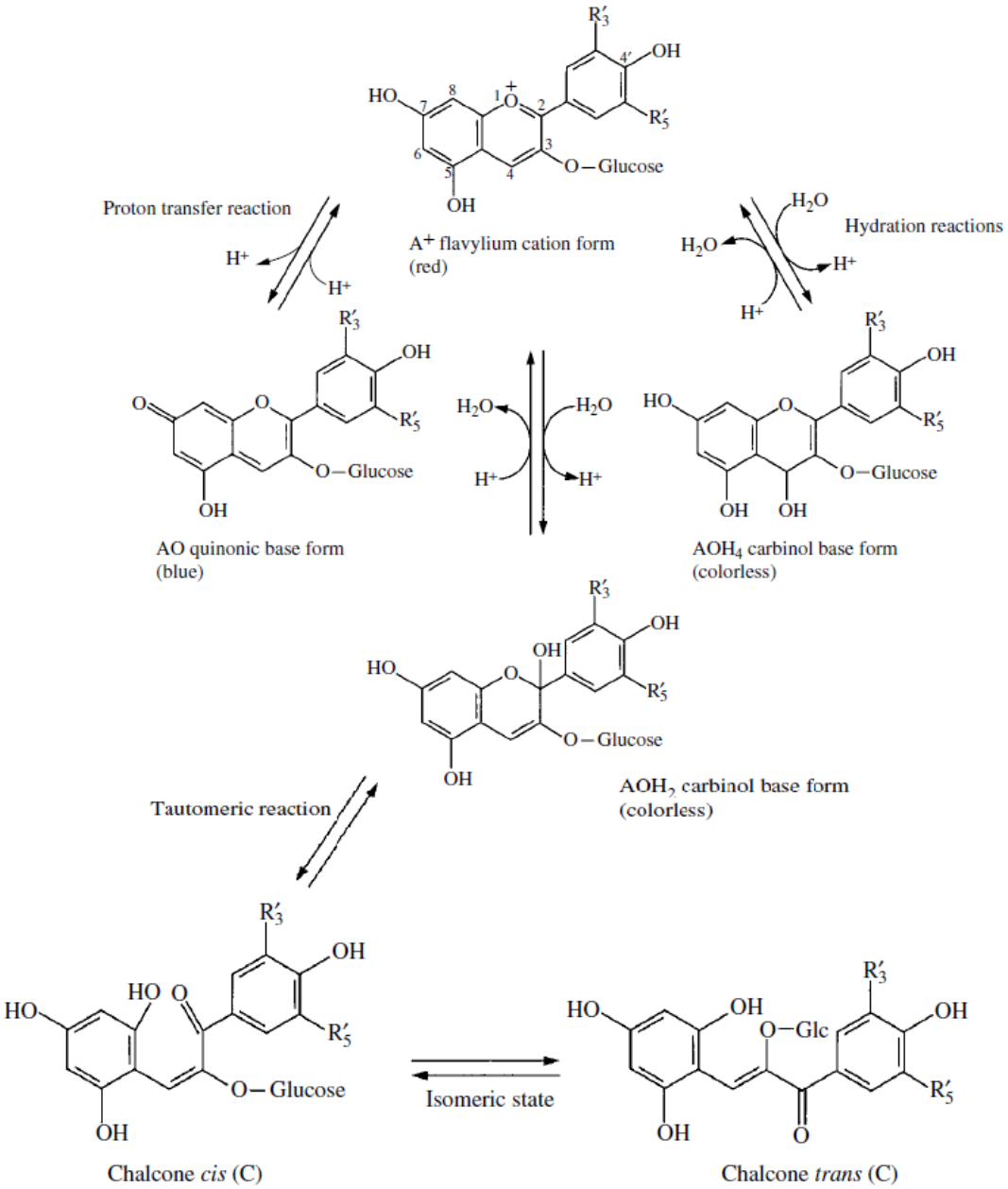
Εικόνα 4.3 Χημική δομή των ανθοκυανών



Anthocyanidin	R_1	R_2
Cyanidin	OH	H
Delphinidin	OH	OH
Peonidin	OCH_3	H
Petunidin	OCH_3	OH
Malvidin	OCH_3	OCH_3

Στα φρέσκα κρασιά, οι ανθοκυάνες βρίσκονται σε μία δυναμική ισορροπία μεταξύ 5 μοριακών μορφών, μίας δεσμευμένης με το διοξείδιο του θείου και τεσσάρων ελεύθερων, της μορφής του φλαβυλίου (flavylium cation), μίας άχρωμης ψευδοβάσης υπό τη μορφή καρβινόλης ή αλλιώς σε ημικεταλική μορφή (carnibol pseudobase), μίας άνυδρης βάσης υπό τη μορφή κιννόνης (quinoidal base) και της χαλκόνης (D) (chalcone). Το κατιόν του φλαβυλίου βρίσκεται στο κέντρο της ισορροπίας και συμμετέχει σε αντιδράσεις οξέος-βάσης και ενυδάτωσης. Η μετατροπή της μορφής του φλαβυλίου στη μορφή της άνυδρης βάσης της κιννόνης γίνεται γρήγορα, με την μεταφορά ενός πρωτονίου, καθώς και η μετατροπή στην ημικεταλική μορφή (ψευδοβάση υπό τη μορφή καρβινόλης) με την ενυδάτωση και την επακόλουθη μεταφορά ενός πρωτονίου. Το άνοιγμα του ετεροδακτυλίου και η αναδόμηση του μορίου της ημικεταλικής μορφής για τον σχηματισμό χαλκόνης όπως και η ισορροπία μεταξύ cis- και trans-χαλκόνης επέρχεται αργά και είναι δύσκολο να μεταβληθεί (Jackson 2008, He et al. 2012).

Εικόνα 4.4 Οι διαφορετικές μοριακές δομές των ανθοκυανών στξ δυναμική ισορροπία



Τα μόρια είναι πιο σταθερά στη γλυκοζυλιομένη μορφή των ανθοκυανών σε σχέση με την αγλυκονική μορφή των ανθοκυανιδινών. Σε σταφύλια V. Vinifera έχουν ταυτοποιηθεί μόνο μονογλυκοζυλιωμένες και ακετυλιωμένες μορφές των ανθοκυανών. Στις τελευταίες, η ακετυλίωση λαμβάνει χώρα με p-κουμαρικό, καφεϊκό ή οξικό οξύ. Η κατάταξη των ανθοκυανών γίνεται με βάση τη θέση των υδροξυλίων και των μεθυλίων στο Β δακτύλιο των ανθοκυανιδινών. Από τις εννέα (9) ανθοκυανιδίνες που είναι γνωστές οι πέντε (5) από αυτές αποτελούν δομικά στοιχεία

των ανθοκυανών που βρίσκονται στο σταφύλι και το κρασί (Κουράκου, 1998, Ribérau-Gayon et al., 2006).

Από τις ανθοκυανιδίνες των σταφυλιών η κυανιδίνη είναι αυτή που βρίσκεται σε μεγαλύτερη αναλογία μετά τον περκασμό των σταφυλιών, με τη συγκέντρωσή της να αυξάνεται για περίπου δύο βδομάδες κατά την ωρίμανση. Επειδή όμως σε συνδυασμό με την δελφινιδίνη αποτελούν τις πιο ασταθείς από τις προκυανιδίνες στη συνέχεια μετασχηματίζονται και τελικά επικρατεί σε συντριπτικό ποσοστό η μαλβιδίνη, η οποία αποτελεί τη βασική ανθοκυανιδίνη σχεδόν όλων των σταφυλιών και κρασιών. Σε ορισμένες ποικιλίες φτάνει να αντιπροσωπεύει το 90% των περιεχόμενων προυκανιδιών (Grenache) (Cheynier, 2006).

Στις ελληνικές ερυθρές ποικιλίες συνήθως απαντάται ο μονογλυκοζύτης-3 της μαλβιδίνης, ακυλιωμένος είτε με οξικό είτε με π-κουμαρικό οξύ (Κουράκου, 1998). Στην ποικιλία Αγιωργίτικο συγκεκριμένα έχουν ταυτοποιηθεί και οι δύο ακυλιωμένες μορφές της μαλβιδίνης (Kallithraka, 2006).

Η σύσταση και η συγκέντρωση σε προκυανιδίνες ποικίλει ανάλογα με την ποικιλία, την ωρίμανση των σταφυλιών, τις κλιματικές συνθήκες, την εντοπιότητα, τη στρεμματική απόδοση και τις συνθήκες καλλιέργειας. Παράλληλα εξαρτώνται και από τις συνθήκες εκχύλισης και οινοποίησης. Κατά την επαφή των στεμφύλων με το γλεύκος, πραγματοποιείται η εκχύλιση των ανθοκυανών και των λοιπών φαινολικών. Η εκχύλιση αυτή μπορεί να λάβει χώρα προζυμωτικά ή κατά την αλκοολική ζύμωση είτε με θρυμματισμένα σταφύλια (κλασσική οινοποίηση) είτε με ολόκληρα σταφύλια (carbonic maceration). Αφού φτάσει σε ένα μέγιστο, η συγκέντρωση των ανθοκυανών αρχίζει να μειώνεται σαν αποτέλεσμα της ρόφησης τους στα κυτταρικά τοιχώματα των ζυμών, της ιζηματοποίησης τους σε μορφή κολλοειδών μαζί με τρυγικά άλατα καθώς και της διαδικασίας σταθεροποίησης και φιλτραρίσματος. Επιπλέον, αντιδράσεις υδρόλυσης καθώς και αντιδράσεις συμπύκνωσης με άλλα φαινολικά συστατικά κατά την οινοποίηση διαφοροποιούν την ανθοκυανική σύσταση όπως θα αναφερθεί αναλυτικά σε επόμενο υποκεφάλαιο.

Το ***ανθοκυανικό προφίλ του σταφυλιού*** σε αντίθεση με το ολικό φαινολικό περιεχόμενο μπορεί να αποτελέσει κριτήριο για την χημειο-ταξινόμηση των ποικιλιών. Σχέσεις μεταξύ μεμονομένων ή και ολικής συγκέντρωσης των επιμέρους

ανθοκυανιδινών έχουν προταθεί για τον ποικιλιακό χαρακτηρισμό. Οι σχέσεις αυτές έχουν να κάνουν με την ενζυμική δραστηριότητα των φλαβονοειδών-3-υδροξυλασών και *O*-δι-υδροξυφαινολο-*O*-μεθυλοτρανσφερασών. Ένας άλλος τρόπος ταξινόμησης βασίζεται στην παρουσία και σχετική ποσοτικοποίηση ακετυλυωμένων ανθοκυανών με αιθυλικό και π-κουμαρικό οξύ, που σχετίζονται με τη δραστηριότητα των αιθυλο- και κιναμωμικών τρανσφερασών. Η παραγωγή των παραπάνω ενζύμων καθορίζεται αυστηρά από την ποικιλία αφού αποτελούν άμεση έκφραση του γονιδιώματος. Παρά τις μεταβολές στο ανθοκυανικό προφίλ κατά την οινοποίηση των κρασιών, το ***ανθοκυανικό προφίλ του κρασιού*** χρησιμοποιείται επίσης ως χημειο-ταξινομικό κριτήριο για τη διάκριση διαφορών μεταξύ ποικιλιών, εντοπιότητας, απόδοσης, χρονολογίας και οινοποιητικών τεχνικών (Monagas and Bartolomé, 2009).

4.2.4 Τανίνες

Οι τανίνες αποτελούν μια κατηγορία φυσικών φαινολικών συστατικών υψηλού μοριακού βάρους, για τις οποίες δεν υπάρχει ένας αυστηρός ορισμός, που αποτελούνται τόσο από φλαβονοειδή όσο και από μη φλαβονοειδή μονομερή. Η κοινή ιδιότητα των τανινών είναι η ικανότητα τους να ενώνονται με πρωτεΐνες και άλλα πολυμερή όπως οι πολυσακχαρίτες. Η ένωση αυτή πραγματοποιείται είτε με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις είτε μέσω δεσμών υδρογόνου. Σε ορισμένες περιπτώσεις δημιουργούνται και ιοντικοί ή ομοιοπολικοί δεσμοί (Κουράκου, 1998).

Η δομή και ο όγκος των τανινών επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό τη δραστικότητα τους με τις πρωτεΐνες. Πρέπει, από τη μία, να είναι αρκετά ογκώδεις ώστε να σχηματίζουν σταθερές ενώσεις με τις πρωτεΐνες ενώ, από την άλλη, ο όγκος τους δεν θα πρέπει να τις αποτρέπει από το να πλησιάζουν στα σημεία σύνδεσης με τις πρωτεΐνες. Τα μοριακά βάρη των ενεργών τανινών εκτείνονται περίπου στο εύρος 600-3.500 (Jackson, 1998).

Γενικά οι τανίνες θα μπορούσαν να ταξινομηθούν σε τρεις βασικές κατηγορίες:

- Τις «συμπυκνωμένες τανίνες» (condensed tannins)
- Τις υδρολύσιμες τανίνες
- Τις «πολύπλοκες ή μικτές τανίνες» (complex or mixed tannins)

Συμπυκνωμένες τανίνες

Οι συμπυκνωμένες τανίνες, γενικά, αποτελούν πολυμερή των κατεχινών.Στο σταφύλι υπάρχουν διαφορετικά είδη τανινών στους βόστρυχους, τα γίγαρτα και τους φλοιούς. Οι τανίνες των φλοιών, με τη σειρά τους, μπορούν να χωριστούν σε τρεις υπό-κατηγορίες:

- Τις τανίνες που βρίσκονται στα χυμοτόπια, οι οποίες σχηματίζουν πυκνά συμπλέγματα στα κύτταρα που βρίσκονται κοντά στην επιδερμίδα. Η συγκέντρωση σε τανίνες αυξάνεται ακτινικά προς τα εξωτερικά στρώματα του φλοιού.
- Τις τανίνες που είναι ισχυρά ενωμένες με την πρωτεϊνο-φωσφολιπιδική μεμβράνη (τονοπλάστης) και είναι ευαίσθητες στους υπερήχους.
- Τις τανίνες που είναι ενωμένες με το κυτταρικό τοίχωμα κυτταρίνης πηκτίνης (Ribérau-Gayon et al., 2006).

Οι τανίνες του σταφυλιού διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τον βαθμό πολυμερισμού. Οι τανίνες των γιγάρτων είναι προκυανιδίνες με σχετικά μικρό βαθμό πολυμερισμού ενώ οι τανίνες των φλοιών έχουν πιο πολύπλοκες δομές και δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερη διαφοροποίηση ως προς το βαθμό πολυμερισμού τους. Ο φλοιός του σταφυλιού είναι πλούσιος σε επιγαλλοκατεχίνες σε αντίθεση με τα γίγαρτα τα οποία έχουν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις γαλλικού εστέρα της επικατεχίνης (Cheynier, 2006).

Στο κρασί οι μονομοριακές προκυανιδίνες οξειδώνονται παράγοντας ολιγομερή σχετικά μικρού μοριακού βάρους 1.000-2.000 που μπορούν να χαρακτηριστούν ως τανίνες. Όταν υπόκεινται όμως σε μη οξειδωτική συμπύκνωση σχηματίζονται συμπυκνωμένες τανίνες που έχουν βαθμό συμπύκνωσης περίπου 10 και μοριακού βάρους 2.000-3.000, μέγεθος που αντιστοιχεί στο μέγιστο τανικό χαρακτήρα. Οι συμπυκνωμένες αυτές τανίνες αντιπροσωπεύουν το 30-60% των ολικών φαινολικών παραγώγων και το ποσοστό τους αυξάνεται με την ηλικία του κρασιού (Κουράκου, 1998). Κατά την παλαίωση, οι προκυανιδίνες πολυμερίζονται περεταίρω προς τανίνες μοριακού βάρους από 2.000 ως πάνω από 5.000, πάνω στις οποίες συνδέονται και άλλα μόρια με αποτέλεσμα να χάνουν σταδιακά τη δραστικότητα τους επί των πρωτεϊνών.

Η ανάλυση όλων των διαφορετικών μορίων συμπυκνωμένων τανινών είναι ιδιαίτερα δύσκολη λόγω του μεγάλου εύρους δομών τους που οφείλεται στο πλήθος των υποκατεστημένων υδροξυλίων, τη θέση τους στο δακτύλιο, τη στερεοχημεία των ασύμμετρων ανθράκων στον δακτύλιο του πυρανίου καθώς και στον αριθμό και είδος των δεσμών των βασικών ομάδων. Η ποικιλομορφία αυτή μπορεί να εξηγήσει την ύπαρξη τανινών με διαφορετικά χαρακτηριστικά και ειδικά όσον αφορά στα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά (Ribérau-Gayon et al., 2006).

Υδρολύσιμες τανίνες

Οι υδρολύσιμες τανίνες προέρχονται από τα μη φλαβονοειδή. Αποτελούνται από ένα μόριο σακχάρου, κυρίως γλυκόζης ή ένα μόριο πολυσακχαρίτη του οποίου πολλά υδροξύλια είναι εστεροποιημένα με διάφορα φαινολικά οξέα, όπως το γαλλικό (γαλλοτανίνες), το διγαλλικό και το ελαγγικό (ελλαγιτανίνες) (Κουράκου, 1998). Παίζουν σημαντικό ρόλο κατά την παλαίωση λευκών και κόκκινων κρασιών λόγω της ικανότητα τους να οξειδώνονται (Vivas and Glories, 1996) και λόγω των γευστικών χαρακτηριστικών τους (Pocock t al., 1994).

Οι τανίνες αυτές δεν βρίσκονται στο σταφύλι αλλά απαντώνται στο ξύλο ορισμένων δέντρων όπως της δρυός. Για το λόγο αυτό στα κρασιά απαντώνται μόνο τα υδρολυμένα παραγωγά τους, κυρίως το ελλαγικό και γαλλικό οξύ. Οι υδρολυόμενες τανίνες, όμως αποτελούν τις βασικές εμπορικές τανίνες που επιτρέπονται ως πρόσθετα του οίνου και μπορούν να υπάρχουν σε μικρές συγκεντρώσεις στο κρασί, αν το τελευταίο έχει υποστεί κολλάρισμα με προσθήκη οινολογική τανίνης.

Τα δύο κύρια ισομερή της ελλαγιτανίνης της δρυός είναι η βεσκαλαγίνη και η κασταλαγίνη με μοριακό βάρος 934, ενώ δευτερεύουσας σημασίας είναι η γρανδανίνη και η ρομπουρίνη. Η μερική υδρόλυση της κασταλαγίνης και της βεσκαλαγίνης με απώλεια εξα-υδροξυ-διφενικού οξέος παράγει βεσκαλίνη και κασταλίνη. Τα διάφορα αυτά μόρια είναι υδατοδιαλυτά αλλά διαλύονται επίσης γρήγορα και σε αραιά αλκοολικά διαλύματα όπως είναι το κρασί. Η σύσταση των ελλαγιτανικών εκχυλισμάτων εξαρτάται από το είδος της δρυός. Τέσσερα μονομερή και τέσσερα διμερή ελλαγιτανινών περιέχονται στα ευρωπαϊκά είδη, ενώ τα αμερικανικά είδη δρυός δεν περιλαμβάνουν διμερή ελλαγιτανινών (Jackson 1998, Ribérau-Gayon et al., 2006).

Οι μη φλαβονοειδείς υδρολύσιμες τανίνες διασπώνται εύκολα στα μονομερή τους υπό όξινες συνθήκες. Το χαμηλό pH αποδυναμώνει το δεσμό ανάμεσα στα άτομα υδρογόνου και οξυγόνου του μακρομορίου. Αντίθετα, οι συμπυκνωμένες τανίνες, που προέρχονται από τα φλαβονοειδή, είναι πιο σταθερές σε όξινες συνθήκες αφού σε αυτές συμμετέχουν ομοιοπολικοί δεσμοί (Συμεού, 2010).

Μικτές τανίνες

Ο όρος μικτές η πολύπλοκες τανίνες χρησιμοποιείται για να περιγράψει την κατηγορία των πολυφαινολών στις οποίες ένα μονομερές κατεχίνης, δομικό συστατικό των συμπυκνωμένων τανινών συνδέεται με μια υδρολυόμενη γαλλο- ή ελλαγιτανίνη μέσω ενός δεσμού άνθρακα-άνθρακα. Ένας σημαντικός αριθμός των ουσιών αυτών έχει αναφερθεί ύστερα από την πρώτη τους εμφάνιση (Ferreira et al., 2006). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η Α ακουτισιμινη (Acutissimin A) που απομονώθηκε από το ξυλώδες μέρος του φυτού *Castanea sativa* και είναι ένα ομοιοπολικό σύμπλοκο της κατεχίνης με την κασταλαγίνη ή την βεσκαλαγίνη. Τέτοιου είδους ενώσεις σε συνδυασμό με σύμπλοκα κασταλαγίνης-μαλβιδίνης είναι παρόντα σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις σε κρασιά που έχουν παλαιώσει σε ξύλινα βαρέλια. Οι οργανοληπτικές τους ιδιότητες δεν έχουν αναλυθεί ακόμα (Ribérau-Gayon et al., 2006).

5 Οινοποίηση

5.1 Προζυμωτικές διεργασίες

Αφού πραγματοποιηθεί ο τρυγητός, πρέπει να γίνει μέριμνα για τη σωστή μεταφορά των σταφυλιών στο οινοποιείο ώστε αυτή η πρώτη ύλη να καταπονηθεί όσον το δυνατόν λιγότερο. Η οινοποίηση ξεκινά ουσιαστικά από τη στιγμή που τα σταφύλια φτάνουν στο οινοποιείο. Τα πρώτα στάδια της διεργασίας της οινοποίησης περιλαμβάνουν τη διαλογή των σταφυλιών, την αποβοστρύχωση, την έκθλιψη και την πίεση των σταφυλιών. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται η διαβροχή του γλεύκους με τα ένζυμα, η οποία διευκολύνει την εκχύλιση των συστατικών από τα στερεά μέρη του σταφυλιού στο γλεύκος (αποδίδεται ευρέως με τον όρο “maceration”).

Η υλοποίηση των διεργασιών αυτών, η αλληλουχία με την οποία συμβαίνουν αλλά και ο εξοπλισμός που χρησιμοποιείται, διαφοροποιούνται σημαντικά ανάλογα με το αν πρόκειται για λευκή ή ερυθρή οινοποίηση και ανάλογα με τις οινοποιητικές τεχνικές που επιλέγει ο εκάστοτε οινοπαραγωγός για την παραγωγή του επιθυμητού γι’ αυτόν τελικού προϊόντος. Παρά ταύτα, αποτελούν τις βασικές προζυμωτικές διεργασίες της οινοποίησης και θα αναλυθούν συνοπτικά παρακάτω (Ribérau-Gayon et al., 2006, Jackson 2008).

5.1.1 Διαλογή των σταφυλιών

Η διαλογή των σταφυλιών μπορεί να γίνει μόνο σε άθικτα σταφύλια και είναι δύσκολη όταν έχει προηγηθεί μηχανικός τρύγος. Στη περίπτωση αυτή, η μόνη διαλογή που μπορεί να γίνει είναι χειρωνακτικά να αφαιρεθούν από το αμπέλι τα χαλασμένα και κατεστραμμένα σταφύλια πριν τον τρύγο. Όταν έχει προηγηθεί κλασικός χειρωνακτικός τρύγος η διαλογή μπορεί να γίνει σε ειδικά τραπέζια διαλογής από το εργατικό προσωπικό. Συνήθως, τα τραπέζια (ή ταινίες) διαλογής αποτελούν μια ανεξάρτητη, κινητή μονάδα που εγκαθίσταται ανάμεσα στο χώρο παραλαβής και το πρώτο κομμάτι του οινοποιητικού εξοπλισμού και αποτελείται από έναν πλαστικό ιμάντα σε ένα μεταλλικό σκελετό που κινείται με τη βοήθεια ενός ηλεκτροκινητήρα (Ribérau-Gayon et al., 2006).

Τα τελευταία χρόνια έχουν κυκλοφορήσει στο εμπόριο και αυτόματοι διαλογείς. Αυτοί μπορούν να διαφοροποιούνται και να απομακρύνουν τα ανεπιθύμητα σταφύλια με βάση το χρώμα ή/και το μέγεθος των ραγών (Falconer and Hart, 2005). Επιπλέον, ρυθμίζοντας τα κριτήρια αυτά μπορούν να απομακρύνονται και βόστρυχοι που περνάνε στην ταινία διαλογής. Αν και υψηλού κόστους, η αυτόματη διαλογή επεξεργάζεται γρηγορότερα μεγάλους όγκους σταφυλιών (Jackson, 2008).

5.1.2 Αποβοστρύχωση

Η αποβοστρύχωση έχει επικρατήσει τα τελευταία χρόνια να γίνεται ξεχωριστά από την έκθλιψη τόσο φυσιολογικά όσο και χρονικά. Περιλαμβάνει την απομάκρυνση, εκτός των βοστρύχων, και άλλων φυτικών μερών όπως φύλλα και μόσχους της αμπέλου. Το βασικό πλεονέκτημα αυτής της διαδικασίας είναι η ελαχιστοποίηση της πρόσληψης φαινολικών και λιπιδίων από τα μέρη της αμπέλου που είναι ανεπιθύμητα οργανοληπτικά σε σχέση με τα φαινολικά της ρόγας του σταφυλιού. Συνήθως χρησιμοποιείται κοινός εξοπλισμός αποβοστρυχωτήρα-σπαστήρα (εκθλιπτήρα) σε σειρά.

Ο αποβοστρυχωτήρας συνήθως περιέχει έναν εξωτερικό διάτρητο κύλινδρο, που επιτρέπει στις ράγες να τον διαπεράσουν αλλά δεν επιτρέπει το πέρασμα των βοστρύχων και των φύλλων. Συχνά, υπάρχει μια σειρά σπειροειδώς τοποθετημένων βραχιόνων, που διαθέτουν εύκαμπτα πτερύγια, οι οποίοι είναι τοποθετημένοι σε μία κεντρική άτρακτο. Ελαφρά περιστροφή προκαλεί την είσοδο των τσαμπιών στον αποβοστρυχωτήρα, αναγκάζοντας τις ράγες να διαπεράσουν τις οπές του κυλίνδρου και αποβάλλοντας τους βόστρυχους και τα φύλλα στην έξοδο. Όταν το σύστημα αποβοστρυχωτήρα-σπαστήρα δουλεύει βέλτιστα, το φρούτο διαχωρίζεται με τη μικρότερη δυνατή καταπόνηση από τους βόστρυχους και τα φύλλα που αποβάλλονται σε όσον το δυνατόν πιο ξηρή μορφή γίνεται. Όταν συμβαίνει αυτό, ελαχιστοποιούνται οι απώλειες σε γλεύκος και επιτρέπεται η ευκολότερη απομάκρυνση των στερεών (Jackson, 2008). Η αποβοστρύχωση έχει ιδιαίτερη σημασία στην ερυθρή οινοποίηση αφού επιδιώκεται η παραμονή του γλεύκους με τα στέμφυλα. Αντίθετα, στην λευκή οινοποίηση που η παραμονή του γλεύκους με τα υπόλοιπα μέρη του σταφυλιού ελαχιστοποιείται, ο αποχωρισμός των βοστρύχων είναι στις περισσότερες περιπτώσεις περιττός (Τσέτουρας, 2008).

5.1.3 Έκθλιψη («σπάσιμο ή εκραγισμός»)

Η έκθλιψη των σταφυλιών ξεκινά κατά την αποβοστρύχωση (όταν η τελευταία λαμβάνει χώρα) όπου ένα ποσοστό των ραγών αναπόφευκτα σπάει με αποτέλεσμα το γλεύκος που απελευθερώνεται να είναι ευάλωτο σε οξειδωτικό μαύρισμα και μικροβιακή μόλυνση. Έτσι, όταν η έκθλιψη πραγματοποιείται χωρίς καθυστέρηση, επιτρέπει στην αλκοολική ζύμωση να ξεκινήσει άμεσα περιορίζοντας τη μικροβιακή αλλοίωση και προσφέροντας καλύτερο έλεγχο των οξειδωτικών φαινομένων κατά την οινοποίηση.

Δύο βασικές διαδικασίες που ακολουθούνται για τον εκραγισμό των σταφυλιών είναι η πίεση τους διαμέσου ενός διάτρητου τοιχώματος ή το πέρασμά τους από ένα ζεύγος κυλίνδρων που περιστρέφονται σε διαφορετικές κατευθύνσεις. Η ταχύτητα και η μεταξύ τους απόσταση ρυθμίζονται ανάλογα με την ποικιλία των σταφυλιών και το βαθμό ωριμότητάς τους έτσι ώστε ενώ σπάζουν οι φλοιοί να αποφεύγεται η έκθλιψη των γιγάρτων.

Η έκθλιψη μπορεί ακόμα να πραγματοποιηθεί και με φυγοκέντριση. Επειδή κατά την τεχνική αυτή, το γλεύκος πολτοποιείται δυσκολεύοντας την απολάσπωση και παράλληλα υπάρχει ο κίνδυνος της έκθλιψης και των γιγάρτων, συνήθως η τεχνική αυτή αποφεύγεται (Jackson, 2008).

5.1.4 Διόρθωση του γλεύκους

Οι διορθώσεις στο γλεύκος αφορούν στη διόρθωση της οξύτητας και στον εμπλουτισμό σε σάκχαρα.

Σε θερμά κλίματα το σταφύλι μπορεί να παρουσιάσει μειωμένη συγκέντρωση μηλικού οξέος. Η ***αύξηση της οξύτητας*** γίνεται συνήθως με προσθήκη τρυγικού οξέος καθώς η προσθήκη ισχυρών ανόργανων οξέων απαγορεύεται. Προσθήκη τρυγικού οξέος γίνεται για συγκέντρωση χαμηλότερη από 3,5 g/L εκφρασμένη σε θειικό οξύ ή για pH μεγαλύτερο από 3,6. Αντίθετα σε ψυχρά κλίματα όπου το σταφύλι δεν καταφέρνει να ωριμάσει πλήρως η συγκέντρωση του σε μηλικό οξύ είναι πολύ υψηλή και μεγαλύτερη από του τρυγικού οξέος. Στην περίπτωση αυτή και όταν η μηλογαλακτική ζύμωση δεν είναι επιθυμητή, είναι δυνατό να γίνει μείωση της οξύτητας με την προσθήκη συνήθως ανθρακικού ασβεστίου η ουδέτερου τρυγικού

άλατος. Και οι δύο αυτές ενώσεις αντιδρούν με το τρυγικό οξύ μειώνοντας τη συγκέντρωσή του. Οι διεργασίες αυτές πρέπει να πραγματοποιούνται στη λευκή οινοποίηση πριν από ή στην αρχή της ζύμωσης ενώ στην ερυθρή οινοποίηση κατά το διαχωρισμό γλεύκους και στεμφύλων.

Για τον εμπλουτισμό σε σάκχαρα υπάρχει ένα σύνολο βιολογικών, φυσικών και χημικών μεθόδων που μπορούν να ακολουθηθούν. Στις βιολογικές μεθόδους συμπεριλαμβάνονται η φυσική υπερωρίμανση με έκθεση των σταφυλιών στον ήλιο και η βιολογική υπερωρίμανση με προσβολή της καλλιέργειας από τον μύκητα Botrytis cinerea («ευγενής σήψη»), στις φυσικές η άμεση όσμωση και η κρυοεκχύλιση (“cryoextraction”) και στις χημικές η προσθήκη ζάχαρης (“chaptalisation”), η προσθήκη συμπυκνωμένου γλεύκους και η συμπύκνωση του γλεύκους είτε με θέρμανση υπό κενό, είτε με ψύξη μέχρι σχηματισμό κρυστάλλων ενώ πιο σπάνια (λόγω υψηλού κόστους) γίνεται με αντίστροφη όσμωση (Σουφλερός, 1997, Jackson, 2008).

5.2 Λευκή οινοποίηση

Η παραγωγή των λευκών κρασιών γίνεται συνήθως από την ζύμωση του γλεύκους χωρίς την παρουσία των στεμφύλων. Για το λόγο αυτό, η παραλαβή και ο διαχωρισμός του γλεύκους από τα στερεά μέρη («στράγγιση» και «πίεση») αλλά και η «απολάσπωση», δηλαδή η απομάκρυνση των στερεών (“clarification”), προηγούνται της αλκοολικής ζύμωσης. Έτσι, οι προζυμωτικές διεργασίες είναι αυτές που καθορίζουν το περιεχόμενο του γλεύκους σε ουσίες που επηρεάζουν τα οργανοληπτικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά του λευκού κρασιού (Ribérau-Gayon et al., 2006). Σε ορισμένες ποικιλίες (π.χ. Chardonnay) χρησιμοποιούνται νέες τεχνικές οινοποίησης που επιτρέπουν για κάποιες ώρες την επαφή του γλεύκους με τον φλοιό με σκοπό τον εμπλουτισμό σε αρωματικά, φαινολικά και άλλα συστατικά μια διαδικασία που ονομάζεται προζυμωτική εκχύλιση.

Όπως προαναφέρθηκε, στη λευκή οινοποίηση συνήθως παραλείπεται η αποβοστρύχωση καθώς το γλεύκος αποχωρίζεται άμεσα από τα στέμφυλα. Έτσι, το πρώτο στάδιο της λευκής οινοποίησης είναι ο εκραγισμός των σταφυλιών που ακολουθείτε από το στράγγισμα. Σε λίγες περιπτώσεις λευκής οινοποίησης είναι

πιθανό να παραλείπεται και το στάδιο της έκθλιψης των σταφυλιών (παραγωγή σαμπάνιας).

5.2.1 Στράγγιση ή διαχωρισμός

Η στράγγιση ή διαχωρισμός έχει ως σκοπό την παραλαβή του γλεύκους που έχει απελευθερωθεί κατά την έκθλιψη των σταφυλιών. Οι αποστραγγιστές ή διαχωριστές μπορεί να λειτουργούν είτε στατικά υπό την επίδραση μόνο της βαρύτητας (παραλαβή 50% του γλεύκους), είτε δυναμικά με περιστροφή ενός διάτρητου κυλίνδρου (παραλαβή γλεύκους 70-80%). Και στις δύο περιπτώσεις το δοχείο στο οποίο οδηγείται η σταφυλομάζα για το διαχωρισμό μπορεί να είναι ο κάδος ενός πιεστηρίου. Η διαδικασία αυτή μπορεί να επιταχυνθεί με την αύξηση της πίεσης του δοχείου στραγγίσματος μέσω διοχέτευσης διοξειδίου του άνθρακα. Το γλεύκος ρέει από το κάτω μέρος του κάδου προς μία δεξαμενή ενώ η σταφυλομάζα που απομένει οδηγείται στο πιεστήριο. Κατά το στατικό διαχωρισμό το γλεύκος υφίσταται ένα είδος διήθησης από τα στέμφυλα, όμως εμφανίζονται φαινόμενα οξείδωσης τόσο στο γλεύκος όσο και στη σταφυλομάζα. Αντίθετα, οι δυναμικοί διαχωριστήρες περιορίζουν τα οξειδωτικά φαινόμενα λόγω της υψηλότερης ταχύτητας τους, όμως εμφανίζουν υψηλότερα ποσοστά οινολασπών (Σουφλερος, 1997, Jackson, 2008).

5.2.2 «Συμπίεση»

Η συμπίεση έχει στόχο την απόσπαση του υπόλοιπου γλεύκους από τη σταφυλομάζα που έχει ήδη υποστεί έκθλιψη και στράγγιση. Για την παραλαβή γλεύκους με επιθυμητά χαρακτηριστικά (χαμηλή εκχύλιση συστατικών από τον φλοιό, χαμηλή συγκέντρωση αιωρούμενων στερεών, περιορισμός οξειδωτικών φαινομένων) πρέπει να ικανοποιούνται ορισμένες συνθήκες κατά την συμπίεση των σταφυλιών αλλά και κατά τη διαδικασία του στραγγίσματος. Πιο συγκεκριμένα:

- Χαμηλές πιέσεις
- Περιορισμένη μηχανική καταπόνηση των φλοιών του σταφυλιού
- Μικρή και προοδευτική αύξηση της πίεσης
- Παραλαβή μεγάλων όγκων σε χαμηλή πίεση
- Θερμοκρασία που δεν ξεπερνά τους 20° C και στις δύο διεργασίες

- Ελάχιστη επαφή με τον ατμοσφαιρικό αέρα

Για την υλοποίηση της διεργασίας αυτής είναι διαθέσιμο ένα μεγάλο πλήθος πιεστηρίων που διαφέρουν τόσο ως προς τη μορφολογία τους όσο και ως προς τον τρόπο λειτουργίας τους (Ribérau-Gayon et al., 2006).

5.2.3 Θείωση

Η προσθήκη θειώδη ανιδρύτη στο γλεύκος ακολουθεί αμέσως μετά την έξοδο του από το πιεστήριο. Η θείωση στην λευκή οινοποίηση είναι μείζονος σημασίας καθώς λόγω του χαμηλού φαινολικού περιεχομένου τους, τα λευκά κρασιά είναι πιο ευοξείδωτα και ευάλωτα σε μικροβιακές και βακτηριακές μολύνσεις. Επιπλέον, τα οξειδωτικά φαινόμενα στο λευκό κρασί επιδρούν άμεσα στο χρώμα και στα υπόλοιπα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του (Σουφλερος, 1997).

5.2.4 Απολάσπωση

Το φρεσκοπαραγόμενο γλεύκος είναι πάντα σε ένα βαθμό θολό. Η θολότητα αυτή οφείλεται σε ένα πλήθος αιωρούμενων στερεών που περιλαμβάνουν κομμάτια από τους φλοιούς και τους βόστρυχους, χώμα, κυτταρικά υπολείμματα από τη σάρκα του σταφυλιού καθώς και αδιάλυτα υπολείμματα από γεωργικά προϊόντα. Επιπλέον, διαλυμένα μακρομόρια που τείνουν να ιζηματοποιηθούν, μεταξύ των οποίων οι πηκτινικές ενώσεις, συνεισφέρουν στη θολότητα (Ribérau-Gayon et al., 2006). Για τον περιορισμό των ενζυμικά καταλυόμενων οξειδωτικών δράσεων, στις οποίες συμμετέχουν τα συστατικά αυτά και παράγουν ανεπιθύμητα για το κρασί προϊόντα, είναι απαραίτητη, η σε ένα ποσοστό, απομάκρυνσή τους με τη διαδικασία της απολάσπωσης. Η απομάκρυνση ακόμα μεγαλύτερου ποσοστού αιωρούμενων στερεών μπορεί να επιβραδύνει την αλκοολική ζύμωση.

Η απολάσπωση μπορεί να γίνει στατικά, αφήνοντας το γλεύκος να ηρεμίσει για κάποιες ώρες (12-24 ώρες), έχοντας αναστείλει την έναρξη της ζύμωσης με προσθήκη θειώδη ανιδρύτη. Ένα ποσοστό οινολασπών καθιζάνει στον πυθμένα και το υπερκείμενο γλεύκος μεταγγίζεται σε άλλη δεξαμενή για την αλκοολική ζύμωση. Παράλληλα, με τη στατική απολάσπωση, μπορεί να γίνει προσθήκη μπετονίτη, μιας κολλοειδούς αργίλου, η οποία κατά την προσρόφηση των πρωτεϊνών και την

ιζηματοποιήση τους, συμπαρασύρει και άλλα αιωρούμενα στερεά και διευκολύνει την καθίζησή τους (Jackson, 2008).

Μια άλλη τεχνική απολάσπωσης που μπορεί να αντικαθιστά ή να συμπληρώνει τη στατική απολάσπωση, είναι η απολάσπωση με φυγοκέντριση. Η φυγοκέντριση απομακρύνει μόνο αιωρούμενα στερεά του γλεύκους επηρεάζοντας στο μικρότερο βαθμό τη σύσταση του σε σχέση με της υπόλοιπες μεθόδους. Παρά το υψηλό κόστος του εξοπλισμού, η ταχύτητα και η ελαχιστοποίηση των απωλειών σε γλεύκος που προσφέρει, έχουν καταστίσει τη χρήση της μεθόδου αυτής ευρέως διαδεδομένη στη βιομηχανία. Μια εναλλακτική τεχνική που χρησιμοποιείται είναι το φιλτράρισμα υπό κενό. Η τεχνική αυτή απομακρύνει τα αιωρούμενα στερεά σε πολύ μεγάλο ποσοστό, με αποτέλεσμα να αυξάνει τους χρόνους ζύμωσης και την πτητική οξύτητα (Ferrando et al., 1998).

Μία ακόμα τεχνική που χρησιμοποιείται είναι η διαύγαση με επίπλευση (“flotation”). Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στη διοχέτευση μικροφυσαλίδων αερίου (ατμοσφαιρικού αέρα, αζώτου ή οξυγόνου) στο κάτω μέρος του γλεύκους. Κατά την ανύψωση των φυσαλίδων προσκολλούνται στην επιφάνεια τους αιωρούμενα στερεά, τα οποία όταν φτάσουν στην επιφάνεια του γλεύκους επιπλέουν και απομακρύνονται. Το βασικό πλεονέκτημα της τεχνικής αυτής είναι ότι μπορεί να ελέγχεται ο βαθμός απολάσπωσης που επιτυγχάνεται (Ferrarini et al., 1995, Jackson, 2008).

5.2.5 Προζυμωτική κρυοεκχύλιση

Η προζυμωτική (κρυο)εκχύλιση (“cold maceration”) είναι μία τεχνική που περιλαμβάνει εκχύλιση στην υδατική φάση αφού οι χαμηλές θερμοκρασίες που χρησιμοποιούνται (κάτω από 15° C) έχουν ως αποτέλεσμα την καθυστέρηση της έναρξης της αλκοολικής ζύμωσης. Συνήθως γίνεται σε ατμόσφαιρα διοξειδίου του άνθρακα για την αναστολή των μεταβολικών δράσεων των ζυμών. Έτσι κατά την προζυμωτική κρυοεκχύλιση ευνοείται η εκχύλιση υδατοδιαλυτών συστατικών από τα στερεά μέρη του σταφυλιού όπως χρωστικές, πρόδρομες αρωματικές ουσίες, πολυσακχαρίτες και γλυκοζυλιομένα φαινολικά συστατικά (Cassasa, 2015).

Οι βασικοί παράγοντες που επιδρούν στο αποτέλεσμα της προζυμωτικής κρυοεκχύλισης είναι η ποικιλία, η σοδειά και ο βαθμός ωριμότητας του σταφυλιού

(Mihnea t al., 2015). Η προζυμωτική κρυοεκχύλιση μπορεί να ενισχύσει τον αρωματικό χαρακτήρα των λευκών κρασιών και παράλληλα, με την εκχύλιση ορισμένων φαινολικών συστατικών, να βελτιώσει τη δυνατότητα παλαίωσης τους. Από την άλλη πλευρά, εκχυλίζονται και συστατικά με μη επιθυμητά φυτικά αρωματικά συστατικά καθώς και συστατικά που ενισχύουν την στυπτικότητα του κρασιού. Για το λόγο αυτό, θα πρέπει να πραγματοποιείται μια ισορροπημένη εκχύλιση με βασικές παραμέτρους το χρόνο, τη θερμοκρασία, τη χρήση θειώδη ανιδρύτη και πηκτινολυτικών ενζύμων (Sokolowsky et al., 2015).

Κάποιες κλασσικές ποικιλίες που ευνοούνται από τη χρήση της τεχνικής αυτής είναι το Riesling, το Gewutraminer, το Chardonnay και το Sauvignon Blanc. Συνήθως στη λευκή οινοποίηση η κρυοεκχύλιση γίνεται στο εύρος θερμοκρασιών 4-15° C, ενώ η διάρκεια της μπορεί να είναι από λίγες ώρες μέχρι ένα 24ώρο. Ο θειώδης ανυδρίτης, εκτός από την αντιμικροβιακή του δράση κατά την προζυμωτική κρυοεκχύλιση, ευνοεί την εκχύλιση φαινολικών καθώς ενώνεται μαζί τους και καταστρέφει τα κυτταρικά τοιχώματα. Επειδή μπορεί να ενισχύσει σημαντικά την εκχύλιση των φαινολικών, σε ορισμένες περιπτώσεις δεν πραγματοποιείται θείωση και η προστασία από οξειδωτικές δράσεις γίνεται μόνο με χρησιμοποίηση ατμόσφαιρας διοξειδίου του άνθρακα (Parley, 1997).

Σε χαμηλότερες θερμοκρασίες κρυοεκχύλισης παρατηρήθηκε μικρότερο ολικό φαινολικό περιεχόμενο, μικρότερη χρωματική ένταση αλλά και υψηλότερη συγκέντρωση εστέρων, οι οποίοι επιδρούν αρωματικά στο κρασί, σε σχέση με τις υψηλότερες θερμοκρασίες κρυοεκχύλισης (Salinas et al., 2005). Αναφορικά με την εκχύλιση των φαινολικών, η προζυμωτική κρυοεκχύλιση αυξάνει τη συγκέντρωση των φλαβονοειδών στο γλεύκος, και πιο συγκεκριμένα της κατεχίνης και της επικατεχίνης ενώ δεν επηρεάζει σημαντικά τη συγκέντρωση των μη φλαβονοειδών όπως το καφταρικό οξύ. Παράλληλα με τα φαινολικά εκχυλίζεται και κάλιο στο γλεύκος. Το κάλιο αντιδρά με το τρυγικό οξύ προς παραγωγή όξινου τρυγικού καλίου, το οποίο ιζηματοποιείται. Έτσι, η συγκέντρωση του τρυγικού οξέος και η οξύτητα του γλεύκους μειώνεται ενώ το pH αυξάνεται (Sokolowsky et al., 2015).

5.2.6 Ζύμωση

Το γλεύκος μεταγγίζεται μετά την απολάσπωση, στη δεξαμενή που πραγματοποιείται η ζύμωση. Πριν την έναρξη της ζύμωσης συχνά πραγματοποιείται η ανάμιξη γλεύκους διαφορετικών πιέσεων. Κατά το γέμισμα της δεξαμενής αφήνεται κενό περίπου το 10 % του υπερκείμενου όγκου για να αποτραπεί υπερχύλιση του αφρού που παράγεται κατά τη ζύμωση. Στη συνέχεια ακολουθεί ο εμβολιασμός των ξηρών ζυμών.

Σημαντική επίδραση στα αρωματικά χαρακτηριστικά του λευκού κρασιού ασκεί η θερμοκρασία στην οποία συμβαίνει η ζύμωση, με θερμοκρασίες πάνω από τους 20° C να έχουν αρνητική επίδραση στον αρωματικό χαρακτήρα του. Οι σύγχρονες δεξαμενές που χρησιμοποιούνται έχουν σύστημα αυτόματου ελέγχου της θερμοκρασίας ενώ δεν έχει εκλείψει και η χρήση βαρελιών ως δοχεία για τη πραγματοποίηση της ζύμωσης (Ribérau-Gayon et al., 2006).

Στη λευκή οινοποίηση η μηλογαλακτική ζύμωση δεν είναι πάντα επιθυμητή ανάλογα με τη ποικιλία σταφυλιού που χρησιμοποιείται. Όταν δεν είναι επιθυμητή, εφαρμόζεται μετάγγιση του κρασιού με την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης για νέα απομάκρυνση οινολασπών πλούσιων σε γαλακτικά βακτήρια ενώ στην αντίθετη περίπτωση, η μετάγγιση καθυστερείται και η θερμοκρασία ρυθμίζεται στο εύρος 18-20° C όπου διευκολύνεται η δράση των βακτηρίων αυτών. Μετά τη μετάγγιση ξαναγίνεται θείωση, με προσοχή ώστε το ελεύθερο διοξείδιο του θείου να μην ξεπερνά τα 30-40 mg/L. Ύστερα από 15-20 μέρες μπορεί να γίνει νέα μετάγγιση με συμπλήρωση διοξειδίου του θείου (Σουφλερός, 1997, Ribérau-Gayon et al., 2006).

5.3 Ερυθρή οινοποίηση

Η ερυθρή οινοποίηση προϋποθέτει απαραίτητα την παραμονή του γλεύκους με τα στέμφυλα για ένα χρονικό διάστημα ώστε να εκχυλιστούν φαινολικά και άλλα συστατικά στο γλεύκος. Επιπλέον, λόγω της φύσης της, στην ερυθρή οινοποίηση ο μηχανικός τρύγος μπορεί να αποτελέσει ικανοποιητική λύση όταν υπάρχουν οι απαιτούμενοι οικονομικοί πόροι. Απαιτούμενη προζυμωτική διαδικασία στην ερυθρή οινοποίηση αποτελεί η αποβοστρύχωση ώστε να αποτραπεί εκχύλιση συστατικών του φυτικού μέρους της αμπέλου. Τέλος, σε αντίθεση με τη λευκή οινοποίηση, η

μηλογαλακτική ζύμωση αποτελεί βασική διεργασία των περισσότερων ερυθρών οινοποιήσεων. Πέρα από την «κλασσικλή μέθοδο ερυθρής οινοποίησης» που θα αναλυθεί παρακάτω τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιούνται και εναλλακτικές μέθοδοι που διαφοροποιούν σημαντικά το τελικό προϊόν με πιο σημαντικές την θερμοοινοποίηση και την ανθρακική αναεροβίωση. (Κουράκου, 1998, Ribérau-Gayon et al., 2006).

5.3.1 Προζυμωτική κρυοεκχύλιση

Η προζυμωτική κρυοεκχύλιση αν και ξεκίνησε ως μια τεχνική που χρησιμοποιούνταν μόνο στη λευκή οινοποίηση, τα τελευταιά χρόνια χρησιμοποιείται στην παραγωγή ροζέ και ερυθρών κρασιών με σκοπό να βελτιώσει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους και την «πολυπλοκότητά» τους (De Santis and Frangipane, 2010).

Στην ερυθρή οινοποίηση η προζυμωτική κρυοεκχύλιση γίνεται στο ίδιο θερμοκρασιακό εύρος 4-15° C αλλά μπορεί να διαρκέσει περισσότερο, δεδομένου ότι τα ερυθρά κρασιά είναι πολύ πιο πλούσια σε φαινολικό περιεχόμενο από τα λευκά και ο οργανοληπτικός χαρακτήρας του κρασιού δεν επηρεάζεται αρνητικά από την περαιτέρω εκχύλιση φαινολικών. Συνήθως, η κρυοεκχύλιση στα ερυθρά κρασιά διαρκεί 2 με 7 μέρες αν και σε ορισμένες περιπτώσεις έχουν παρατηρηθεί χρόνοι κρυοεκχύλισεις 10 ημερών. Τόσο το ανθοκυανικό περιεχόμενο όσο και το ολικό φαινολικό περιεχόμενο δε μεταβάλλεται σημαντικά μετά την 4^{η}-5^{η} μέρα της προζυμωτικής κρυοεκχύλισης (Alvarez et al., 2006).

5.3.2 Κλασσική μέθοδος ερυθρής οινοποίησης

Ως κλασσική μέθοδος ερυθρής οινοποίησης ονομάζεται η τεχνική κατά την οποία διεξάγονται ταυτόχρονα:

- Η αλκοολική ζύμωση των σακχάρων του γλεύκους παρουσία των στερεών μερών του σταφυλιού (φλοιοί και γίγαρτα).
- Η εκχύλιση των συστατικών των στερεών μερών του σταφυλιού από το υδροαλκοολικό διάλυμα που σχηματίζεται κατά την αλκοολική ζύμωση.

Αν και μπορούν να υπάρξουν διαφοροποιήσεις κατά τη διαδικασία της οινοποίησης τα βασικά στάδια της κλασσικής μεθόδου συνοψίζονται παρακάτω

I. Αποβοστρύχωση και έκθλιψη των σταφυλιών

II. Μεταφορά της γλεύκους αλλά και των στεμφύλων στα δοχεία οινοποίησης (δεξαμενές, βαρέλια) με ταυτόχρονη θείωση

III. Αλκοολική ζύμωση παρουσία των στερεών μερών με ταυτόχρονη εκχύλιση των συστατικών των μερών αυτών

IV. Διαχωρισμός του ημιζυμωμένου ή αποζυμωμένου γλεύκους από τα στέμφυλα

V. Απομάκρυνση των στεμφύλων από τα δοχεία οινοποίησης και μεταφορά τους στο πιεστήριο

VI. Πίεση των στεμφύλων προς παραγωγή του «κρασιού πίεσης»

VII. Συμπληρωματικές ζυμώσεις των σακχάρων που έχουν απομείνει με αλκοολική και μηλογαλακτική ζύμωση (Κουράκου, 1997, Ribérau-Gayon et al., 2006).

Ο εξοπλισμός που χρησιμοποιείται για την αποβοστρύχωση και έκθλιψη είναι ο ίδιος που παρουσιάστηκε στη λευκή οινοποίηση. Στη συνέχεια το γλεύκος μεταφέρεται στις δεξαμενές οινοποίησης οι οποίες ονομάζονται και «οινοποιητές» με τη βοήθεια ειδικής αντλίας η οποία ονομάζεται «αντλία τρύγου» και ταυτόχρονα γίνεται θείωση με τη βοήθεια θειοδομετρητών. Όταν ο θειώδης ανυδρίτης προστίθεται πριν τη ζύμωση δεσμεύεται με τα σάκχαρα και έτσι κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης απελευθερώνεται προοδευτικά και προσφέρει προστασία καθ’όλη τη διάρκειά της (Τσέτουρας, 2008).

Στη συνέχεια, ξεκινά η αλκοολική ζύμωση με παράλληλη την εκχύλιση (κυρίως) των φαινολικών συστατικών. Η διάρκεια παραμονής των στεμφύλων με το γλεύκος μπορεί να ποικίλει σημαντικά από λίγα 24ωρα ως και μερικές βδομάδες ανάλογα με την ποικιλία του σταφυλιού και το οργανοληπτικό αποτέλεσμα που θέλει να πετύχει ο οινολόγος. Επειδή η συγκέντρωση σε ολικά φαινολικά και χρωματική ένταση είναι αντιστρόφως ανάλογη του λόγου γλεύκους προς στεμφύλων, σε ορισμένες ποικιλίες που αποδίδουν υψηλό ποσοστό χυμού γίνεται ***μερική αφαίμαξη***. Αφαιρείται, δηλαδή, ένα μέρος του γλεύκους πριν την αλκοολική ζύμωση ώστε να αυξηθεί η αναλογία της στερεής φάσης.

Η θερμοκρασία αποτελεί ακόμα έναν καθοριστικό παράγοντα της διεργασίας. Ενώ έχει παρατηρηθεί ότι βέλτιστοι ρυθμοί εκχύλισης παρατηρούνται σε θερμοκρασίες 30-35° C, πρέπει παράλληλα να μην επιβραδύνεται η δράση των σακχαρομυκήτων ώστε να μη μειώνεται η αρωματική ένταση. Συνήθως, επιλέγεται μια θερμοκρασία στο εύρος 25-35° C (Σουφλερος, 1997, Κουράκου 1998).

5.3.2.1 Πηκτινολυτικά Ένζυμα

Αν και το σταφύλι είναι πλούσιο σε πηκτινολυτικά ένζυμα, η δράση τους πολλές φορές περιορίζεται από την ανομοιογένεια του μίγματος των στεμφύλων με το γλεύκος καθώς και από το pH του. Για το λόγο αυτό, υπάρχουν διάφορα εμπορικά ενζυμικά σκευάσματα με μεγάλη προσαρμοστικότητα, από συγκεκριμένα είδη μυκήτων (*Aspergillus, Rhizopus* και *Trichoderma*), τα οποία ενεργούν στο χαμηλό pH που επικρατεί κατά την αλκοολική ζύμωση και η αποτελεσματικότητά τους εξαρτάται από τη φύση των σταφυλιών (Συμεού, 2010).

Η δράση τους σχετίζεται με την καταστροφή των κυτταρικών δομών και ιστών που διευκολύνει την εκχύλιση των φαινολικών συστατικών στο γλεύκος. Με την προσθήκη τους επιτυγχάνεται βελτίωση της απόδοσης του γλεύκους μέχρι και 15%, μέσα σε 4-10 ώρες. Επιπλέον, βελτιώνεται η σταθερότητα του χρώματος, μέσω του σχηματισμού πολυμερών χρωστικών ενώ αυξάνεται και η συγκέντρωση των προκυανιδινών, κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, όχι μόνο αυτών που προέρχονται από τους φλοιούς, αλλά και αυτών από τα γίγαρτα (Busse-Valverde et al. 2011).

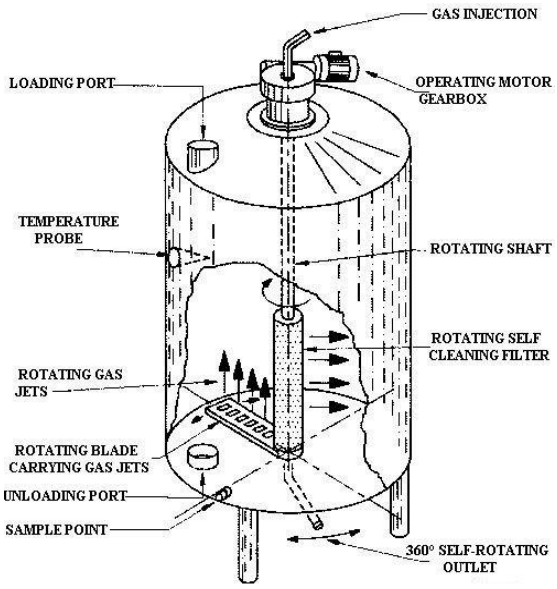
Η προσθήκη των ενζύμων αυτών πραγματοποιείται σε μικρό χρονικό διάστημα μετά την έκθλιψη των σταφυλιών ώστε να διασφαλιστεί η αύξηση της απόδοσης σε γλεύκος και παράλληλα να ενισχυθεί η διαδικασία της διαύγασης του κρασιού, ειδικά σε ποικιλίες που είναι πλούσιες σε πηκτινικές ουσίες. Τέλος, πρέπει να αποφεύγονται τα σκευάσματα που περιέχουν β-γλυκοζιδάση, η οποία μπορεί να υδρολύει τους ανθοκυανικούς γλυκοζίτες με αποτέλεσμα να αποσταθεροποιούνται οι ανθοκυάνες του κρασιού (Συμεού, 2010).

5.3.2.2 Οινοποιητές

Όταν ξεκινήσει η αλκοολική ζύμωση το διοξείδιο του άνθρακα που εκλύεται από τη διάσπαση των σακχάρων ωθεί με μεγάλη δύναμη τα στέμφυλα προς το επάνω μέρος

του δοχείου δημιουργώντας έτσι μια ιδιαίτερα συμπαγή στερεή φάση (γνωστή ως «καπέλλο»), διαχωρισμένη από τον μεγάλο όγκο της υγρής φάσης με αποτέλεσμα η εκχύλιση να είναι ατελής. Εκτός αυτού, τα στέμφυλα που επιπλέουν στην επιφάνεια του γλεύκους βρίσκονται εκτεθειμένα στον υπερκείμενο αέρα με αποτέλεσμα την ανάπτυξη οξικών βακτηριών που αυξάνουν την πτητική οξύτητα του κρασιού.

Έτσι, είναι αναγκαία μία μέθοδος συνεχούς επαφής των δύο φάσεων. Διάφορες τεχνικές χρησιμοποιήθηκαν κατά καιρούς όπως η εμβάπτιση των στεμφύλων στην υγρή φάση. Τελικά, επικράτησε η μέθοδος της διαβροχής της στερεής φάσης από την υγρή (ανακύκλωση του γλεύκους) με χρήση αντλιών. Τα τελευταία χρόνια είναι διαθέσιμες στο εμπόριο δεξαμενές από ανοξείδωτο χάλυβα με εσωτερικούς ψυκτήρες για αυτόματη ρύθμιση της θερμοκρασίας, παροχή αδρανούς αερίου και αυτόματη ανακύκλωση του γλεύκους οι οποίες και χαρακτηρίζονται ως οινοποιητές. Οι δεξαμενές αυτές περιλαμβάνουν ακόμα και έναν παράπλευρο μετρητή στάθμης και ένα σωλήνα εξόδου για δειγματοληψίες.



Εικόνα 5.1 Οινοποιητή από ανοξείδωτο χάλυβα με σύστημα παροχής αδρανούς αερίου

Η δεξαμενή οινοποίησης συνήθως χωρίζεται σε δύο άνισα τμήματα από ένα διάτρητο φύλλο ανοξείδωτου χάλυβα το οποίο κρατάει τα στέμφυλα βυθισμένα μέσα στο γλεύκος. Στον κεντρικό άξονα της δεξαμενής υπάρχει ένας διάτρητος σωλήνας του οποίου το πάνω άκρο απολήγει πάνω από το διάτρητο φύλλο και κλείνεται με σκέπασμα. Η δεξαμενή έχει επίσης έναν πλευρικό σωλήνα που χρησιμοποιείται για την ανακύκλωση του γλεύκους με τη βοήθεια αντλίας. Όλος αυτός ο εσωτερικός εξοπλισμός είναι κινητός και μπορεί να αφαιρείται ώστε μετά το πέρας της οινοποίησης ο οινοποιητής να χρησιμοποιείται ως δεξαμενή επεξεργασίας και αποθήκευσης του κρασιού.

Ένα εναλλακτικό μοντέλο οινοποιητή περιλαμβάνει και ένα πλευρικό σωλήνα, στο άνω άκρο του οποίου είναι προσαρμοσμένο ένα ελευθέρα περιστρεφόμενο σύστημα

διαμερισμού του ανακυκλούμενου γλεύκους, προς έκπλυση των σταφυλιών. Στο σύστημα αυτό δεν υπάρχει πλέγμα και τα στέμφυλα σχηματίζουν «καπέλλο» στην επιφάνεια του ζυμώμενου γλεύκος ενώ διαβρέχονται απ' ευθείας από το ανακυκλούμενο γλεύκος. Μια άλλη βασική διαφορά είναι στον εσωτερικό πυθμένα της δεξαμενής, εκεί που βρίσκεται η θυρίδα εκκένωσης από τα στέμφυλα, όπου είναι προσαρμοσμένο ένα διπλό πτερύγιο με άνοιγμα περίπου ίσο με τη διάμετρο του πυθμένα. Όταν το υγρό απομακρύνεται από τη δεξαμενή και τα στέμφυλα συγκεντρωθούν στον πυθμένα, το πτερύγιο τα ωθεί αυτόματα προς τη θυρίδα και στη συνέχεια μεταφέρονται στο πιεστήριο. Πέρα από αυτούς τους δύο τύπους, υπάρχουν και άλλοι που η αρχή της λειτουργίας τους μπορεί να διαφέρει σημαντικά.

Οι δύο τρόποι με τους οποίους γίνεται η ανακύκλωση του γλεύκους ο «φυσικός» και ο «ενισχυμένος» είναι κοινοί και για τους δύο τύπους οινοποιητών.

Ο φυσικός τρόπος προϋποθέτει ανοικτό το σκέπασμα του κεντρικού σωλήνα και βασίζεται στην πίεση που ασκεί το εκλυόμενο διοξείδιο του άνθρακα. Η πίεση αυτή ωθεί το γλεύκος στο εσωτερικού του κεντρικού διάτρητου σωλήνα. Στη συνέχεια αυτό ανέρχεται μέσω του κεντρικού σωλήνα πάνω από την επιφάνεια της δεξαμενής και τη διαβρέχει.

Ο ενισχυμένος τρόπος προϋποθέτει κλειστό το σκέπασμα του κεντρικού σωλήνα και σε λειτουργία το σύστημα ανακύκλωσης μέσω αντλίας που συνδέεται αφενός στον πλευρικό σωλήνα ανακύκλωσης και αφετέρου σε κρουνό προσαρμοσμένο στο κάτω άκρο του κεντρικού σωλήνα. Το γλεύκος που αντλείται από το εσωτερικό του διάτρητου σωλήνα είναι απαλλαγμένο από στέμφυλα, επομένως δεν υπάρχει κίνδυνος φραξίματος του συστήματος ανακύκλωσης. Ο αριθμός ανακυκλώσεων ανά ώρα και η διάρκεια της εκάστοτε ανακύκλωσης ρυθμίζονται από έναν χρονοδιακόπτη (Κουράκου, 1998, Ribérau-Gayon et al., 2006).

Σημαντική παράμετρο των ανακυκλώσεων αποτελεί το γεγονός ότι κατά τη πραγματοποίηση τους μπορεί να γίνει και ο απαραίτητος αερισμός του γλεύκους. Ο αερισμός είναι απαραίτητος για το μεταβολισμό των ζυμών και τη λήψη του απαραίτητου οξυγόνου κυρίως κατά το πρώτο 48ωρο της αλκοολικής ζύμωσης. Θα πρέπει να λαμβάνονται υπ'όψιν και οι θερμοκρασιακές μεταβολές που συμβαίνουν λόγω του αερισμού σε συνδυασμό με τη παραγόμενη από τη ζύμωση θερμότητα.

Μετά την αλκοολική ζύμωση, και υπό τις κατάλληλες συνθήκες (μικρές ποσότητες θείωσης, κατάλληλη θερμοκρασία κ.α.) πραγματοποιείται η μηλογαλακτική ζύμωση από τα γαλακτικά βακτήρια. Η μηλογαλακτική ζύμωση στην ερυθρή οινοποίηση αποτελεί μια ευρέως διαδεδομένη διεργασία και σπάνια παραλείπεται. Μειώνει την οξύτητα του κρασιού, μετατρέποντας το μηλικό οξύ σε γαλακτικό επηρεάζοντας και τα γευστικά και αρωματικά χαρακτηριστικά του παραγόμενου κρασιού. Μετά το τέλος της, το κρασί μεταγγίζεται άμεσα και γίνεται νέα προσθήκη θειώδη ανιδρύτη, για την αναστολή της δράσης των γαλακτικών βακτηρίων (Σουφλερος, 1997).

5.3.2.3 Διαχωρισμός κρασιού και στεμφύλων

Ο διαχωρισμός γίνεται σε δύο φάσεις. Στη πρώτη φάση γίνεται η απομάκρυνση της ελεύθερης υγρής φάσης που αποτελεί περίπου το 85% του ολικού όγκου του κρασιού. Η απομάκρυνση του κρασιού γίνεται συνήθως από τον πυθμένα της δεξαμενής όπως παρουσιάστηκε στους οινοποιητές. Συχνά, χρησιμοποιείται συσκευή απομάκρυνσης των γιγάρτων. Ο ***οίνος εκροής***, όπως ονομάζεται, απομακρύνεται και διοχετεύεται σε νέα δεξαμενή επεξεργασίας με τη βοήθεια σωληνώσεων και αντλιών ή όταν υπάρχει η κατάλληλη διαμόρφωση χώρου μέσω της βαρύτητας.

Το υπόλοιπο 15% του οίνου κατακρατείται από τα στέμφυλα και παραλαμβάνεται με την πίεση αυτών. Υπάρχει ένα πλήθος διαφορετικών τύπων πιεστηρίων που παράγουν διαφορετικής ποιότητας προϊόν. Γενικά, το παραγόμενο προϊόν, που *ονομάζεται* ***οίνος πίεσης,*** θεωρείται κατώτερο ποιοτικά από τον οίνο εκροής. Παρά ταύτα, ο οίνος πίεσης είναι πλουσιότερος σε όλα τα συστατικά του από τον οίνο εκροής, με εξαίρεση την περιεκτικότητά του σε αλκοόλη, και χρησιμοποιείται, κατά κόρον, κυρίως αυτός που προκύπτει από την πρώτη πίεση, για τις διάφορες αναμείξεις.

Στη συνέχεια ακολουθούν κάποιες μεταζυμωτικές διεργασίες με πιο βασικές τη διαύγαση και τη σταθεροποίηση όπως θα παρουσιαστούν παρακάτω (Κουράκου, 1997, Σουφλερός 1998).

5.3.3 Θερμοοινοποίηση

Κατά την εφαρμογή της κλασσικής μεθόδου ερυθρής οινοποίησης, παρόλο που οι υψηλές θερμοκρασίες ευνοούν την εκχύλιση των χρωστικών και άλλων φαινολικών,

η οινοποίηση πρέπει να περιορίζεται σε θερμοκρασίες μέχρι 35° C, καθώς σε υψηλότερες θερμοκρασίες εμφανίζονται προβλήματα στην αντοχή των σακχαρομυκήτων. Έτσι, ακόμα και υπό τις καλύτερες συνθήκες της κλασσικής μεθόδου δεν εκχυλίζεται ποσοστό μεγαλύτερο του 30% του συνολικού ανθοκυανικού περιεχομένου των ραγών. Από την άλλη, η διεξαγωγή της ζύμωσης σε αυτές τις θερμοκρασίες με σκοπό την καλύτερη δυνατή εκχύλιση προκαλεί απώλειες σε πτητικές αρωματικές ενώσεις που σχηματίζονται.

Με την θερμοοινοποίηση ("thermovinification") η διεξαγωγή της αλκοολικής ζύμωσης και τις εκχύλισης γίνεται σε δύο διαφορετικά στάδια. Αρχικά, τα σταφύλια ακέραια ή αφού έχουν υποστεί έκθλιψη θερμαίνονται με συνέπεια την ταχεία διάχυση των φαινολικών συστατικών των φλοιών και των γιγάρτων στο γλεύκος της ράγας. Στη συνέχεια ξεκινά η αλκοολική ζύμωση αφού όμως έχει προηγηθεί ο διαχωρισμός των στεμφύλων από το γλεύκος (Κουράκου, 1997).

Η θερμοοινοποίηση χρησιμοποιείται κυρίως σε σταφύλια που προέρχονται από καλλιέργειες με χαμηλό ανθοκυανικό περιεχόμενο ή σε σταφύλια που έχουν μολυνθεί από λακάση. Η διεργασία περιλαμβάνει τη θέρμανση των ακέραιων ή σπασμένων σταφυλιών σε θερμοκρασίες 50-80° C. Σε ορισμένες περιπτώσεις γίνεται μικρής διάρκειας (περίπου ένα λεπτό) θέρμανση με χρήση ατμού ή βραστού νερού, η οποία θερμαίνει μόνο το φλοιό των ραγών σε θερμοκρασίες περίπου 80° C. Έτσι, επιτυγχάνεται καταστροφή των κυτταρικών μεμβρανών και άμεση εκχύλιση των φαινολικών συστατικών, ιδιαίτερα των ανθοκυανών στο γλεύκος. Σε άλλες τεχνικές τα σταφύλια θερμαίνονται σε θερμοκρασίες 55-70° C με χρήση σωληνοτών εναλλακτών θερμότητας ενώ όταν η ποικιλία που χρησιμοποιείται έχει λεπτά αρωματικά χαρακτηριστικά που μπορεί να εξασθενίσουν από τη διεργασία, η θέρμανση γίνεται σε ακόμα χαμηλότερες θερμοκρασίες μέχρι 50° C.

Σε θερμοκρασίες πάνω από 60° C απενεργοποιούνται οι λακκάσες, γι' αυτό και η χρήση της μεθόδου αυτής είναι ιδιαίτερα χρήσιμη σε κόκκινα σταφύλια που έχουν μολυνθεί από βοτρύτη. Ενώ η θερμοοινοποίηση βελτιώνει δραστικά την εκχύλιση των ανθοκυανών, το ίδιο δεν μπορεί να ειπωθεί και για την εκχύλιση των τανινών. Για το λόγο αυτό, τα ερυθρά κρασιά που παράγονται με τη μέθοδο αυτή προορίζονται για άμεση κατανάλωση και δεν ενδείκνυνται για μακροχρόνια παλαίωση. Τα κρασιά

αυτά έχουν έντονο ερυθρό χρώμα, όχι ιδιαίτερα υψηλή οξύτητα και διαφοροποιημένα αρωματικά και γευστικά χαρακτηριστικά σε σχέση με τα αντίστοιχα που προκύπτουν από την κλασσική μέθοδο (Jackson, 2008).

Αφού διαχωριστεί το γλεύκος εκροής από τα στέμφυλα, τα τελευταία οδηγούνται στο πιεστήριο όπου λαμβάνεται το γλεύκος πίεσης. Τα δύο αυτά γλεύκη, που στη συνέχεια οινοποιούνται συνήθως ξεχωριστά, έχουν ερυθρό χρώμα. Η θερμοοινοποίηση βελτιώνει την διαδικασία τόσο της αλκοολικής όσο και της μηλογαλακτικής ζύμωσης που πλέον πραγματοποιούνται σε μία φάση, δίχως ανάγκη για ανακύκλωση του γλεύκους και στο επιθυμητό θερμοκρασιακό εύρος. Η χρήση των οινοποιητών γίνεται, επίσης, πιο αποτελεσματική, αφού εκμεταλλεύεται το σύνολο της χωρητικότητας τους.

Στα αρνητικά της μεθόδου, πρέπει να αναφερθεί η δημιουργία κάποιων ανεπιθύμητων οργανοληπτικών χαρακτηριστικών αλλά και προβλήματα στα μετέπειτα στάδια της διαύγασης και του φιλτραρίσματος λόγω της καταστροφής των πηκτινών του σταφυλιού τα οποία μπορούν να διορθωθούν με προσθήκη πηκτινάσης. Τέλος, ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται στο θερμοκρασιακό έλεγχο αφού τόσο η θέρμανση όσο και η αλκοολική ζύμωση πραγματοποιούνται σε υψηλότερες από το συνηθισμένο θερμοκρασίες (Κουρακου 1998, Jackson, 2008).

5.3.4 Ανθρακική αναεροβίωση

Ανθρακική αναεροβίωση (“vinification par macération carbonique”) ονομάζεται η τεχνική οινοποίησης που αξιοποιεί τα φαινόμενα του αναερόβιου μεταβολισμού, τα οποία εκδηλώνονται αυθόρμητα μέσα στις ανέπαφες ράγες σταφυλιών, όταν αυτές βρεθούν σε περιβάλλον κορεσμένο με διοξείδιο του άνθρακα και απουσία οξυγόνου. Επειδή τα φαινόμενα αυτά πραγματοποιούνται υπό την επίδραση μόνο των ενζύμων της ράγας ο αναερόβιος μεταβολισμός λέγεται και ***ενδοκυτταρική ζύμωση***. Η χρήση της μεθόδου αυτής δίνει χαρακτηριστικό άρωμα στο παραγόμενο κρασί.

Τα σταφύλια ακέραια, χωρίς να έχει προηγηθεί έκθλιψη ή αποβοστρύχωση μεταφέρονται στους οινοποιητικές όπου έχει απομακρυνθεί ο αέρας με διοχέτευση διοξειδίου του άνθρακα. Μετά το γέμισμα οι δεξαμενές κλείνονται αεροστεγώς. Κατά το γέμισμα των δεξαμενών και υπό το βάρος των υπερκείμενων σταφυλιών μέρος των

ραγών συνθλίβεται. Έτσι, μέσα στη δεξαμενή και υπό ατμόσφαιρα διοξειδίου του άνθρακα συνυπάρχουν:

- Γλεύκος στο κάτω μέρος της δεξαμενής (υγρή φάση)
- Σταφύλια ολόκληρα με ανέπαφες ράγες στην αέρια φάση
- Σταφύλια ολόκληρα με ανέπαφες ράγες εμβαπτισμένα στο γλεύκος
- Σταφύλια με σπασμένες ράγες στην αέρια φάση
- Σταφύλια με σπασμένες ράγες εμβαπτισμένα στο γλεύκος

Όλα τα παραπάνω αποτελούν υποστρώματα ενός πλήθους διαφορετικών αντιδράσεων που διαφέρουν ως προς τη φύση και την ένταση τους. Στις σπασμένες ράγες και στο γλεύκος τα σταφύλια ζυμώνονται υπό την επίδραση των ενζύμων των σακχαρομυκήτων παρουσία των στεμφύλων, πραγματοποιείται δηλαδή μια κλασική ερυθρή οινοποίηση όπου η ατμόσφαιρα εμπλουτίζεται σε ατμούς αιθυλικής αλκοόλης και άλλων πτητικών ουσιών. Στα σταφύλια που οι ράγες τους έχουν παραμείνει ανέπαφες εκδηλώνεται αναερόβιος μεταβολισμός τόσο στην αέρια όσο και στην υγρή φάση με μειωμένη πάντως ένταση.

Κατά τον αναερόβιο μεταβολισμό πραγματοποιείται μια ενδοκυτταρική ζύμωση των σακχάρων και του μηλικού οξέος με ταυτόχρονα φαινόμενα διάχυσης των φαινολικών συστατικών από τους φλοιούς προς τη σάρκα των ραγών. Επιπλέον, οι κατεχίνες και οι προκυανιδίνες των γιγάρτων δεν συμμετέχουν στη διάχυση με αποτέλεσμα το παραγόμενο κρασί να έχει έντονο χρώμα αλλά να απουσιάζει η τραχύτητα λόγω των τανινών που εμφανίζουν τα φρέσκα ερυθρά κρασιά της κλασσικής οινοποίησης (Κουράκου, 1998).

Η διάρκεια παραμονής των σταφυλιών στο αναερόβιο περιβάλλον εξαρτάται κυρίως από τη θερμοκρασία. Σε θερμοκρασία 25-28° C για τα επιθυμητά αποτελέσματα της εκχύλισης απαιτούνται 8 μέρες παραμονής στον οινοποιητή ενώ όταν η θερμοκρασία μειώνεται στους 20° C, το αντίστοιχο διάστημα είναι 15 μέρες (Σουφλερός, 1997).

Μετά το πέρας του αναερόβιου μεταβολισμού, το γλεύκος που έχει συγκεντρωθεί στο κάτω μέρος της δεξαμενής και έχει σχεδόν αποζυμωθεί εκρέει και μεταγγίζεται σε

νέα δεξαμενή προς ολοκλήρωση της ζύμωσης ή προς περαιτέρω επεξεργασία. Το γλεύκος αυτό αποτελεί το 40-60% του συνολικά παραλαμβανόμενου γλεύκους. Τα σταφύλια που παρέμειναν υπό αναερόβιες συνθήκες οδηγούνται στο πιεστήριο και πιέζονται. Στη συνέχεια επειδή το γλεύκος που παραλαμβάνεται από το πιεστήριο είναι πλούσιο σε αζύμωτα σάκχαρα μεταγγίζεται σε νέο οινοποιητή όπου πραγματοποιείται μικροβιακή αλκοολική ζύμωση (ζύμωση από σακχαρομύκητες). Η ανάπτυξη των ζυμών σε μια τέτοια ατμόσφαιρα διοξειδίου του άνθρακα είναι εξαιρετική και η μικροβιακή ζύμωση που περιλαμβάνει και την αλκοολική και τη μηλογαλακτική ζύμωση ολοκληρώνεται σύντομα.

Το κρασί ανώτερης ποιότητας με τα ιδιαίτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά σε αντίθεση με την κλασσική μέθοδο είναι αυτό που προκύπτει από το γλεύκος πίεσης και όχι από το γλεύκος εκροής. Ο οίνος εκροής συνήθως αναμιγνύεται σε μικρές αναλογίες με τον οίνο πίεσης για τη δημιουργία του επιθυμητού χαρμανιού (Σουφλερος, 1997, Κουράκου 1998).

5.4 Μεταζυμωτικές διεργασίες

Αφού ολοκληρωθεί η αλκοολική ζύμωση το κρασί μεταγγίζεται σε νέες δεξαμενές ώστε να γίνει η απολάσπωση από ένα στερεό στρώμα που αποτελείται από αιωρούμενα στερεά και έχει κατακαθίσει στον πυθμένα του οινοποιητή. Το ίζημα αυτό αποτελείται από ένα πλήθος ουσιών που περιλαμβάνουν νεκρούς ζυμομύκητες, πρωτεΐνες, πηκτινικές ουσίες, χρωστικές, υπολείμματα στερεών μερών του σταφυλιού, κρυστάλλους αλάτων και άλλες ουσίες που μπορεί να επηρεάσουν τόσο τον οργανοληπτικό χαρακτήρα του κρασιού όσο και τη διαύγεια του. Οι μεταγγίσεις αυτές συνήθως επαναλαμβάνονται μετά τη σταθεροποίηση και πριν τη συσκευασία για τα λευκά κρασιά ενώ στα ερυθρά που παλαιώνουν για μεγάλη χρονική διάρκεια απολασπώσεις πραγματοποιούνται κάθε 6 μήνες.

Στη συνέχεια και στις νέες δεξαμενές επεξεργασίας που μεταγγίζεται το κρασί μπορεί να γίνουν και οι διάφορες αναμίξεις μεταξύ κρασιών εκροής και πίεσης, διαφορετικών ποικιλιών, διαφορετικής ωρίμανσης και διαφορετικής οινοποίησης. Πριν ολοκληρωθεί η οινοποίηση και το κρασί οδηγηθεί προς συσκευασία ή παλαίωση σε βαρέλι πραγματοποιούνται δύο βασικές διεργασίες, η διαύγαση και η

σταθεροποίηση του κρασιού, για να εξασφαλιστεί η διαύγεια, η αποφυγή θολώματος στο μέλλον και λοιπές οργανοληπτικές αστοχίες (Eisenman, 1998).

5.4.1 Διαύγαση

Ακόμα και μετά την απολάσπωση στο κρασί παραμένουν αιωρούμενα στερεά που προκαλούν θολότητα και ανεπιθύμητα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Τα κυριότερα από αυτά είναι ζυμομύκητες, βακτήρια, πρωτεϊνικές ενώσεις, πολυσακχαρίτες, τανικές ενώσεις και πολυμερή του τρυγικού οξέος. Η ανάγκη για διαύγαση και σταθεροποίηση είναι συνήθως πιο έντονη στη λευκή οινοποίηση και πρέπει να γίνει σε μικρό χρονικό διάστημα μετά το πέρας της οινοποίησης σε αντίθεση με τα ερυθρά κρασιά, στα οποία, λόγω της παλαίωσης τους σε βαρέλια, μεγάλο ποσοστό των αιωρημάτων κατακάθεται υπό την επίδραση της βαρύτητας. Οι δύο βασικές μέθοδοι διαύγασης του οίνου είναι το «κολλάρισμα» (“fining”) και η διήθηση («φιλτράρισμα») (Eisenman, 1998, Jackson, 2008).

5.4.1.1 Κολλάρισμα

Κολλάρισμα ονομάζεται η προσθήκη στο κρασί ενός προϊόντος, φυσικού ή συνθετικού που προκαλεί την καθίζηση των αιρούμενων στερεών και στη συνέχεια τη διαύγαση του κρασιού. Τα προϊόντα αυτά, που είναι στην πλειοψηφία του πρωτεϊνούχες ουσίες, έχουν την ιδιότητα να συσσωματώνονται και να καθιζάνουν, συμπαρασύροντας κατά την πτώση τους τα αιωρούμενα στερεά.

Είναι προτιμότερο να πραγματοποιείται άμεσα μετά το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης ώστε να μη χάνονται τα χρωστικά πολυμερή, που σχηματίζονται κατά την παλαίωση του κρασιού, λόγω της συμπλοκοποίησης τους με την πρωτεΐνες που οδηγεί στην ιζηματοποίηση τους (Harbertson, 2008). Ο χρόνος που απαιτείται για τη δράση των πρωτεϊνούχων κολλών είναι πολύ μικρός από 15 λεπτά ως μία ώρα, ενώ ο χρόνος που απαιτείται για την κατακάθιση των σωματιδίων είναι περίπου 2 με 3 μέρες και εξαρτάται από την πυκνότητα του κρασιού, τον όγκο, τη θερμοκρασία και το ποσότητα κολλών που προστίθενται (Boulton et al., 1996).

Τα κυριότερα φυσικά διαυγαστικά μέσα περιλαμβάνουν τον μπετονίτη, τον άνθρακα, τη ζελατίνη, την ιχθυόκολλα, την καζεΐνη, την αλβουμίνη που προέρχεται από τα ασπράδια των αυγών καθώς και βοηθητικά μέσα όπως οινολογικές τανίνες και

εμπορικά ένζυμα για την απομάκρυνση πολυσακχαριτών. Πολύ κοινά εμπορικά σκευάσματα που χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία για το κολλάρισμα είναι τα Kieselsol, Sparkolloid και η πολυβυνιλοπολυπυρολιδόνη (PVPP) (Eisenman, 1998, Harbertson, 2008).

5.4.1.2 Διαύγαση με Διήθηση (Φιλτράρισμα)

Μετά την ολοκλήρωση του κολλαρίσματος πάντα παραμένει στο κρασί ένα ποσοστό αιωρούμενων σωματιδίων καθώς και υπολείμματα των πρωτεϊνούχων κολλών που χρησιμοποιήθηκαν. Για την απομάκρυνση των στερεών αυτών αλλά και την αποστείρωση του κρασιού, αφού ολοκληρωθεί η απολάσπωση μετά το κολλάρισμα, ακολουθεί η διήθηση του κρασιού. Όταν η διήθηση πραγματοποιηθεί σωστά η χρωματική και οργανοληπτική υποβάθμιση του κρασιού είναι ελάχιστη.

Αν και υπάρχουν διάφοροι τύποι φίλτρων όπως φίλτρα γης διατόμωνν και φίλτρα με μεμβράνες αυτά που χρησιμοποιούνται σε συντριπτική πλειοψηφία στη βιομηχανία είναι τα φίλτρα με πλάκες. Τα φίλτρα πλακών αποτελούνται από έναν αριθμό πλαστικών ή μεταλλικών πλαισίων τα οποία συγκρατούνται μεταξύ τους από έναν ισχυρό σκελετό. Κάθε πλαίσιο διαχωρίζεται από το επόμενο με το διηθητικό μέσο.

Η διήθηση γίνεται με δύο μηχανισμούς. Είτε με φαινόμενα προσρόφησης στο «φίλτρο βάθους» (“depth filters”) είτε μέσω κοσκινίσματος στα φίλτρα μεμβρανών. Τα φίλτρα βάθους κατασκευάζονται συνήθως από ειδικά επεξεργασμένη κυτταρίνη σε ένα μεγάλο εύρος διαστάσεων και διαφορετικού πορώδους. Χρησιμοποιούνται για την απομάκρυνση υπολειμμάτων του σταφυλιού, κρυστάλλων του τρυγικού οξέος, κυττάρων των ζυμών και σκόνης. Τα φίλτρα μεμβρανών είναι υψηλού κόστους και κατασκευάζονται από διάφορα πλαστικά είδη όπως από σελοφάν, πολυεστέρα και προπυλένιο και χρησιμοποιούνται για την αποστείρωση του κρασιού (Σουφλερος, 1997, Eisenman, 1998).

5.4.2 Σταθεροποίηση

Ακόμα και με την ολοκλήρωση της διαύγασης ο οινοπαραγωγός πρέπει να εξασφαλίσει ότι το κρασί δε θα παρουσιάσει θολώματα ή ιζήματα μετά την παλαίωση ή/και τη συσκευασία του προϊόντος. Οι σημαντικότεροι παράγοντες που μπορεί να αποσταθεροποιήσουν το κρασί είναι τα υπολειπόμενα σάκχαρα, υπολείμματα

πρωτεϊνών και τρυγικού οξέος καθώς και το υπολειπόμενο μηλικό οξύ σε ερυθρά κρασιά. Τα υπολειπόμενα σάκχαρα μπορεί να επανεκκινήσουν την αλκοολική ζύμωση όπως και το μηλικό οξύ και τα γαλακτικά βακτήρια τη μηλογαλακτική ζύμωση στη συσκευασία. Και τα δύο αυτά φαινόμενα είναι ανεπιθύμητα και πρέπει να ανασταλεί η δράση τους.

Υπάρχουν διαφορετικές μέθοδοι σταθεροποίησης του κρασιού. Στις φυσικές μεθόδους περιλαμβάνονται η θέρμανση και η ψύξη του οίνου καθώς και μια τεχνική που συνδυάζει και τις δύο μεθόδους. Στις χημικές μεθόδους μπορεί να αναφερθεί η αφαίρεση του σιδήρου (Fe) και του χαλκού (Cu) ενώ στις φυσικοχημικές μεθόδους η προσθήκη μπετονίτη, αραβικού κόμμεος ή άλλων παρόμοιων ουσιών. Από το πλήθος των διαφορετικών μεθόδων σταθεροποίησης συνήθως επιλέγεται ένας συνδυασμός τους που καταπολεμάει όλες τις πιθανές αιτίες αλλοίωσης του κρασιού και το σταθεροποιεί σε βάθος χρόνου δίχως όμως να είναι πάντα δυνατή η αποφυγή εμφάνισης θολωμάτων ή ιζημάτων σε κρασιά που έχουν παλαιωθεί για πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα (περισσότερο από 5-10 χρόνια). (Σουφλερός, 1997, Eisenman, 1998).

6 Αποθήκευση-παλαίωση

6.1 Διαλυμένο οξυγόνο στο κρασί

Η σημαντικότερη παράμετρος κατά τη συσκευασία και αποθήκευση του κρασιού είναι ο περιορισμός του ελεύθερου οξυγόνου στον υπερκείμενο χώρο της συσκευασίας αλλά και της ποσότητας διαλυμένου οξυγόνου που περιέχεται στο κρασί. Η απομάκρυνση του οξυγόνου του αέρα στον υπερκείμενο χώρο γίνεται με τη διαβίβαση κάποιου αδρανούς αερίου όπως θα περιγραφεί στο επόμενο υποκεφάλαιο.

Όλες οι δράσεις του οξυγόνου στο κρασί δεν είναι αρνητικές. Σε ορισμένες περιπτώσεις κατά την ωρίμανση, ειδικά, ερυθρών κρασιών σε βαρέλια, παρέχεται στο κρασί μια μικρή ελεγχόμενη δόση οξυγόνου που αναπτύσσει περεταίρω τον οργανοληπτικό του χαρακτήρα (μικροοξυγόνοση). Η ποσότητα του οξυγόνου (O_2) που απαιτείται για τη βέλτιστη εξέλιξη ποικίλει από κρασί σε κρασί. Η έλλειψη επαρκούς οξυγόνου μπορεί να προκαλέσει αναγωγικά φαινόμενα στο συσκευασμένο κρασί (Vidal and Aagaard, 2008). Από την άλλη περίσσεια οξυγόνου μπορεί να αλλοιώσει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του κρασιού (κυρίως μέσω της δράσης σου του με τα φαινολικά συστατικά που αναπτύχθηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο). Τα λευκά κρασιά λόγω του χαμηλού φαινολικού περιεχομένου τους είναι πιο ευάλωτα σε οξειδωτικά φαινόμενα.

Οι οινοπαραγωγοί στοχεύουν σε τιμές διαλυμένου οξυγόνου μέχρι 0,2-0,4 mg/L στο κρασί πριν την εμφιάλωση, ενώ κάποιοι, ειδικά σε κρασιά με μεγάλες συγκεντρώσεις φαινολικών, δέχονται τιμές μέχρι 1 mg/L. Βασικές παράμετροι που επηρεάζουν την ποσότητα διαλυμένου οξυγόνου που περιέχεται στο κρασί είναι ο τύπος της συσκευασίας, ο τρόπος και το υλικό της εμφιάλωσης όταν γίνεται χρήση φιαλών, η ύπαρξη και η σύσταση τροποποιημένης ατμόσφαιρας αδρανούς αερίου καθώς και ο τρόπος και η ταχύτητα παροχής του αδρανούς αερίου (Robertson, 2009). Όταν γίνεται «ξέπλυμα» με ποσότητες αδρανών αερίων περίπου διπλάσιες του όγκου της φιάλης είναι δυνατό να μειωθεί το διαλυμένο οξυγόνο σε συγκεντρώσεις 1-3 mg/L Η θερμοκρασία και οι ανακίνηση του κρασιού κατά την συσκευασία μπορούν επίσης να μεταβάλλουν την τιμή του διαλυμένου οξυγόνου (Boulton et al., 1999).

Ο τρόπος μεταβολής του διαλυμένου οξυγόνου αφού συσκευαστεί το κρασί εξαρτάται από την τιμή του διαλυμένου οξυγόνου κατά την ολοκλήρωση της συσκευασίας, τον όγκο του υπερκείμενου χώρου, την παρουσία οξυγόνου στην ατμόσφαιρα αποθήκευσης και το ρυθμό εισροής του στην συσκευασία, που, με τη σειρά του, εξαρτάται από τον τρόπο πωματισμού και το υλικό συσκευασίας (Robertson, 2009).

6.2 Συσκευασία

Το κρασί συσκευάζεται είτε σε φιάλες, κυρίως γυάλινες αλλά και πλαστικές, είτε σε «ασκούς» (“Bag in Box”). Οι βασικές παράμετροι που καθορίζουν την επιλογή του υλικού συσκευασίες είναι οι περιορισμοί που προκύπτουν από τις διεργασίες, οι προσδοκίες των καταναλωτών, η αντίσταση στη διάβρωση του κρασιού, το κόστος του υλικού και ο περιβαλλοντικός αντίκτυπος (Winder et al., 2002). Αν και η χρήση γυάλινων φιαλών έχει επικρατήσει στο μεγαλύτερο μέρος της βιομηχανίας, παράλληλα υπάρχει αυξανόμενη ζήτηση για εναλλακτικούς, φτηνούς, περιβαλλοντικά φιλικούς τρόπους συσκευασίας.

Η επιλογή του εκάστοτε υλικού συσκευασίας μπορεί να έχει σημαντική επίδραση στη διατήρηση του κρασιού. Σημαντικότερη παράμετρος για τη διατήρηση του κρασιού κατά την αποθήκευση αποτελεί η κινητική της διάχυσης αερίων διαμέσου της συσκευασίας. Πιο συγκεκριμένα, ο έλεγχος των επιπέδων οξυγόνου που διαχέεται στο κρασί καθορίζει σε σημαντικό βαθμό τη διατήρηση της ποιότητας του προϊόντος καθώς τα οξειδωτικά φαινόμενα που λαμβάνουν χώρα λόγω της παρουσίας του οξυγόνου μπορούν να αλλοιώσουν το χρώμα και το γευστικό χαρακτήρα του κρασιού (Barbe et al., 2010). Επιπλέον, τα οξειδωτικά αυτά φαινόμενα συνεισφέρουν στην απώλεια αρωματικής φρεσκάδας, στη σύνθεση πτητικών αρωματικών ουσιών, σε αντιδράσεις ανθοκυανών, ταννινών και πτητικών θειολών καθώς και στη δημιουργία ιζήματος (Moutounet et al., 2004).

Για παράδειγμα, οι πτητικές θειόλες αποτελούν σημαντικό παράγοντα κατά την αποθήκευση κυρίως λευκών κρασιών αφού είναι υπεύθυνες για χαρακτηριστικά αρώματα φρούτων. Η έρευνα των Thibon et al., (2008) έδειξε ότι η συγκέντρωση των πτητικών θειολών μειώνεται τόσο κατά την ωρίμανση σε βαρέλι όσο και μετά τη συσκευασία, παρουσία οξυγόνου (Thibon et al., 2008). Το περιεχόμενο σε πτητικές

θειόλες αποτελεί σημαντικό παράγοντα κατά την οινοποίηση και αποθήκευση κυρίως λευκών κρασιών αφού είναι υπεύθυνες για χαρακτηριστικά αρώματα φρούτων. Παράλληλα, η συγκέντρωση μιας άλλης ένωσης της σοτολόνης (sotolon) που ανήκει στις λακτόνες και είναι υπεύθυνη για χαρακτηριστικά αρώματα που διαφοροποιούνται ανάλογα με τη συγκέντρωση της, αυξάνεται σημαντικά κατά την οξείδωση του κρασιού (Ghidossi et al., 2012).

Η ***γυάλινη φιάλη*** αποτελεί το πιο κοινόχρηστο υλικό συσκευασίας του κρασιού. Το γυαλί αποτελεί ένα ανόργανο, στερεό, διαφανές και εύθραυστο, χωρίς κρυσταλλική δομή, αδιάλυτο στο νερό, θερμοπλαστικό, ρευστοποιήσιμο σε υψηλές θερμοκρασίες υλικό, το οποίο παρασκευάζεται με τήξη διάφορων οξειδίων το σημαντικότερο από τα οποία είναι η πυριτία ($Si0_2$). Επιπλέον, περιέχει νάτριο, ασβέστιο, αλουμίνιο, μαγνήσιο ενώ οι φιάλες χρωματίζονται με διάφορα οξείδια που προστίθενται κατά την κατασκευή τους. Από χημικής άποψης δεν είναι απόλυτα ουδέτερο. Είναι αλκαλικό και αντιδρά με τα όξινα υγρά που προσβάλλουν την επιφάνεια του νέου γυαλιού. Ουσιαστικά πραγματοποιούνται αντιδράσεις ιοντοεναλλαγής μεταξύ κατιόντων νατρίου (Na^+) από την επιφάνεια του γυαλιού και κατιόντων (H^+). Τα άλλα συστατικά του γυαλιού εκχυλίζονται επίσης αλλά σε μικρότερο ποσοστό σε σχέση με το νάτριο και βρίσκονται σε ίχνη.

Τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται ένα εναλλακτικό του γυαλιού, πλαστικό υλικό για την παραγωγή φιαλών το ***τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο ("PET")***. Η χρήση του PET είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη στη συσκευασία άλλων ποτών όπως αναψυκτικά, χυμοί και νερό. Το PET αποτελεί προϊόν πολυμερισμού των μονομερών της αιθανοδιόλης και του τερφθαλικού διμεθυλεστέρα. Η χρήση του έχει πολλά πλεονεκτήματα όπως ευελιξία διαμόρφωσης αφού μπορεί να δώσει περιέκτες σχεδόν οποιασδήποτε μορφής, χρώματος και διαμέτρου. Επιπλέον, η συσκευασία αυτή προσφέρει πλήρη διαφάνεια, μηδενικές εκχυλίσεις, μικρό βάρος, υψηλή μηχανική εντολή και χαμηλό κόστος ενώ είναι και πλήρως ανακυκλώσιμο (Shirakura et al., 2006). Για να εμποδιστεί παραπέρα η διαφυγή αερίου εκτός από μονοστρωματικές τέτοιες φιάλες είναι διαθέσιμες και πολυστρωματικές όπου μεταξύ των στρωμάτων του PET παρεμβάλλονται στρώματα ρητίνης. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτών των ρητινών φραγμού αερίων περιλαμβάνουν ένα συμπολυμερές αιθυλενίου-βυνιλικής αλκοόλης (EVOH)καθώς και το MXD6 νάιλον.

Αρκετά διαδεδομένη είναι και η χρήση ***«ασκών» ("Bag in a Box")*** για τη συσκευασία κρασιών. Συνήθως χρησιμοποιούνται για τη συσκευασία μεγαλύτερων όγκων κρασιών 2-20 λίτρων τα οποία δεν ενδείκνυνται για μακρά παλαίωση. Ο ασκός αποτελείται από έναν ανθεκτικό πλαστικό περιέκτη που όπως και με τη συσκευασία PET κατασκευάζεται από διαφορετικά στρώματα κυρίως πλαστικών πολυμερών ρητινών. Για τη προστασία του περιβάλλεται από ένα ανθεκτικό χάρτινο κουτί. Ο πλαστικός περιέκτης είναι συμπιέσιμος ώστε να εξωθεί το προϊόν από ένα επιστόμιο που είναι ενσωματωμένο στον περιέκτη.

Διάφορες έρευνες έχουν δείξει ότι για τα κόκκινα κρασιά οι διαφορετικοί τύποι συσκευασίας δε διαφέρουν σημαντικά, ως προς τη διατήρηση του κρασιού και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του, για ένα χρονικό διάστημα τουλάχιστον επτά (7) μηνών αφού αναστέλλουν τις περισσότερες δράσεις αλλοίωσης που συμβαίνουν τουλάχιστον κατά την περίοδο αυτή (Mentana et al., 2009). Τα λευκά κρασιά, αντίθετα, εμφανίζουν σημαντικές διαφορές ανάλογα με τη συσκευασία για διάρκεια αποθήκευσης 12 μηνών. Σε έρευνες που πραγματοποιήθηκαν, οι γυάλινες φιάλες αποτέλεσαν τη μοναδική συσκευασία που διατήρησε επαρκώς το προϊόν τόσο οργανοληπτικά όσο και σε σχέση με τα επίπεδα του διαλυμένου οξυγόνου ενώ τη χειρότερη εξέλιξη παρουσίασαν τα κρασιά που συσκευάστηκαν σε φιάλες από PET (Ghidossi et al., 2012).

Όσον αφορά στον τρόπο πωματισμού των κρασιών που συσκευάζονται σε φιάλες, οι κυλινδρικοί φελλοί αποτελούν τον κλασσικό τρόπο εμφιάλωσης. Η στεγανότητα που προσφέρουν έναντι υγρών και αερίων καθώς και η μεγάλη συμπιεστότητα και ελαστικότητα τους, τους καθιστούν ιδανικούς για τον πωματισμό των φιαλών (Silva et al., 2005). Εντούτοις, ορισμένα προβλήματα που εμφανίζονται όπως η «αστοχία του φελλού» που οφείλεται κυρίως στην 2,4,6,-τριχλωροανισόλη (TCA), με αποτέλεσμα η εκάστοτε φιάλη να μη μπορεί να καταναλωθεί λόγω της οργανοληπτικής αλλοίωσης καθώς και η μεταβλητότητα που παρουσιάζουν στη διαπερατότητα και διάχυση αερίων που μπορεί να προκαλέσει οξειδώσεις μετά την εμφιάλωση έχουν ως αποτέλεσμα την εμφάνιση και εναλλακτικών τρόπων πωματισμού με χαρακτηριστικότερο παράδειγμα το βιδωτό μεταλλικό πώμα, η χρήση του οποίου γίνεται ευρέως στην Αυστραλία και τη Νέα Ζηλανδία (Boulton, 2005).

Εκτός από τα βιδωτά πώματα, δύο άλλοι τρόποι παραγωγής συνθετικών πωμάτων είναι διαθέσιμοι σήμερα, έγχυση σε καλούπια (injection molded) και ο πωματισμός με εκβολή (extruded closures). Στη τεχνολογία έγχυσης ένα θερμοπλαστικό πολυμερές λιώνεται και στη συνέχεια εγχύεται υπό πίεση μέσα σε ένα καλούπι. Το πεπιεσμένο υλικό συγκρατείται στο καλούπι μέχρι να στερεοποιηθεί. Τα παραγόμενα με εκβολή πώματα παράγονται ως ένα μακρύ συνεχούς μήκους θερμαινόμενο, θερμοπλαστικό πολυμερές που κόβεται σε κατάλληλο μέγεθος για την κατασκευή των επιμέρους «φελλών». Επιπλέον, εξωθούμενα πώματα κατασκευάζονται μέσω συν-εξώθησης ενός αφρώδους πλαστικού πυρήνα σε συνδυασμό με ένα εξωτερικό στρώμα άκαμπτου πλαστικού (Giunchi, 2005).

6.3 Χρήση αδρανών αερίων κατά την οινοποίηση και την αποθήκευση

Η χρήση των αδρανών αερίων είναι πλέον πολύ διαδεδομένη τόσο στην αποθήκευση του κρασιού, όσο και κατά την οινοποίηση, ειδικά με τις καινούριες τεχνικές οινοποίησης υπό αναερόβιες συνθήκες που χρησιμοποιούνται. Ο βασικός σκοπός της χρήσης αδρανών αερίων είναι να αντικαταστήσει το οξυγόνο στον υπερκείμενο χώρο ενός δοχείου κρασιού (είτε σε δεξαμενές, είτε σε συσκευασίες) ώστε να αποτρέψει οξειδώσεις, άλλες μικροβιακές αλλοιώσεις και χημικές δράσεις ενώ ταυτόχρονα ελαττώνει και τη συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου στο κρασί. Για να αποτρέπεται η ανάπτυξη μικροοργανισμών στην επιφάνεια του κρασιού, το ποσοστό του οξυγόνου στον υπερκείμενο χώρο δε θα πρέπει να ξεπερνά το 0,5%. Η πλήρωση του υπερκείμενου χώρου γίνεται με ένα από τα αδρανή αέρια άζωτο (N_2), διοξείδιο του άνθρακα (CO_2) και αργό (Ar), ή κάποιο μίγμα τους (Rankine, 1996).

Στον πίνακα 6.1 παρουσιάζονται κάποιες βασικές ιδιότητες των αδρανών αυτών αερίων.

	Άζωτο (N_2)	***Διοξείδιο του Άνθρακα (CO_2)***	***Αργό (Ar)***
Μοριακό Βάρος (Mr)	28,01	44,01	39,95
Πυκνότητα [kg/m^3] (25° C, 1 atm)	1,189	1,875	1,691
Ειδική βαρύτητα	1,38	2,26	1,53
Διαλυτότητα σε υδατικό διάλυμα(v/v)	0,017	1,01	0,038

Πίνακας 6.1 Ιδιότητες αδρανών αερίων

Το άζωτο αποτρέπει οξειδώσεις χρωστικών και λιπαρών οξέων. Είναι αδρανές, άοσμο και έχει μικρή διαλυτότητα στο νερό και το κρασί χωρίς συγκεκριμένη αντιβακτηριδιακή ή αντιμυκητιακή δράση. Επειδή είναι πιο ελαφρύ από τον ατμοσφαιρικό αέρα δεν είναι δυνατό να δημιουργήσει ένα στρώμα πάνω από την επιφάνεια του κρασιού (“blanketing”). Για το λόγο αυτό, η χρήση μόνο αζώτου ως αδρανούς αερίου προϋποθέτει ικανή ποσότητα του αερίου ώστε να εκτοπιστεί όλος ο ατμοσφαιρικός αέρας από τον υπερκείμενο χώρο(“flushing”). Απαιτείται, στη πραγματικότητα, ένας όγκος αερίου 3-7 φορές μεγαλύτερος από αυτόν που αντιστοιχεί στον υπερκείμενο χώρο λόγω φαινομένων διασποράς και διάχυσης που συμβαίνουν κατά την μεταβίβαση του αερίου στη δεξαμενή ή στη συσκευασία. Ο όγκος αυτός μπορεί να μειωθεί μόνο ελαττώνοντας την ταχύτητα του αερίου. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με χρήση διασκορπιστήρα αερίων (“sparger”) (Allen, 1991).

Το διοξείδιο του άνθρακα χρησιμοποιείται ευρέως στην βιομηχανία ενώ αποτελεί και προϊόν της αλκοολικής ζύμωσης. Λόγω της μεγάλης διαλυτότητάς του υπάρχει πάντα σε ένα ποσοστό διαλυμένο στο κρασί και επηρεάζει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του. Σε αντίθεση με το άζωτο έχει τόσο αντιβακτηριδιακή όσο και αντιμυκητιακή δράση επιβραδύνοντας και μειώνοντας των πολλαπλασιασμό των αερόβιων βακτηρίων και μυκήτων, απουσία οξυγόνου. Είναι βαρύτερο από τον αέρα, οπότε θεωρείται ότι δημιουργεί ένα στρώμα που καλύπτει την ελεύθερη επιφάνεια του κρασιού (“blanketing”). Λόγω φαινομένων μοριακής διάχυσης όμως και το διοξείδιο του άνθρακα μετά από σύντομο χρονικό διάστημα κατανέμεται ισόποσα σε όλον τον υπερκείμενο χώρο. Όταν χρησιμοποιείται σε μίγματα θεωρείται αποτελεσματικό σε συγκεντρώσεις πάνω από 20% στην τροποποιημένη ατμόσφαιρα (Allen, 1991).

Το αργό υπάρχει στον ατμοσφαιρικό αέρα σε ποσοστό περίπου 1%. Η μικρή αυτή διαθεσιμότητα του εξηγεί και το υψηλό του κόστος. Είναι ένα χημικά αδρανές, άοσμο και άγευστο αέριο. Το ειδικό του βάρος είναι παραπλήσιο του διοξειδίου του άνθρακα αλλά η διαλυτότητα του ανέρχεται στο 38% της αντίστοιχης του διοξειδίου του άνθρακα.

Η τεχνική του διασκορπισμού ("sparging") χρησιμοποιείται για να αφαιρέσει αποτελεσματικά το διαλυμένο οξυγόνο (ή διοξείδιο του άνθρακα) από το κρασί. Η διεργασία βασίζεται στην εφαρμογή του νόμου του Henry σύμφωνα με την οποία η διαλυτότητα ενός αερίου σε μια υγρή φάση είναι ανάλογη της μερικής πίεσης του εν λόγω αερίου στην αέρια φάση που είναι σε επαφή με την υγρή. Κατά τη διάρκεια του ψεκασμού το αδρανές αέριο διοχετεύεται στο κρασί με τη μορφή πολύ λεπτών φυσαλίδων. Καθώς οι φυσαλίδες διασπείρονται, αναπτύσσεται μια μερική πίεση μεταξύ του αδρανούς αερίου (N_2 ή CO_2) και του διαλυμένου αερίου (O_2).

Η διαφορά πίεσης που δημιουργείται προκαλεί την απομάκρυνση του διαλυμένου αερίου από το κρασί. Η αποτελεσματικότητα της διεργασίας εξαρτάται από πλήθος παραγόντων όπως το μέγεθος των φυσαλίδων, το χρόνο επαφής μεταξύ αδρανούς αερίου και κρασιού, τη θερμοκρασία του κρασιού και την παροχή του αερίου. Όσο μικρότερο είναι το μέγεθος των φυσαλίδων τόσο μεγαλύτερη είναι η διεπιφάνεια επαφής άρα και πιο αποτελεσματική η απομάκρυνση του οξυγόνου. Συνήθως η τεχνική πραγματοποιείται στους 15° C με 20° C σε πιέσεις 1-2 atm.

Ο όρος "purging" χρησιμοποιείται για να περιγράψει τη διαδικασία μετατόπισης του αέρα από τον υπερκείμενο χώρο ενός δοχείου ή οποιοδήποτε άλλου περιέκτη με ταυτόχρονη αντικατάστασή του από ένα αδρανές αέριο. Με τον όρο "blanketing" αποδίδεται η προσπάθεια διατήρησης ένός στρώματος αδρανούς αερίου ακριβώς πάνω από την επιφάνεια του κρασιού για να το προστατέψει από διάφορες ανεπιθύμητες δράσεις.

Τα οινοποιεία χρησιμοποιούν διάφορες μεθόδους για να πραγματοποιήσουν τις παραπάνω διαδικασίες Παραδείγματος χάριν, μερικά οινοποιεία χρησιμοποιούν μια φιάλη πεπιεσμένου αερίου από την οποία διοχετεύεται το αδρανές αέριο στο κρασί με χρήση βαλβίδας για τον έλεγχο της ροής του αερίου. Το αέριο διαχέεται στον υπερκείμενο χώρο εκτοπίζοντας τον ατμοσφαιρικό αέρα. Η διαδικασία αυτή

χρησιμοποιείται κυρίως για την κάλυψη του υπερκείμενου χώρου σε μερικώς γεμάτες δεξαμενές, βαρέλια και άλλους περιέκτες. Μια άλλη τεχνική είναι ο «διασκορπισμός» του αερίου μέσα από τη μάζα του κρασιού ώστε το αέριο στη συνέχεια να δημιουργήσει ένα στρώμα στην επιφάνεια του κρασιού. Η ποσότητα του χρησιμοποιούμενο αερίου συνήθως υπολογίζεται εμπειρικά. Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου αυτής σπάνια ελέγχεται και είναι αμφισβητήσιμη.

Κατά τη μεταφορά του κρασιού σε νέους περιέκτες (δεξαμενές, βαρέλια) το κρασί θα πρέπει να προστατεύεται με τη χρήση ενός αδρανούς αερίου. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με την απομάκρυνση του ατμοσφαιρικού αέρα τόσο από το αρχικό όσο και από το τελικό δοχείο μεταφοράς. Η απομάκρυνση του αέρα, όπως προαναφέρθηκε απαιτεί όγκους αδρανούς αερίου 3-7 φορές μεγαλύτερους από τον όγκο του υπερκείμενου χώρου. Είναι, ακόμα επιθυμητή η διοχέτευση αδρανούς αερίου στις σωληνώσεις μεταφοράς και στην αντλία. Η διεργασία του “sparging” μπορεί να πραγματοποιηθεί κατά την άντληση του κρασιού απομακρύνοντας έτσι το ήδη διαλυμένο οξυγόνο στο κρασί. Σε κάθε περίπτωση με την ολοκλήρωση της άντλησης, η συγκέντρωση του οξυγόνου στο κρασί θα πρέπει να ελέγχεται.

Το κρασί είναι ιδιαίτερα ευάλωτο σε οξειδώσεις κατά την εμφιάλωση. Η ανακίνηση του κρασιού με την ταυτόχρονη ύπαρξη οξυγόνου κατά τη διάρκεια της πλήρωσης της φιάλης ευνοεί την οξείδωση του κρασιού. Για το λόγο αυτό η φιάλη «ξεπλένεται» με αδρανές αέριο πριν την πλήρωση. Το κρασί μπορεί, ακόμα να απορροφήσει οξυγόνο από τον υπερκείμενο χώρο της φιάλης και μετά την εμφιάλωση. Έτσι, τα σύγχρονα μηχανήματα εμφιάλωσης είναι σε θέση να διοχετεύουν αδρανές αέριο στις απαιτούμενες ποσότητες τόσο πριν όσο και μετά το γέμισμα της φιάλης.

Ορισμένες φορές το κρασί μπορεί να παραμείνει και σε δεξαμενές αποθήκευσης για μεγάλο χρονικό διάστημα. Οι δεξαμενές αυτές δεν είναι πάντα εντελώς γεμάτες με αποτέλεσμα να υπάρχει και πάλι η ανάγκη μετατόπισης του αέρα από τον υπερκείμενο χώρο και η δημιουργία στρώματος αδρανούς αερίου πάνω από την επιφάνεια του κρασιού. Η παροχή του αδρανούς αερίου συνήθως γίνεται με χρήση διαχύτη αερίων. Τα διαθέσιμα συστήματα συνήθως αποτελούνται από την πηγή του αερίου, της σωληνώσεις παροχής που είναι εφοδιασμένες με βαλβίδες καθώς και ρυθμιστές πίεσης που είναι τοποθετημένοι στο κάτω μέρος της δεξαμενής. Η παροχή

του αερίου ρυθμίζεται αυτόματα: Όταν η δεξαμενή αδειάζει, το αέριο διαχέεται μέσα στη δεξαμενή ενώ όταν η δεξαμενή γεμίζει η παροχή σταματά και το αέριο απομακρύνεται από ειδική βαλβίδα (Wilson 1985, Allen, 1991).

Παρ' ότι η ατμόσφαιρα αδρανούς αερίου χρησιμοποιείται ευρύτατα στην αποθήκευση του κρασιού, δεν υπάρχουν στη βιβλιογραφία μελέτες για την επίδρασή της στα φαινολικά συστατικά του κρασιού. Για το λόγο αυτό αποτέλεσε ένα από τα κύρια αντικείμενα μελέτης της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

7 Εκχύλιση και αντιδράσεις φαινολικών συστατικών

7.1 Εκχύλιση φαινολικών συστατικών

Παρόλο που το ίδιο το γλεύκος περιέχει φαινολικά συστατικά, η ποσότητά τους αυξάνεται σημαντικά στο κρασί λόγω της αυξημένης διαλυτότητας τους σε αιθανολικά διαλύματα σε σχέση με τα καθαρά υδατικά διαλύματα. Η σύσταση σε φαινολικά συστατικά επιδρά σημαντικά στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (χρώμα, γεύση, στυφότητα) του κρασιού και στις δυνατότητες παλαίωσης του. Για το λόγο αυτό οι οινοποιητικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται και οι παράμετροι τους επιλέγονται με κύριο σκοπό να αποδώσουν μια επιθυμητή φαινολική σύσταση στο τελικό προϊόν (Kennedy and Peyrot des Gachons, 2003).

Καθώς η μεγάλη πλειοψηφία των φαινολικών συστατικών (με εξαίρεση τα μη φλαβονοειδή) συγκεντρώνεται στα στερεά μέρη του σταφυλιού, η εκχύλιση τους στο γλεύκος εξαρτάται αρχικά από το διάρκεια παραμονής των στεμφύλων με το γλεύκος. Ενώ στην λευκή οινοποίηση η διαδικασία αυτή μπορεί να μην πραγματοποιείται, για την ερυθρή οινοποίηση είναι απαραίτητη η εκχύλιση των ανθοκυανών από τους φλοιούς των ραγών για την παραγωγή ερυθρών κρασιών. Στην ερυθρή οινοποίηση, η διάχυση των φαινολικών ξεκινά κατά την έκθλιψη των σταφυλιών και συνεχίζεται μέχρι το διαχωρισμό των στεμφύλων από το γλεύκος. Επομένως, ο ρυθμός διάχυσης κάθε επιμέρους ομάδας φαινολικών συστατικών εξαρτάται τόσο από τη διαλυτότητα τους όσο και από τη θέση τους στο σταφύλι. Εκτός από τους δύο αυτούς βασικούς παράγοντες, η εκχύλιση των φαινολικών εξαρτάται από ένα σύνολο επιπλέον παραμέτρων, που περιλαμβάνουν τη συγκέντρωση σε αλκοόλη και θειώδη ανιδρύτη της υγρής φάσης, τη θερμοκρασία, το βαθμό ομογενοποίησης του γλεύκους καθώς και άλλους παράγοντες που θα αναλυθούν στη συνέχεια (Cheynier, 2006).

Η γενική κατανομή των φαινολικών στο σταφύλι εκτιμάται ότι είναι περίπου η ακόλουθη (Singleton and Esau, 1969):

Μέρος του σταφυλιού	*ποσοστό φαινολικών*
Σάρκα και χυμός	6 %
Φλοιός της ράγας	51%
Γίγαρτα	40 %

Πίνακας 7.1 % σύσταση φαινολικών στα μέρη του σταφυλιου

Τα φαινολικά οξέα και τα παράγωγά τους, που είναι τα μόνα φαινολικά συστατικά που βρίσκονται σε σημαντικές συγκεντρώσεις στη σάρκα του σταφυλιού, είναι τα πρώτα που εκχυλίζονται. Το ίδιο γρήγορα αρχίζουν να εκχυλίζονται και οι ανθοκυάνες. Ο ρυθμός εκχύλισης τους είναι μεγάλος τις πρώτες μέρες της εκχύλισης και στη συνέχεια μειώνεται ξαφνικά. Σε εκτεταμένη εκχύλιση έχει παρατηρηθεί ότι, είτε το ανθοκυανικό περιεχόμενο δεν αυξάνεται σημαντικά μετά από κάποιες μέρες εκχύλισης, είτε ότι μειώνεται λόγω αντιδράσεων των ανθοκυανών, ανάλογα με τις διάφορες παραμέτρους οινοποίησης. Η συγκέντρωση των ανθοκυανών στο γλεύκος αυξάνεται γρήγορα λόγω της διάχυσης των γλυκοζιτών της μαλβιδίνης και των μη ακυλιωμένων γλυκοζιτών των υπόλοιπων ανθοκυανών που διαχέονται γρηγορότερα από τους αντίστοιχους ακετυλιωμένους και κουμαριλιωμένους γλυκοζίτες. Στη συνέχεια, τα σχετικά ποσοστά των μη ακυλιωμένων μορφών μειώνονται κατά τη διάρκεια των πρώτων ημερών της εκχύλισης, και αυτά των ακετυλιωμένων και των κουμαριλιωμένων γλυκοζιτών αυξάνονται (González-Neves et al., 2007, Puértolas et al., 2011).

Η ανάλυση με σύστημα HPLC μετά από θειόλυση, έχει δείξει ότι οι προανθοκυανιδίνες των φλοιών εκχυλίζονται γρηγορότερα από τις αντίστοχιες των γιγάρτων, εξαιτίας τόσο της θέσης τους στη στερεή φάση όσο και της υψηλότερη διαλυτότητα σε υδατική φάση των προδελφινιδών σε σχέση με τις εστεροποιημένες προκυανιδίνες. Η εκχύλιση των προκυανιδινών από τα γίγαρτα ξεκινά μετά από μια λανθάνουσα φάση, όταν αρχίσει να αυξάνεται και η περιεκτικότητα σε αλκοόλη. Τα πολυμερή μεγάλου μοριακού βάρους διαχέονται με μικρότερο ρυθμό από τα αντίστοιχα χαμηλότερου μοριακού βάρους με αποτέλεσμα το μέσο μήκος αλυσίδας να αυξάνεται συναρτήσει του χρόνου εκχύλισης. Τέλος, και οι φλαβονόλες εκχυλίζονται σχετικά αργά, και για το λόγο αυτό βρίσκονται σε σημαντικές συγκεντρώσεις μόνο στα γλεύκη που έχουν παραμείνει εκτεταμένο χρονικό διάστημα

διάστημα σε επαφή με τα στέμφυλα (Κουράκου, 1998, Cheynier, 2006, Jackson, 2008).

7.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την εκχύλιση των φαινολικών

7.2.1 Χρόνος παραμονής των στεμφύλων με το γλεύκος

Κατά την παραμονή του γλεύκους με τα στέμφυλα, οι ανθοκυάνες των φλοιών διαχέονται ταχύτατα στο γλεύκος ήδη από τις πρώτες μέρες της αλκοολική ζύμωσης και στη συνέχεια ο ρυθμός εκχύλισης τους μειώνεται ενώ τα ολικά φαινολικά συνεχίζουν να διαχέονται στο γλεύκος καθ'όλη τη διάρκεια της παραμονής του με τα στέμφυλα. Η διαφορά αυτή στην εκχύλιση οφείλεται στο ότι οι ανθοκυάνες που είναι ευδιάλυτες και σε υδατικά διαλύματα βρίσκονται αποκλειστικά στα χυμοτόπια των κυττάρων των φλοιών, στις 3-4 εξωτερικές σειρές κυττάρων από όπου διαχέονται εύκολα στο γλεύκος μόλις τα κύτταρα υποστούν πλασμόλυση (Κουράκου, 1998).

Έχει αποδειχθεί ότι παραμονή των στεμφύλων με το γλεύκος 10 ημερών έναντι 5 ημερών αυξάνει τη συγκέντρωση των κρασιών τόσο σε ανθοκυάνες όσο και σε τανίνες, ενώ στα κρασιά που πραγματοποιήθηκε η μεγαλύτερου χρόνου εκχύλιση εμφάνισαν περισσότερα χρωστικά πολυμερή μετά από ένα χρόνο αποθήκευση σε φιάλη. Η μεγαλύτερη αύξηση σε ανθοκυάνες πραγματοποιήθηκε μεταξύ 4^{ης} και 5^{ης} μέρας εκχύλισης, με μικρή αύξηση μετά από τις 10 ημέρες (Gomez-Plaza et al., 2001).

Έρευνα σε μικρής κλίμακας οινοποιητή έδειξε μεγαλύτερη ποσότητα ανθοκυανών σε φρέσκο κρασί στο οποίο είχε γίνει εκτεταμένη εκχύλιση και μεγαλύτερο φορτίο ολικών φαινολικών καθ'όλη την αποθήκευση του κρασιού σε σχέση με το ίδιο κρασί στο οποίο είχε γίνει εκχύλιση μικρότερου χρόνου (Scudamore-Smith et al., 1990). Η μελέτη εκχύλισης σε Cabernet Sauvignon για 7, 13 και 21 ημέρες έδειξε ότι τα ολικά φαινολικά, το γαλλικό οξύ και οι φλαβανόλες αυξήθηκαν όλα με μεγαλύτερο χρόνο παραμονής με τα στέμφυλα ενώ η αύξηση σε ολικά φαινολικά και φλαβανόλες ήταν μεγαλύτερη ανάμεσα στις 13 και 21 μέρες έναντι της διαφοράς μεταξύ 7 και 13 ημερών (Auw et al., 1996). Σε έρευνα της ποικιλίας Merlot η αύξηση ολικών φαινολικών συνεχίστηκε για 36 ημέρες ενώ οι χρωστικές ουσίες εμφάνισαν μέγιστο

την 4η μέρα και στη συνέχεια υπήρξε αργή σταδιακή μείωση τους (Yokotsuka et al., 2000).

7.2.2 Θερμοκρασία αλκοολικής ζύμωσης

Γενικά με αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνεται το ολικό φαινολικό περιεχόμενο που εκχυλίζεται στο κρασί. Κρασιά που παράχθηκαν από Cabernet Sauvignon και Pinot Noir είχαν μεγαλύτερη ένταση χρώματος με αύξηση της θερμοκρασίας ζύμωσης (Sacchi et al., 2005). Αν και το ανθοκυανικό περιεχόμενο δεν παρουσιάζει σημαντικές διαφορές, το ολικό φαινολικό περιεχόμενο αυξάνεται με αύξηση της θερμοκρασίας στο εύρος 15-30° C (Girard et al., 1997, 2001). Επιπλέον, διάφορες έρευνες έδειξαν ότι με αύξηση της θερμοκρασίας οινοποίησης, παρατηρείται αύξηση των τανινών και των πολυμερών χρωστικών μικρού και μεγάλου μοριακού βάρους, με παράλληλη μείωση των ελεύθερων ανθοκυανών (Bakker et all., 1998, Harbertson et al., 2002, Zimman et al., 2002). Τα δεδομένα δεν συμφωνούν πάντα μεταξύ τους, καθώς σπάνια οι υπόλοιπες παράμετροι που επηρεάζουν την εκχύλιση παραμένουν σταθερές, με αποτέλεσμα η σύγκριση αποτελεσμάτων διαφορετικών ερευνών να είναι τις περισσότερες φορές δύσκολη (Zimman et al., 2002).

Η αυξημένη εκχύλιση φαινολικών σε υψηλότερη θερμοκρασία οφείλεται στην αυξημένη διαπερατότητα των υποδερμικών κυττάρων, με αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη διάχυση ανθοκυανών, καθώς και στην αυξημένη διαλυτότητα των άλλων φαινολικών ομάδων στην υγρή φάση. Η αύξηση των πολυμερών χρωστικών φαίνεται να οφείλεται περισσότερο στην αυξημένη εκχύλιση τανινών παρά ανθοκυανών αφού οι ανθοκυάνες φτάνουν σε μια μέγιστη συγκέντρωση σχετικά νωρίς κατά την αλκοολική ζύμωση. Αν δεν υπάρχει επαρκής συγκέντρωση τανινών για να «παγιδεύσει» τις ελεύθερες ανθοκυάνες τότε η ποσότητα των πολυμερών χρωστικών στο κρασί θα είναι μειωμένη (Sacchi, 2005).

7.2.3 Επίδραση προζυμωτικής κρυοεκχύλισης

Η προζυμωτική κρυοεκχύλιση στην ερυθρή οινοποίηση χρησιμοποιείται για να διευκολύνει την εκχύλιση των πιο υδρόφιλων φαινολικών συστατικών, καθώς πραγματοποιείται στην υδατική φάση, για να βελτιώσει τον αρωματικό χαρακτήρα του παραγόμενου κρασιού και γιατί ευνοεί την εκχύλιση των προανθοκυανιδινών και

ταννινών του φλοιού έναντι των αντίστοιχων από τα γίγαρτα. Έρευνες για την επίδραση της κρυοεκχύλισης στη φαινολική σύσταση του κρασιού έχουν δώσει διάφορα αποτελέσματα που οφείλονται κατά κύριο λόγο στην ποικιλία του σταφυλιού, την διαφορετική διάρκεια και θερμοκρασία της κρυοεκχύλισης καθώς και στη μετέπειτα τεχνική οινοποίησης.

Κρυοεκχύλιση σταφυλιών από την ποικιλία Merlot στους 8° C για τέσσερις (4) μέρες έδωσαν κρασί με υψηλότερη συγκέντρωση σε ανθοκυάνες και πτητικά συστατικά σε σχέση με κρασιά που παράχθηκαν με την κλασσική μέθοδο οινοποίησης (De Santis and Frangipane, 2010). Η κρυοεκχύλιση στους 10° C για 10 ημέρες στις ποικιλίες Monastrell και Cabernet Sauvignon έδειξε αύξηση των προανθοκυανιδινών των γιγάρτων ενώ δεν είχε καμία επίδραση στην ποικιλία Syrah. Παρά την βελτίωση της εκχύλισης των ανθοκυανών, οι διαφορές δεν ήταν σημαντικές στο τέλος της οινοποίησης (Busse-Valverde et al., 2010). Η εκχύλιση ανθοκυανών σε κρασί από την ποικιλία Syrah βελτιώθηκε με την κρυοεκχύλιση όταν συνδυάστηκε με αλκοολική ζύμωση σε χαμηλές θερμοκρασίες (15° C με 20° C) σε σχέση με οινοποίηση σε υψηλές θερμοκρασίες (30° C), σύμφωνα με τα ερευνητικά αποτελέσματα των Reynolds et al., (2001). Αντίθετα, η κρυοεκχύλιση σε Pinotage στους 10° C δεν προκάλεσε διαφορές στη φαινολική του σύσταση, αλλά μείωσε τη συγκέτρωση σε οξικούς εστέρες και αιθυλεστέρες για 2 με 4 μέρες κρυοεκχύλισης στους 15° C (Marais, 2003).

Τέλος, έρευνα αποκλειστικά σε Cabernet Sauvignon, η κρυοεκχύλιση του οποίου μελετάται και στην παρούσα εργασία, έδειξε ότι η κρυοεκχύλιση 4 με 10 ημερών στους 10° C, βελτίωσε την εκχύλιση σε γαλλικό οξύ, σε μονομερείς και πολυμερείς φλαβανόλες (κατεχίνη, επικατεχίνη, τανίνες). Αντίθετα, τα υδροξυ-κιναμωμικά οξέα και οι φλαβονόλες δεν παρουσίασαν διαφορές με την κρυοεκχύλιση. Αν και βελτιώθηκε, επίσης, η εκχύλιση ανθοκυανών καθώς και η ένταση του χρώματος οι διαφορές αυτές δεν ήταν σημαντικές μετά την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης (Panprivech et al., 2015).

7.2.4 Λοιποί παράγοντες

Η παρουσία της αλκοόλης, όπως είναι λογικό διαδραματίζει κύριο ρόλο στην εκχύλιση των φαινολικών συστατικών. Μετά τις πρώτες 2-3 μέρες της αλκοολική

ζύμωσης παρουσιάζεται μια μείωση στο ρυθμό εκχύλισης των ανθοκυανών, οι οποίες είναι υδατοδιαλυτές και το μεγαλύτερο μέρος τους έχει ήδη εκχυλισθεί. Αντίθετα, η αύξηση της περιεκτικότητας της αιθανόλης κατά την εξέλιξη της αλκοολικής ζύμωσης συντελεί στην καλύτερη εκχύλιση των προκυανιδινών (Cheynier 2006).

Ο θειώδης ανυδρίτης εκτός των άλλων δράσεων του κατά την οινοποίηση, διευκολύνει και την εκχύλιση φαινολικών συστατικών από τα στερεά μέρη του σταφυλιού στο γλεύκος. Στην ερυθρή οινοποίηση η προσθήκη θειώδη ανιδρύτη πριν η κατά την εκχύλιση ευνοεί τη διάχυση των ανόργανων συστατικών και των φαινολικών συστατικών των φλοιών. Η δράση αυτή του θειώδη ανιδρύτη οφείλεται στην καταστροφή των κυτταρικών δομών των φλοιών του σταφυλιού (Κουράκου, 1998).

Οι τεχνικές οινοποίησης καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό την εκχύλιση των επιμέρους φαινολικών ομάδων κατά την ερυθρή οινοποίηση. Η θερμοοινοποίηση καταστρέφει τις κυτταρικές μεμβράνες, επιτρέποντας την καλύτερη διάχυση των ανθοκυανών αλλά λόγω της απουσίας αλκοόλης δε μεταβάλλει το περιεχόμενο σε τανίνες. Σε σύγκριση με την κλασσική μέθοδο ερυθρής οινοποίησης έδωσε καλύτερο αποτέλεσμα χρώματος αλλά χαμηλότερο φαινολικό φορτίο. Το πάγωμα της σταφυλομάζας πριν την εκχύλιση έχει το ίδιο αποτέλεσμα της διάρρηξης των κυταρρικών μεμβρανών, αυξάνει το περιεχόμενο σε τανίνες ενώ έχει και το επιπλέον πλεονέκτημα ότι προστατεύει από οξειδωτικά φαινόμενα πριν την αλκοολική ζύμωση. Η ανθρακική αναεροβίωση παρουσιάζει αντικορουόμενα αποτελέσματα που εξαρτώνται κυρίως από τη χρησιμοποιούμενη ποικιλία, κάτι που συμβαίνει και με τον τρόπο και χρόνο διαβροχής του γλεύκους. Η αφαίμαξη αποτελεί άλλη μία μέθοδο βελτίωσης της εκχύλισης των φαινολικών κατά την οινοποίηση, στην οποία μία ποσότητα γλεύκους απομακρύνεται ώστε να αυξηθεί ο λόγος της στερεής προς την υγρή φάση του γλεύκους.

Τα πηκτινολητικά ένζυμα μπορούν να αυξήσουν το χρώμα και το ολικό φαινολικό φορτίο στο τέλος της ζύμωσης. Στις περισσότερες περιπτώσεις οι πηκτινάσες δεν φαίνεται να αυξάνουν τις ανθοκυάνες σε αντίθεση με τις τανίνες και τα χρωστικά πολυμερή. Αυτό, μάλλον, οφείλεται στο ότι οι ελεύθερες ανθοκυάνες που διαχέονται στο γλεύκος δεσμεύονται άμεσα από άλλες ουσίες (άλλες ανθοκυάνες, φλαβανόλες

και πολυμερείς χρωστικές ουσίες). Πρέπει να εξασφαλίζεται η καθαρότητα των ενζύμων αυτών καθώς τυχόν παρουσία β-γλυκοζιδάσης μπορεί να προκαλέσει υδρόλυση ανθοκυανών με αποτέλεσμα να χάνεται χρωματική ένταση (Sacchi et al., 2005).

7.3 Αντιδράσεις φαινολικών συστατικών

Οι δράσεις στις οποίες συμμετέχουν τα φαινολικά συστατικά είναι τόσο ενζυμικές όσο και χημικής φύσεως. Οι ενζυμικές δράσεις περιορίζονται στα πρώιμα στάδια της οινοποίησης ενώ οι χημικές δράσεις επικρατούν καθώς τα ένζυμα απενεργοποιούνται και συνεχίζουν κατά την παλαίωση του κρασιού. Ανεξάρτητα από το είδος τους, οι δράσεις αυτές (βιοχημικές ή χημικές) εξαρτώνται από την δραστικότητα των φαινολικών συστατικών και πιο συγκεκριμένα του φαινολικού υδροξυλίου αλλά και την παρουσία ή μη άλλων υποκαταστατών.

Η δραστικότητα των πολυφαινολικών συστατικών, οφείλεται κυρίως στο φαινολικό υδροξύλιο αλλά και στα φαινομένα συντονισμού του ελεύθερου ζεύγους ηλεκτρονίων μεταξύ του φαινολικού οξυγόνου και του βενζολικού δακτυλίου, που προσδίδει μερικό αρνητικό φορτίο στον υποκαταστάτη που βρίσκεται κοντά στο υδροξύλιο, με αποτέλεσμα να αποκτά πυρηνόφιλο χαρακτήρα. Ο Α δακτύλιος που υπάρχει σε όλα τα φλαβονοειδή περιλαμβάνει δύο πυρηνόφιλες θέσεις στους άνθρακες -6’ και -8’.

Οι ανθοκυάνες εμφανίζονται με την έγχρωμη μορφή του φλαβυλίου υπό πολύ όξινες συνθήκες (pH<2) όπως αυτές που χρησιμοποιούνται στη χρωματογραφική ανάλυση. Σε ελαφρώς όξινο διαλύτη η μορφή του φλαβυλίου υποβάλλεται σε μεταφορά κατιόντος υδρογόνου και αντιδράσεις ενυδάτωσης με αποτέλεσμα να σχηματίζεται η ημικεταλική και η μορφή της κιννόνης, οι οποίες με τη σειρά τους μπορούν να δώσουν τη χαλκόνη. Έτσι στο pH του κρασιού ο 3-γλυκοζίτης της μαλβιδίνης εμφανίζεται κυρίως ως άχρωμη ακετάλη (75%), ενώ οι έγχρωμες μορφές του φλαβυλίου (κόκκινο), της χαλκόνης (κίτρινη), και της κιννόνης (μπλε) εμφανίζονται σε μικρότερη αναλογία.

Ο Α-δακτύλιος της φλουρογλουκινόλης της ημικεταλικής μορφής είναι πυρηνόφιλο ενώ ο C-δακτύλιος του φλαβυλίου δρα ως ηλεκτρονιόφιλο. Κλασσικά παραδείγματα πυρηνόφιλων αντιδράσεων προσθήκης στο φλαβύλιο είναι η προσθήκη νερού και

θειώδους ανιδρύτη που έχουν ως αποτέλεσμα των αποχρωματισμό των ανθοκυανών. Μια άλλη αντίδραση όπου συμμετέχει το φλαβύλιο περιλαμβάνει τη συντονισμένη προσθήκη ενώσεων που διαθέτουν έναν πολωμένο διπλό δεσμό στη θέση C4 και στο οξυγόνο του 5-υδροξυλίου των ανθοκυανών. Οι νέες έγχρωμες ενώσεις που δημιουργούνται, εμφανίζουν ένα δεύτερο δακτύλιο πυρανίου και ονομάζονται βιτισίνες αλλά είναι ευρέως γνωστές ως πυρανθοκυάνες.

Οι φλαβανόλες, επίσης, δρουν τόσο ως πυρηνόφιλα, διαμέσου του A-δακτύλιου τους, όσο και ως ηλεκτρονιόφιλα διαμέσου των καρβοκατιόντων που σχηματίζονται από την όξινα καταλυόμενη διάσπαση των μεταξύ τους δεσμών. Η τελευταία αυτή αντίδραση, που περιορίζεται στα ολιγομερή και τα πολυμερή των φλαβονολών, έχει διαπιστωθεί πως συμβαίνει αυθόρμητα στις τιμές pH των κρασιών.

Οι βασικές μορφές των φαινολών (φαινολικών ανιόντων) οξειδώνονται εύκολα προς ρίζες ημικιννόνης μέσω μεταφοράς ηλεκτρονίων. Οι ρίζες αυτές μπορούν στη συνέχεια να αντιδράσουν με μια νέα ρίζα σχηματίζοντας ένα προϊόν προσθήκης μέσω της σύζευξης ριζών ή στην περίπτωση των *O*-διφαινολών να υφίστανται ένα δεύτερο στάδιο οξείδωσης αποδίδοντας *O*-κιννόνες που είναι τόσο ηλεκτρονιόφιλα όσο και οξειδωτικά μέσα. Οι αντιδράσεις οξείδωσης στο κρασί είναι πολύ αργές λόγω της χαμηλής αναλογίας των φαινολικών ανιόντων στις τιμές pH του κρασιού, αλλά συμβαίνουν εξαιρετικά γρήγορα όταν υπάρχουν ενεργά οξειδωτικά ένζυμα (Brouillard, 1977, Cheynier 2006).

7.3.1 Ενζυμικές δράσεις

Τα κύρια ένζυμα που καταλύουν τις αντιδράσεις των φαινολικών συστατικών (φλαβονοειδών) είναι οξειδωτικά ένζυμα (όπως οι πολυφαινολοξιδάσες και οι περοξιδάσες) που προέρχονται από το σταφύλι αλλά και από μύκητες που το μολύνουν. Επίσης βρίσκονται στο κρασί διάφορα υδρολυτικά ένζυμα (γλυκοζιδάσες, εστεράσες) που αποβάλλονται από τις ζύμες και του μύκητες ή υπάρχουν σε παρασκευάσματα που προστίθενται στο κρασί για τεχνολογικούς σκοπούς (όπως οι πηκτινάσες).

7.3.1.1 Υδρολυτκά ένζυμα

Οι πηκτινάσες και οι β-γλυκανάσες είναι τα μόνα ένζυμα που επιτρέπονται στην οινοποίηση σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή νομοθεσία. Χρησιμοποιούνται κατά την διαύγαση και σταθεροποίηση του κρασιού αλλά και για να απελευθερώσουν σε αυτό αρωματικές ουσίες οι οποίες βρίσκονται στο σταφύλι ως μη πτητικές γλυκοζιδικές πρόδρομες ουσίες. Τα πηκτινολυτικά ένζυμα βελτιώνουν, ακόμα, την εκχύλιση των φαινολικών συστατικών και ενισχύουν το χρώμα του κρασιού.

Τέτοια, σχετικά ακατέργαστα εμπορικά σκευάσματα συχνά περιέχουν και άλλες ουσίες όπως κιναμο-εστεράσες, τανίνη-ακυλο-υδρολάση (ταννάση) και γλυκοζιδάσες. Η υδρόλυση των γλυκοζιτών των φλαβονολών που καταλύεται από την β-γλυκοζιδάση, έχει διαπιστωθεί ότι προκαλεί θολώματα λόγω της καθίζησης αδιάλυτων άγλυκων φλαβονολών. Η απόσπαση του γλυκοζίτη στις ανθοκυάνες έχει σαν αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό τους, λόγω της αστάθειας των προανθοκυανιδινών που προκύπτουν. Το φαινόμενο αυτό ενισχύεται περισσότερο από την παρουσία των κιναμοεστερασών που υδρολύουν τον δεσμό μεταξύ του π-κουμαρικού οξέος και της γλυκόζης στις π-κουμαριλιωμένες ανθοκυάνες. Παρόλα αυτά, οι β-γλυκοζιδάσες από το μύκητα *Aspergillus niger* παρουσιάζουν διαφορετικά μοτίβα συγγένειας υποστρώματος, έτσι ώστε οι δράσεις που αφορούν την υδρόλυση των πρόδρομων αρωματικών ενώσεων και των πολυσακχαριτών των φυτικών κυτταρικών τοιχωμάτων να διαχωρίζονται από ανεπιθύμητες διασπάσεις των ανθοκυανών.

Η δράση της ταννάσης έχει αναφερθεί σε διάφορους μύκητες, συμπεριλαμβανομένων και των *Aspergillus niger και Botrytis cinerea.* Καταλύει τη διάσπαση του εστερικού δεσμού σε εστεροποιημένες φλαβανόλες. Η δράση της στο κρασί είναι σχετικά αδύναμη λόγω της απενεργοποίησης της από το υψηλό φαινολικό του φορτίο. Επιπλέον, ορισμένες γαλλο-ομάδες στα προκυανιδικά πολυμερή είναι ανθεκτικές στην υδρόλυση από την ταννάση, λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης ή άλλων μοριακών αλληλεπιδράσεων (Fernandez-Zurbano et al., 1999, Okamura et al., 1982)

7.3.1.2 Ενζυμικές οξειδώσεις

Το κύριο ένζυμο που είναι υπεύθυνο για την οξείδωση των πολυφαινολών κατά την οινοποίηση είναι η πολυφαινολοξειδάση (PPO) η οποία έχει διπλή δράση: Αρχικά, υδροξυλιώνει τις μονοφαινόλες σε *O*-διφαινόλες, και στη συνέχεια οξειδώνει τις *O*-διφαινόλες σε *O*-κιννόνες χρησιμοποιώντας το μοριακό οξυγόνο σαν συν-υπόστρωμα.

Η λακκάση, που προέρχεται από μυκητιακή μόλυνση του σταφυλιού από το *B. cinerea*, επίσης καταλύει τη μετατροπή των *O*-διφαινολών σε *O*-κιννόνες ενώ παράλληλα μπορεί να χρησιμοποίησει ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων, που περιλαμβάνει, συγκεκριμένα, γλυκοζυλιωμένα φλαβονοειδή όπως ανθοκυάνες και π-διφαινόλες.

Η περοξειδάση (POD) καταλύει την οξείδωση ενός μεγάλου αριθμού *O*-διφαινολικών υποστρωμάτων προς *O*-κιννόνες, χρησιμοποιώντας το υπεροξείδιο του υδρογόνου σαν συν-υπόστρωμα. Η δράση αυτή, που συμβαίνει στο σταφύλι, δεν έχει διαπιστωθεί στο γλεύκος όπου η πολυφαινολοξειδάση είναι εξαιρετικά ενεργή ενώ και η διαθεσιμότητα του υπεροξειδίου του υδρογόνου είναι περιορισμένη. Η περοξιδάση μπορεί ακόμα να συμμετέχει στην αποδόμηση των ανθοκυανών που συμβαίνει κατά αποθήκευση των σταφυλιών μετά τον τρύγο. Η απενεργοποίηση της δράσης της καταλάσης, η οποία καταλύει τη μετατροπή του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό, σε συνδιασμό με την αποδόμηση των ανθοκυανών και την επαγωγή της δράσης της πολυφαινολοξειδάσης έχει παρατηρηθεί κατά την ανθρακική αναεροβίωση.

Τα φλαβονοειδή, συνήθως δεν εμπλέκονται άμεσα στην ενζυμική οξείδωση, δεδομένου ότι δεν αποτελούν ιδανικό υπόστρωμα για την πολυφαινολοξειδάση του σταφυλιού σε σχέση με τα καφεϊλιωμένα τρυγικά οξέα, τα οποία βρίσκονται σε αφθονία στο γλεύκος. Ορθο-διφαινολικές φλαβονοειδής αγλυκόνες, και συγκεκριμένα, μονομερή φλαβανολών μπορεί να οξειδωθούν από την πολυφαινολοξειδάση. Τα γλυκοζιλιωμένα φλαβονοειδή (γλυκοζίτες των ανθοκυανών και των φλαβονολών) και οι προανθοκυανιδίνες είναι φτωχά υποστρώματα για την πολυφαινολοξειδάση μπορούν όμως να οξειδωθούν από τη λακκάση και την περοξειδάση. Επιπλέον, μπορούν να συμμετέχουν σε αντιδράσεις οξείδωσης μέσω

συζευγμένης οξείδωσης και αντιδράσεων πυρηνόφιλης προσθήκης με ενζυμικά παραχθείσες κιννόνες. Συγκεκριμένα μελέτες της χημικής κινητικής των δράσεων αυτών έδειξαν ότι οι κιννόνες που προκύπτουν από την ενζυμική οξείδωση των καφεϊλιωμένων τρυγικών οξέων, είναι ισχυρά οξειδωτικά μέσα ικανά να οξειδώσουν τις περισσότερες φλαβονοειδής *O*-διφαινόλες, συμπεριλαμβανομένου των κατεχινών, των εστέρων της επιακτεχίνης, των προκυανιδινών και του 3-γλυκοζίτη της κυανιδίνης προς τις αντίστοιχες δευτερογενείς *O*-κιννόνες.

Τέλος, οι ηλεκτρονιόφιλες κιννόνες υφίστανται προσθήκη πυρηνόφιλων, που περιλαμβάνουν και τα φλαβονοειδή. Έτσι, η πυρηνόφιλη προσθήκη κατεχίνης στην ενζυμικά παραχθείσα κιννόνη, απέδωσε ένα διμερές κατεχίνης στο οποίο τα δύο μονομερή συνδέονται με έναν C6'-C8 διφαίνυλο δεσμό. Αυτή η Β τύπου διμερής κατεχίνη που προκύπτει με απομάκρυνση ενός μορίου νερού οξειδώνεται περαιτέρω προς κίτρινες χρωστικές. Όμοιες ουσίες προκύπτουν από τη σύζευξη ριζών ημικιννονών κατεχίνης, ειδικά σε διαλύματα χαμηλότερου pH (Gunata et al., 1987, Cheynier 2006).

7.3.2 Χημικές αντιδράσεις

Η ανάπτυξη πιο ευαίσθητων και επιλεκτικών αναλυτικών τεχνικών όπως η υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία (HPLC) σε σύζευξη με ανιχνευτή συστοιχίας διόδων (DAD) και φασματογραφία μάζας (MS) επέτρεψε τον χαρακτηρισμό των διάφορων συστατικών του κρασιού με αποτέλεσμα να προταθούν οι μηχανισμοί αντιδράσεων που τα παράγουν. Οι μηχανισμοί αυτοί, μπορούν να μελετηθούν σε πρότυπα διαλύματα στη συνέχεια και τα αποτελέσματα να συγκριθούν με τα αντίστοιχα στο κρασί. Αντιστρόφως, προϊόντα που εντοπίστηκαν σε διαλύματα παρόμοια με το κρασί χρησιμεύουν στην ανάπτυξη ειδικών αναλυτικών εργαλείων καθώς και προμηθεύουν με χρωματογραφικά και φασματομετρικά δεδομένα που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό νέων προϊόντων στο κρασί.

Οι χρωματικές και γευστικές μεταβολές που συμβαίνουν κατά την αποθήκευση-παλαίωση του κρασιού έχουν αποδοθεί στη μετατροπή των ανθοκυανών του σταφυλιού σε πολυμερείς χρωστικές ουσίες μέσα από αντιδράσεις προσθήκης με τις φλαβανόλες. Έχουν προταθεί τρεις μηχανισμοί για τη πραγματοποίηση των αντιδράσεων αυτών.

7.3.2.1 Προϊόντα άμεσης αντίδρασης προσθήκης ανθοκυανών-φλαβονολών

Ο πρώτος περιλαμβάνει την πυρηνόφιλη προσθήκη φλαβονολών στη θέση C4 του ανθοκυανικού ιόντος του φλαβυλίου, παράγοντας 4-φλαβανυλο-ανθοκυάνες, οι οποίες αναφέρονται και ως προϊόντα προσθήκης ***ανθοκυάνης-φλαβανόλης (A-F)*** ή ανθοκυάνης-ταννίνης (A-T). Οι ενώσεις αυτού του τύπου που παράγονται είναι άχρωμες (ημικετάλες). Η επακόλουθη οξείδωση αποκαθιστά την έγχρωμη μορφή του φλαβυλίου (κόκκινο χρώμα). Περαιτέρω δομική αναδιάταξη μπορεί να παράγει κιτρινο-πορτοκαλί μορφές ξανθυλίου (Jackson, 2008).

Ο δεύτερος μηχανισμός βασίζεται στην πυρηνόφιλη προσθήκη στο καρβοκατιόν που σχηματίζεται σε όξινα διαλύματα από τις φλαβαν-3,4-διόλες ή από τη διάσπαση των προκυανιδινών. Στις τιμές pH κρασιού συμβαίνει, ακόμα, όξινα καταλυόμενη αποσύνθεση των προκυανιδινών. Η παρουσία μεγάλης ποσότητας μονομερών φλαβονολών, προκαλεί μείωση των απωλειών σε προανθοκυανιδίνες και τα ολιγομερή αντικαθιστούν σταδιακά τα υψηλότερου μοριακού βάρους πολυμερή. Η προσθήκη ανθοκυανών, είτε με τη μορφή φλαβενίου ή στην ημικεταλική τους μορφή στο καρβοκατιόν αποδίδει τελικά και στις δύο περιπτώσεις το αντίστοιχο φλαβύλιο είτε μέσω οξείδωσης είτε μέσω αντιδράσεων αφυδάτωσης. Τα προϊόντα προσθήκης που προκύπτουν είναι ενώσεις τύπου ***φλαβανόλης-ανθοκυάνης (F-A)*** και αφού πραγματοποιηθεί η αφυδάτωση έχουν σταθερό χρώμα, ενώ η αντίδραση είναι ανεξάρτητη από τις συνθήκες οξείδωσης (Jurd 1967, Cheynier 2006).

7.3.2.2 Προϊόντα παρουσία ακεταλδεύδης

Οι αντιδράσεις μεταξύ των ανθοκυανών και των φλαβανολών γίνονται με πολύ πιο γρήγορο ρυθμό υπό τη παρουσία της ακεταλδεΰδης, που είναι παρούσα στο κρασί ως αποτέλεσμα του μεταβολισμού των ζυμών αλλά μπορεί και να παραχθεί μέσω οξείδωσης της αιθανόλης (ειδικά υπό την παρουσία φαινολικών συστατικών). Ο τρίτος μηχανισμός, που έχει προταθεί για τις αντιδράσεις ανθοκυανών με φλαβανόλες, περιλαμβάνει την πυρηνόφιλη προσθήκη των φλαβανολών στην πρωτονιωμένη ακεταλδεΰδη, που ακολουθείται από επιπλέον πρωτονίωση και

αφυδάτωση του καρβοκατιόντος που παράγεται με προσθήκη ενός δεύτερου φλαβονοειδούς σε αυτό. Τα προϊόντα προσθήκης που προκύπτουν είναι τύπου φλαβανόλης-ανθοκυάνης (F-A) στα οποία τα μονομερή των φλαβονοειδών συνδέονται στις θέσεις C6 ή C8. Η αντίδραση αυτή γίνεται πιο γρήγορα από τον σχηματισμό των έγχρωμων συμπλόκων, αλλά απαιτεί την αυτοοξείδωση των φαινολικών του κρασιού, παρουσία οξυγόνου. Για αυτό το λόγο το χρώμα του κόκκινου κρασιού ενισχύεται και σταθεροποιείται όταν το κρασί εκτίθενται σε μικρά ποσά οξυγόνου (μικρο-οξυγόνωση).

Αντί για την ακεταλδεΰδη, στις αντιδράσεις πολυμερισμού των φλαβανολών με τις ανθοκυάνες μπορούν να συμμετέχουν άλλες αλδεΰδές καθώς και το γλυοξυλικό οξύ, που αποτελεί παράγωγο οξείδωσης του τρυγικού οξέος. Αυτές οι αντιδράσεις πολυμερισμού καταλύονται από ιόντα μετάλλων, και τα παραγόμενα προϊόντα είναι κίτρινες έγχρωμες ενώσεις που έχουν τη δομή του ξανθυλίου (Rivas-Gonzalo et al., 1995, Cheynier, 2006).

7.3.2.3 Αντιδράσεις παραγωγής πυρανθοκυανών

Οι ανθοκυάνες του κρασιού αντιδρούν με την ακεταλδεΰδη προς παραγωγή των αντίστοιχων πυρανθοκυανών. Φλαβανο-πυρανθοκυάνες παράγονται από την αντίδραση των γλυκοζιτών της μαλβιδίνης (και στην ακετυλιωμένη και κουμαριλιωμένη μορφή τους) με μονομερή φλαβανολών (κατεχίνη, επικατεχίνη) και ακεταλδεΰδη. Στις αντιδράσεις αυτές μπορεί να συμμετέχουν μέχρι και τετραμερή φλαβανολών (ενώσεις πυρανθοκυάνης-προκυανιδίνης). Οι φλαβανο-πυρανθοκυάνες μπορούν να προκύψουν είτε μέσω πυρηνόφιλης προσθήκης της φλαβανόλης στην πυρανθοκυάνη, είτε με αντίδραση προσθήκης του διπλού δεσμού μια βινυλο-φλαβανόλης στην ανθοκυάνη. Φαινυλο-πυρανθοκυάνες μπορούν να προκύψουν, ακόμα, από την αντίδραση ανθοκυανών με υδροξυ-κιναμωμικά οξέα ή με παραγωγά τους μέσω δύο διαφορετικών μηχανισμών αντίδρασης. Τέλος, οι καρβοξυ-πυρανθοκυάνες παράγονται μέσω αντιδράσεων προσθήκης του διπλού δεσμού του πυροσταφιλικού οξέος στο κατιόν φλαβυλίου, που ακολουθούνται από αφυδάτωση και επανακυκλοποίηση. Οι πυρανθοκυάνες είναι σταθερές έγχρωμες ενώσεις, οι περισσότερες από τις οποίες απορροφούν στο φάσμα του κίτρινου-πορτοκαλί χρώματος (Cheynier, 2006).

8 Υλικά και μέθοδοι

8.1 Διαδικασίες οινοποιήσεων και σχεδιασμός πειραμάτων

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν 5 διαφορετικά κρασιά από τέσσερις (4) διαφορετικές ποικιλίες, εκ των οποίων οι τρεις (3) ήταν οι ερυθρές ποικιλίες Αγιωργίτικο (2 κρασιά με διαφορετικές τεχνικές οινοποίησης), Cabernet Sauvignon και Merlot ενώ η 4^{η} ποικιλία ήταν η λευκή ποικιλία Ασύρτικο. Τρία ερυθρά κρασιά των ποικιλιών Αγιωργίτικο, Cabernet Sauvignon και Merlot προμηθεύτηκαν πριν την εμφιάλωση τους από την εταιρία Τσέλεπος Οινοποιητική Α.Ε., με έδρα στην Τεγέα Αρκαδίας (περιοχή Μαντινείας), και προορίζονταν για εμπορική χρήση ενώ δύο κρασιά από τις ποικιλίες Αγιωργίτικο και Ασύρτικο προμηθεύτηκαν από το τμήμα Οινολογίας και Τεχνολογίας Ποτών του Α.Τ.Ε.Ι. Αθηνών. Οι δειγματοληψίες κατά την εκχύλιση του Cabernet πραγματοποιήθηκαν σε τακτά χρονικά διαστήματα μετά την ανάδευση του σταφυλοπολτού και ήταν διπλές.

8.1.1 Οινοποίηση λευκού κρασιού από την ποικιλία Ασύρτικο

Πραγματοποιήθηκε αποβοστρύχωση και στη συνέχεια έκθλιψη των ραγών του σταφυλιού σε σύστημα αποβοστρυχωτή-εκθλιπτήρα. Η περιεκτικότητα του διαχωρισμένου γλεύκους σε σάκχαρα κατά την είσοδό του στον οινοποιητή μετρήθηκε 12.96 βαθμοί Baumè. Στη συνέχεια έγινε ο εμβολιασμός με ζύμες *VLC* 3 25 g/ hL, ενώ προστέθηκε και φωσφορικό διαμμώνιο (DAP) 10g/ hL. Δεν έγινε προζυμωτική κρυοεκχύλιση και η αλκοολική ζύμωση διήρκησε 8 ημέρες στο θερμοκρασιακό εύρος 16-19° C. Έγινε κολλάρισμα με χρήση PVPP και προσθήκη μπετονίτη 30 g/hL.

8.1.2 Κλασσική ερυθρή οινοποίηση κρασιού από την ποικιλία Αγιωργίτικο

Πραγματοποιήθηκε αποβοστρύχωση και στη συνέχεια έκθλιψη των ραγών του σταφυλιού σε σύστημα αποβοστρυχωτή-εκθλιπτήρα. Ο σταφυλοπολτός εισήλθε στον οινοποιητή όπου έγινε προσθήκη θειώδη ανυδρίτη (SO_2) 6 g/hL . Η περιεκτικότητα του γλεύκους σε σάκχαρα μετρήθηκε 12.4 βαθμοί Baumè. Ακολούθησε ο εμβολιασμός με 25 g/hL με την εμπορική ζύμη *Lalvin Rhône2323* της εταιρίας Laffort και η προσθήκη αμμωνιακών αλάτων *Vitâmine 2* 10 g/L. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν πηκτινολητικά

ένζυμα Ex-V [Montreal, Canada] 12 g/tn σταφυλιού και προστέθηκε τρυγικό οξύ 50 g/hL. Ακολούθησε περιστροφή και διαβροχή ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Η εκχύλιση διήρκησε 6 ημέρες, στις αυτογενείς θερμοκρασίες, και ύστερα απομακρύνθηκαν τα στέμφυλα από το γλεύκος. Με το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης, έγινε προσθήκη μηλογαλακτικών βακτηρίων 40 mL/hL, ώστε να πραγματοποιηθεί η μηλογαλακτική ζύμωση.

8.1.3 Οινοποίηση ερυθρού κρασιού από την ποικιλία Αγιωργίτικο με προζυμωτική κρυοεκχύλιση

Αφού ολοκληρώθηκε ο εκραγισμός το γλεύκος διοχετεύτηκε στον οινοποιητή σε επαφή με τα στέμφυλα, όπου πραγματοποιήθηκε αρχικά ελαφριά θείωση. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε κρυοεκχύλιση στους 10° C για 48 ώρες. Με την ολοκλήρωση της κρυοεκχύλισης η θερμοκρασία σταδιακά αυξήθηκε ώστε να ξεκινήσει η αλκοολική ζύμωση, ενώ παράλληλα έγινε ο εμβολιασμός των ζυμών. Η εκχύλιση διήρκησε 12 ημέρες. Τη $12^η$ μέρα η θερμοκρασία στον οινοποιητή έφτασε τους 28° C ενώ της τελευταίες δύο ημέρες η θερμοκρασία αυξήθηκε εκ νέου στους 30° C. Η ανακύκλωση του γλεύκους κατά την εκχύλιση γινόταν κατά μέσο όρο δύο φορές την ημέρα. Αφού ολοκληρώθηκε η αλκοολική ζύμωση, προστέθηκαν βακτήρια για την πραγματοποίηση περιορισμένης μηλογαλακτικής ζύμωσης ενώ κατά την οινοποίηση έγινε και προσθήκη πηκτινολυτικών ενζύμων. Πραγματοποιήθηκε διαύγαση με τη χρήση αλβουμίνης ενώ δεν πραγματοποιήθηκε σταθεροποίηση. Το κρασί αφέθηκε να ηρεμίσει και μετά από κάποιες μέρες μεταφέρθηκε σε νέα ανοξείδωτη δεξαμενή αποθήκευσης. Μετά την ολοκλήρωση της ζύμωσης το pH του κρασιού μετρήθηκε 3.23, η ολική οξύτητα 5.56 g/L σε ισοδύναμα τρυγικού οξέος και ο αλκοολικός βαθμός 14.0 % v/v.

8.1.4 Οινοποίηση ερυθρού κρασιού από την ποικιλία Cabernet Sauvignon με προζυμωτική κρυοεκχύλιση

Με την ολοκλήρωση του εκραγισμού το γλεύκος διοχετεύτηκε στον οινοποιητή όπου έγινε προσθήκη θειώδη ανυδρίτη (SO_2). Το κρασί προοριζόταν για μακρά παλαίωση σε δρύινο βαρέλι γι' αυτό πραγματοποιήθηκε κρυοεκχύλιση πέντε (5) ημερών σε θερμοκρασία 10° C τις πρώτες τρεις (3) μέρες με σταδιακή αύξηση μέχρι τους 15° C από την $3^η$ ως την $5^η$ μέρα της κρυοεκχύλισης. Με την ολοκλήρωση της

προζυμωτικής διαδικασίας αυξήθηκε η θερμοκρασία στους 20° C, ώστε να ξεκινήσει η αλκοολική ζύμωση και προστέθηκαν οι εμπορικές ζύμες και τα πηκτινολητικά ένζυμα. Πραγματοποιήθηκε μακρά εκχύλιση 15 ημερών (ξεκινώντας τη μέτρηση μετά το τέλος της κρυοεκχύλισης). Η θερμοκρασία αυξανόταν σταδιακά και στην ολοκλήρωση της οινοποίησης έφτασε στους 30° C. Η ανακύκλωση του γλεύκους κατά την εκχύλιση γινόταν κατά μέσο όρο δύο φορές την ημέρα. Ακολούθησε προσθήκη μηλογαλακτικών βακτηρίων για την πραγματοποίηση της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Πραγματοποιήθηκε διαύγαση με τη χρήση αλβουμίνης ενώ δεν πραγματοποιήθηκε σταθεροποίηση. Το κρασί αφέθηκε να ηρεμίσει για να κατακρημνιστούν τα σύμπλοκα των πρωτεϊνών και ακολούθησε μεταφορά του κρασιού σε νέα ανοξείδωτη δεξαμενή αποθήκευσης. Μετά την ολοκλήρωση της ζύμωσης το pH του κρασιού μετρήθηκε 3.27, η ολική οξύτητα 5.61 g/L σε ισοδύναμα τρυγικού οξέος και ο αλκοολικός βαθμός 13.6 % v/v.

8.1.5 Οινοποίηση ερυθρού κρασιού από την ποικιλία Merlot με προζυμωτική κρυοεκχύλιση

Η διαδικασία οινοποίησης του Merlot ήταν παρόμοια με την αντίστοιχη του Cabernet καθώς και το κρασί αυτό προοριζόταν για μακρά παλαίωση σε δρύινα βαρέλια και συχνά αναμιγνύεται με το Cabernet για τη δημιουργία χαρμανιού. Η κρυοεκχύλιση διήρκησε τέσσερις (4) μέρες και στη συνέχεια μακρά εκχύλιση 12 ημερών. Στο πέρας της οινοποίησης το pH μετρήθηκε 3.26, η ολική οξύτητα 5.58 g/L σε ισοδύναμα τρυγικού οξέος και ο αλκοολικός βαθμός 13.2 % v/v.

8.1.6 Διαδικασία συσκευασίας και αποθήκευσης δειγμάτων

Τα τρία ερυθρά κρασιά προμηθεύτηκαν συσκευασμένα σε «ασκό» 20 L υπό κενό. Τα δύο κρασιά από τα Τ.Ε.Ι. σε πλαστικό σφραγισμένο περιέκτη 2 L ο οποίος αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία 8° C μέχρι τη συσκευασία των δειγμάτων. Πριν τη συσκευασία πραγματοποιήθηκε μέτρηση του pH όλων των φρέσκων κρασιών καθώς και αρχική ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των φαινολικών συστατικών (χρόνος 0) με τη χρήση των αναλυτικών μεθόδων που αναπτύσσονται παρακάτω.

Η συσκευασία των δειγμάτων προς αποθήκευση έγινε με χρήση της συσκευής MAP, σε συσκευασίες πολυστρωματικού υλικού (OPP 20 μm/ink/adhesive/PET MET 12

μm/adhesive//PE 75 μm STC) σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες αζώτου (N_2), διοξειδίου του άνθρακα (CO_2) και μίγματος αεριών σε CO_2-N_2 σε αναλογία 1:1. Μετά τη συσκευασία πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία στον υπερκείμενο χώρο των συσκευασιών με αναλυτή αερίων για να επιβεβαιωθεί η σύσταση τους. Η ποσότητα δείγματος κρασιού σε κάθε συσκευασία ήταν 25 mL. Μια σειρά δειγμάτων συσκευάστηκε σε ατμόσφαιρα λεπτού στρώματος ατμοσφαιρικού αέρα με απλή θερμοκόλληση της συσκευασίας. Στη συνέχεια όλα τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου, απουσία ηλιακής ακτινοβολίας. Δειγματοληψίες λαμβάνονταν κάθε μήνα, για τους 4 πρώτους μήνες αποθήκευσης και στη συνέχεια κάθε δύο μήνες μέχρι αποθήκευσης ενός περίπου χρόνου (349 ημέρες).

8.2 Συσκευές

- Υγρός χρωματογράφος υψηλής απόδοσης HPLC (HP 1100, Agilent Technologies, Santa Clara, California) με αντλία βαθμωτής έκλουσης σε σύνδεση με συστοιχία φωτοδιόδων (Diode Array Detector, DAD) (Hewlett Packard, Waldbronn, Germany), συνδεδεμένα με στήλη Hypersil C18 (ODS 5 μm, 250x4.6 mm, MZ Analysentechnik, Mainz, Germany). Τα χρωματογραφικά δεδομένα επεξεργάστηκαν με το λογισμικό ChemStation for LC 3D software (Agilent Technologies, 1999-2000, Waldbrook, Germany)

- LC-MS: Varian 500 MS Ion Trap Spectometer

- Φασματοφωτόμετρο: HITACHI U29000

- Συσκευασία σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (MAP): Boss M. Type NT42N

8.3 Αναλυτικές μέθοδοι

8.3.1 Ταυτοποίηση φαινολικών ενώσεων μέσω LC-MS

Η ταυτοποίηση των ανθοκυανών έγινε ρυθμίζοντας τις ακόλουθες παραμέτρους στο φασματόμετρο μάζας: θετικός ιονισμός, φέρον αέριο άζωτο, θερμοκρασία 350 °C,

διαφορά δυναμικού 2.5 kV, εύρος σάρωσης 100-1200 m/z. Για την ταυτοποίηση των φλαβονολών και τα φαινολικών οξέων, χρησιμοποιήθηκε αρνητικός ιονισμός.

8.3.2 Ποσοτικός προσδιορισμός φαινολικών συστατικών μέσω HPLC-DAD

Ο χαρακτηρισμός του φαινολικού προφίλ των φρέσκων κόκκινων κρασιών έγινε με την μέθοδο υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης HPLC (HP 1100, Agilent Technologies, Santa Clara, California) σε σύνδεση με συστοιχία φωτοδιόδων (DAD) και φασματόμετρο μάζας (ESI-MS/MS). Η στήλη χρωματογραφίας που επιλέχθηκε ήταν η Hypersil C18 (ODS 5 μm, 250x4.6 mm, MZ Analysentechnik, Mainz, Germany). Τα δείγματα κρασιού εκχύονταν έπειτα από φιλτράρισμα με φίλτρο χρωματογραφίας (0.2 μm, PVDF syringe filters, Teknokroma, Barcelona, Spain). Το σύστημα των διαλυτών έκλουσης ήταν νερό / ακετονιτρίλιο / φορμικό οξύ (87/3/10 (v/v/v) διαλύτης A, 40/50/10 (v/v/v) διαλύτης B) και η ροή ρυθμίστηκε σε 0.4 mL/min. Το προφίλ της βαθμωτής έκλουσης του διαλύτη B είχε ως εξής: 6% στα 0 min, 30% στα 21.5 min, 50% στα 42 min, 60% στα 50 min. Όσον αφορά την ποσοτικοποίηση στον ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων έγινε για τις ανθοκυάνες στα 520 nm σε ισοδύναμα 3-γλυκοζίτη της μαλβιδίνης, για τις φλαβονόλες στα 360 nm σε ισοδύμανα κερκετίνης και για τα κινναμωμικά οξέα σε 320 nm σε ισοδύναμα καφεϊκού οξέος.

8.3.3 Ποσοτικός προσδιορισμός ολικών φαινολικών συστατικών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην οξείδωση των φαινολών σε αλκαλικό περιβάλλον, με μίγμα φωσφοροβολφραμικού και φωσφορομολυβδαινικού οξέος (αντιδραστήριο Folin – Ciocalteu). Η οξείδωση προκαλεί μία αλλαγή χρώματος από κίτρινο σε μπλε, που μπορεί να ανιχνευθεί εύκολα από ένα φασματοφωτόμετρο. Την ίδια αντίδραση δίνουν και άλλα συστατικά, όπως τα ανάγοντα σάκχαρα και τα νουκλεϊνικά οξέα. Κατά την εφαρμογή της σε ξηρά κρασιά δεν δημιουργείται πρόβλημα, αφού η περιεκτικότητα σε ανάγοντα σάκχαρα είναι της τάξης των 20 mg/L, οπότε η συνεισφορά τους στην τιμή της μέτρησης μπορεί να θεωρηθεί αμελητέα (Waterhouse 2005).

Σύμφωνα με τη μέθοδο, 100 μL κατάλληλα αραιωμένου δείγματος κρασιού/γλεύκους προστίθενται σε 7.9 mL απιονισμένου νερού. Ακολουθεί η προσθήκη 500 μL του αντιδραστηρίου Folin – Ciocalteu και το δείγμα αναδεύεται ελαφρά. Αφήνεται σε ηρεμία για 30 s έως 8 min, και ύστερα προστίθενται 1.5 mL διαλύματος άνυδρου Na2CO3 20%. Μετά την έντονη ανάδευση του τελικού δείγματος, αφήνεται σε ηρεμία για 30 min σε υδατόλουτρο στους 40 °C. Παρασκευάζεται, επίσης, το τυφλό δείγμα με προσθήκη 100 μL απιονισμένου νερού, αντί κρασιού. Ακολουθεί η φωτομέτρηση του δείγματος σε φασματοφωτόμετρο μονής δέσμης στα 765 nm, σε κυψελίδες πάχους 10 mm. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ισοδύναμα mg/L γαλλικού οξέος (GAE), που προκύπτουν από την καμπύλη αναφοράς, η χάραξη της οποίας έγινε με διαλύματα γαλλικού οξέος γνωστών συγκεντρώσεων (50 - 100 - 150 - 250 – 500 mg/L GAE).

Η καμπύλη αναφοράς του γαλλικού οξέος έχει εξίσωση ***ABS = 0.0012*C - 0.0044*** και R2 = 0.9982, όπου C η συγκέντρωση του διαλύματος σε ισοδύναμα mg/L γαλλικού οξέος και ABS η αντίστοιχη απορρόφηση. Η καμπύλη αναφοράς έχει ακρίβεια για απορροφήσεις από 0.050 έως 0.600.

8.3.4 Ποσοτικός προσδιορισμός ολικών και επιμέρους ομάδων φαινολικών συστατικών με φασματοφωτομετρική μέθοδο

Οι ολικές ανθοκυάνες, οι φλαβονόλες και οι τρυγικοί εστέρες προσδιορίσθηκαν με φασματομετρία UV-VIS, έπειτα από ρύθμιση του pH, στα αντίστοιχα μέγιστα απορρόφησης των χαρακτηριστικών ομάδων (Cliff, 2007).

Σύμφωνα με τη μέθοδο, προστίθενται 250 μL κατάλληλα αραιωμένου κρασιού/γλεύκους σε 250 μL διαλύματος 0.1% HCl σε 95% EtOH. Ακολουθεί προσθήκη 4.55 mL διαλύματος HCl 2%. Παρασκευάζεται, επίσης, το τυφλό δείγμα με 250 μL αιθανολικού διαλύματος 12.5% αντί κρασιού. Το δείγμα αφήνεται για 15 min, ώστε να έρθει το pH σε ισορροπία, και φωτομετρείται στα μέγιστα απορρόφησης της κάθε χαρακτηριστικής ομάδας. Οι ανθοκυάνες έχουν μέγιστο απορρόφησης τα 520 nm και εκφράζονται ως ισοδύναμα mg/L μονογλυκοζίτη-3-μαλβιδίνης (mv-3-glc), που προκύπτουν από την καμπύλη αναφοράς, η χάραξη της οποίας γίνεται με διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων (25 - 50 - 100 - 150 - 200 mg/L Mv-3-glc). Οι φλαβονόλες έχουν μέγιστο απορρόφησης τα 360 nm και

εκφράζονται ως ισοδύναμα mg/L κερκετίνης (quercetin), με καμπύλη αναφοράς διαλυμάτων γνωστών συγκεντρώσεων (50 - 100 - 150 - 200 - 250 mg/L quercetin). Οι τρυγικοί εστέρες έχουν μέγιστο απορρόφησης τα 320 nm και εκφράζονται ως ισοδύναμα mg/L καφεϊκού οξέος (caffeic acid), με καμπύλη αναφοράς διαλυμάτων γνωστών συγκεντρώσεων (10 - 20 - 40 - 60 - 80 - 100 mg/L caffeic acid).

Η καμπύλη αναφοράς του μονογλυκοζίτη-3-μαλβιδίνη έχει εξίσωση ***ABS = 0.0013*C - 0.0078*** και R^2 = 0.9998 και ακρίβεια για απορροφήσεις από 0.025 έως 0.270. Η καμπύλη αναφοράς της κερκετίνης έχει εξίσωση ***ABS = 0.003*C + 0.0147*** και R^2 = 0.9985 και ακρίβεια για απορροφήσεις από 0.150 έως 0.750. Η καμπύλη αναφοράς του καφεϊκού οξέος έχει εξίσωση **ABS = 0.0047*C - 0.0003** και R^2 = 0.9999 και ακρίβεια για απορροφήσεις από 0.050 έως 0.500.

8.3.5 Ποσοτικός προσδιορισμός φλαβαν-3-ολών με τη μέθοδο DMACA

Οι ολικές φλαβαν-3-όλες προσδιορίσθηκαν με τη μέθοδο της p-dimethylaminocinnamaldehyde (DMACA). Η συγκεκριμένη μέθοδος, έχει ένα σημαντικό πλεονέκτημα σε σχέση με την κλασσική μέθοδο της βανιλλίνης, αφού δεν έχει παρεμβολές από τις ανθοκυάνες. Επιπλέον, παρέχει υψηλή ευαισθησία και εκλεκτικότητα. Η αντίδραση γίνεται στον Α δακτύλιο των κατεχινών (Arnous 2002).

Σύμφωνα με τη μέθοδο, σε 600 μL κατάλληλα αραιωμένου κρασιού/γλεύκους προστίθενται 3 mL διαλύματος 0.1% DMACA σε 1 N HCl σε μεθανόλη. Το δείγμα ανακινείται και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση, για 10 min. Ως τυφλό δείγμα λαμβάνεται αιθανολικό διάλυμα 12.5%. Ακολουθεί φωτομέτρηση στα 640 nm. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ισοδύναμα mg/L κατεχίνης (catechin), που προκύπτουν από την καμπύλη αναφοράς, η χάραξη της οποίας γίνεται με διαλύματα κατεχίνης γνωστών συγκεντρώσεων (1 - 2 - 4 - 6 - 10 - 12 - 16 mg/L catechin). Η καμπύλη αναφοράς της κατεχίνης έχει εξίσωση ***ABS = 0.0434*C + 0.0368*** και R^2 = 0.993 και ακρίβεια για απορροφήσεις από 0.050 έως 0.700.

8.3.6 Προσδιορισμός χρωματικών παραμέτρων κρασιού με φασματοφωτομετρική μέθοδο

Η εκτίμηση του χρώματος σε λευκό κρασί γίνεται αποκλειστικά με προσδιορισμό της απορρόφησης του κρασιού στα 420 nm.

Για το ερυθρό κρασί, σύμφωνα με τη μέθοδο μετριέται η απορρόφηση του κρασιού στα 420, 520 και 620 nm. Επειδή δεν υπάρχει κάποια συγκεκριμένη αναλογία μεταξύ του χρώματος των κρασιών και της αραίωσης, τα κρασιά δεν αραιώνονται, αλλά η φωτομέτρηση γίνεται σε κυψελίδα του 1mm. Ως τυφλό χρησιμοποιείται αιθανολικό διάλυμα 12.5% (Glories 1984, Ribèreau - Gayon et al. 2006). Στη συνέχεια από τις μετρούμενες απορροφήσεις υπολογίζονται οι παρακάτω παράμετροι:

- Χρωματική ένταση (CI), η οποία αντιπροσωπεύει το ποσό του χρώματος και ισούται με το άθροισμα των τριών απορροφήσεων:

$$\boldsymbol{CI = OD\ 420 + OD\ 520 + OD\ 620}$$

- Απόχρωση (HUE), η οποία δείχνει την τάση του χρώματος προς το πορτοκαλί και δίνεται από το λόγο των απορροφήσεων στα 420 προς 520 nm:

$$\boldsymbol{HUE = \frac{OD\ 420}{OD\ 520}}$$

- Λαμπρότητα (dA%), που σχετίζεται με το σχήμα του φάσματος. Όταν το κρασί είναι φωτεινό κόκκινο, το μέγιστο στα 520nm είναι στενό και καθαρά ορισμένο. Όσο υψηλότερη είναι αυτή η τιμή, τόσο κυριαρχεί περισσότερο το κόκκινο χρώμα. Η τιμή της παραμέτρου αυτής δίνεται από τον τύπο:

$$\boldsymbol{dA\%} = \left(\boldsymbol{1 - \frac{OD\ 420 + OD\ 520}{2 * OD\ 520}}\right) * \boldsymbol{100}$$

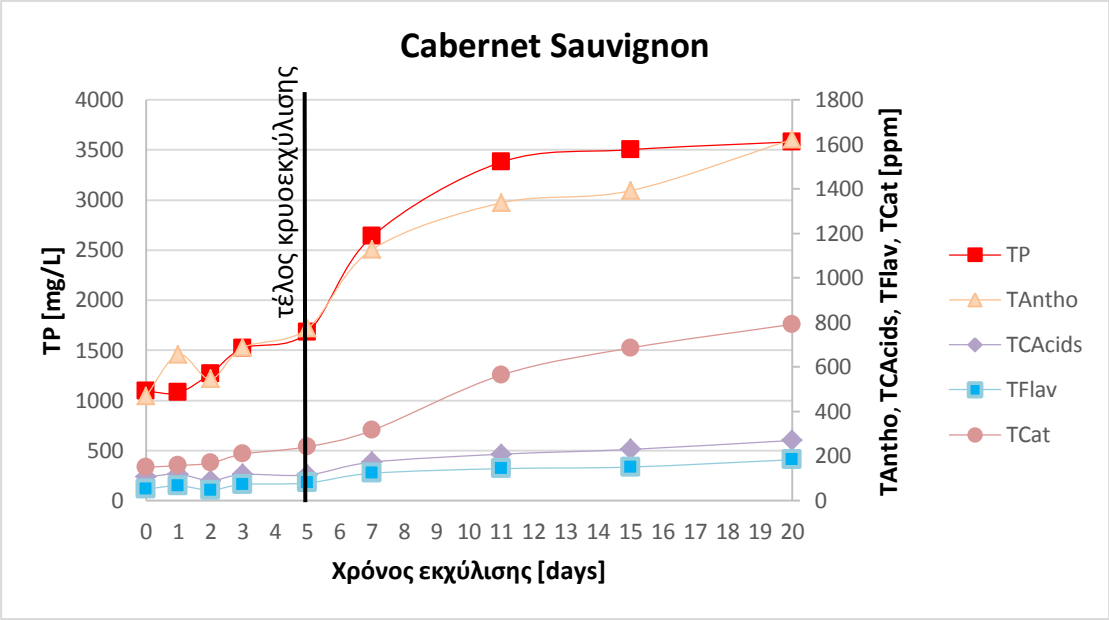
9 Αποτελέσματα-συζήτηση

9.1 Μελέτη εξέλιξης φαινολικών συστατικών κατά την οινοποίηση

Αρχικά μελετήθηκε η εκχύλιση των ολικών φαινολικών και των επιμέρους ομάδων τους (ανθοκυάνες, φαινολικά οξέα, φλαβαν-3-όλες, φλαβονόλες) κατά την οινοποίηση ερυθρού κρασιού από την ποικιλία Cabernet Sauvignon. Η δειγματοληψία έγινε στην οινοβιομηχανία σε τακτά χρονικά διαστήματα από δύο διαφορετικούς οινοποιητές βιομηχανικής κλίμακας, σε κρασί που προοριζόταν για εμπορική εκμετάλλευση αφού παλαιωθεί σε βαρέλι και εμφιαλωθεί.

9.1.1 Εκχύλιση φαινολικών συστατικών κατά την ερυθρή οινοποίηση Cabernet Sauvignon με προζυμωτική κρυοεκχύλιση

Στο Διάγραμμα 9.1 παρουσιάζεται η εκχύλιση των επιμέρους κύριων ομαδών των φαινολικών συστατικών καθώς και το ολικό φαινολικό φορτίο κατά την οινοποίηση της ποικιλίας Cabernet Sauvignon. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η εξέλιξη της εκχύλισης των υδροξυ-κιναμωμικών οξέων και των τρυγικών εστέρων τους, των φλαβαν-3-ολών, των φλαβονολών και των μονομερών ανθοκυανών. Στον οινοποιητή υπήρχε ελεγχόμενη μεταβλητή θερμοκρασία. Η προζυμωτική κρυοεκχύλιση ολοκληρώθηκε την $5^{η}$ μέρα με σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας στους 20° C στη συνέχεια, ενώ το γλεύκος ήταν σε επαφή με τα στέμφυλα μέχρι και την $20^{η}$ μέρα της οινοποίησης. Το ολικό φαινολικό φορτίο προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, οι φλαβ-3-όλες με τη μέθοδο DMACA, ενώ οι ανθοκυάνες, οι φλαβονόλες και τα φαινολικά οξέα (τρυγικοί εστέρες) με τη φωτομετρική μέθοδο (μέσω φασματογραφίας UV-VIS).



Διάγραμμα 9.1 Εκχύλιση ολικών φαινολικών και επιμέρους κύριων ομάδων κατά την ερυθρή οινοποίηση σταφυλιών Cabernet Sauvignon με προζυμωτική κρυοεκχύλιση. (TP: ολικό φαινολικό φορτίο (ισοδύναμα γαλλικού οξέος), TAntho: ανθοκυάνες (ισοδύναμα γλυκοζίτη-3 μαλβιδίνης), TCat: φλαβαν-3-όλες (ισοδύναμα κατεχίνης), TCAcids: τρυγικοί εστέρες (ισοδύναμα καφεϊκού οξέος), TFlav: φλαβονόλες (ισοδύναμα κερκετίνης))

Η εκχύλιση των πολυφαινολών κατά την οινοποίηση επηρεάζεται πρωταρχικά από την χρονική διάρκεια της διεργασίας. Η μέγιστη συγκέντρωση ολικών φαινολικών προσδιορίστηκε σε ***3581 ± 24 mg/L*** για το Cabernet και σημειώθηκε την 20^{η} και τελευταία ημέρα της διεργασίας.

Προφανώς, η συγκέντρωση των ολικών φαινολών είναι συνάρτηση της εκχύλισης των επιμέρους φαινολικών ομάδων. Οι ανθοκυάνες είναι τα συστατικά που εκχυλίζονται άμεσα, κατά τις πρώτες κιόλας ώρες της οινοποίησης μετά την έκθλιψη. Αυτό το γεγονός επιβεβαιώνεται και στο Διάγραμμα 9.1 όπου φαίνεται ότι στην αρχή της κρυοεκχύλισης έχει ήδη εκχυλιστεί στο γλεύκος μια ποσότητα ανθοκυανών που αντιστοιχεί περίπου στο ***29%*** των ολικών ανθοκυανών στο τέλος της οινοποίησης που ήταν ***1622 ± 3 mg/L*** ισοδύναμα γαλλικού οξέος. Αυτό είναι αναμενόμενο, μιας και τα συγκεκριμένα μόρια έχουν πολύ υψηλή διαλυτότητα στο νερό και βρίσκονται κυρίως στους φλοιούς των ραγών. Η μέγιστη συγκέντρωση ανθοκυανών παρατηρείται την 20^{η} μέρα κάτι που δείχνει ότι η διεργασία της κρυοκχύλισης σε συνδυασμό με τη χρήση πηκτινολητικών ενζύμων επιτρέπουν την εκχύλιση των ανθοκυανών μέχρι την ολοκλήρωση της οινοποίησης.

Αντίστοιχο προφίλ εκχύλισης με τις ανθοκυάνες, εμφάνισαν τα κιναμωμικά οξέα και οι τρυγικοί εστέρες τους, ενώ η περιεκτικότητά τους στο κρασί είναι μικρότερη από αυτή των ανθοκυανών. Οι τρυγικοί εστέρες εκτός από τα στερεά μέρη του σταφυλιού βρίσκονται και στη σάρκα της ράγας με αποτέλεσμα όταν ξεκινά η κρυοεκχύλιση ένα σημαντικό ποσοστό τρυγικών εστέρων να βρίσκεται ήδη στο γλεύκος. Την πρώτη μέρας της κρυοεκχύλισης το γλεύκος περιέχει το ***39.5%*** της τελικής συγκέντρωσης τρυγικών εστέρων στο τέλος της οινοποίησης. Η μέγιστη συγκέντρωση των τρυγικών εστέρων παρατηρήθηκε όπως και στις ανθοκυάνες την $20^{η}$ μέρα της εκχύλισης και ήταν ***270 ± 1 mg/L*** καφεϊκού οξέος.

Οι φλαβονόλες βρίσκονται σε πολύ μικρές περιεκτικότητες σε σχέση με τις άλλες φαινολικές ομάδες στο κρασί. Και πάλι η μέγιστη συγκέντρωση παρατηρήθηκε την $20^{η}$ μέρα της εκχύλισης και ήταν ***270 ± 1 mg/L*** ισοδύναμα κερκετίνης.

Τέλος, ιδιαίτερο ενδιαφέρον εμφάνισε η εκχύλιση των φλαβαν-3-ολών που περιλαμβάνουν τις προκυανιδίνες (πρόδρομους των συμπυκνωμένων ταννινών των παλαιωμένων οίνων). Παρατηρείται ότι στο τέλος της κρυοεκχύλισης ($5^{η}$ μέρα) το ποσοστό των προκυανιδινών που είχε εκχυλιστεί ήταν μόνο ***30%*** αφού δεν είχε ξεκινήσει η αλκοολική ζύμωση, ενώ η μέγιστη συγκέντρωση προσδιορίστηκε την $20^{η}$ ημέρα (***792 ±13 mg/L*** ισοδύναμα κατεχίνης), στο πέρας της ζύμωσης, μαζί με τις υπόλοιπες φαινολικές ομάδες. Το χαμηλό ποσοστό εκχύλισης μέχρι το πέρας της κρυοεκχύλισης μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι οι προκυανιδίνες βρίσκονται κυρίως στα γίγαρτα και όχι στους φλοιούς ή τη σάρκα των ραγών, και ως εκ τούτου η εκχύλισή τους είναι πιο δύσκολη από των άλλων φαινολικών συστατικών του σταφυλιού. Παράλληλα, έχουν χαμηλή διαλυτότητα στο νερό, επομένως η αύξηση της περιεκτικότητας της αιθανόλης κατά την εξέλιξη της αλκοολικής ζύμωσης συντελεί στην καλύτερη εκχύλιση των προκυανιδινών.

9.2 Ανάλυση του φαινολικού προφίλ φρέσκων κρασιών

Στη συνέχεια μελετήθηκε η φαινολική σύσταση στα πέντε (5) φρέσκα κρασιά. Η ποιοτική ανάλυση του φαινολικού προφίλ (ταυτοποίηση επιμέρους φαινολικών ενώσεων) έγινε μέσω του συστήματος ESI-MS, ενώ η ποσοτική ανάλυση (ποσοτικοποίηση των επιμέρους συγκεντρώσεων κάθε ένωσης) μέσω του συστήματος HPLC-MS.

9.2.1 Ταυτοποίηση φαινολικών συστατικών

Ακολουθώντας τη χρωματογραφική μέθοδο που αναπτύχθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο με χρήση HPLC-DAD-ESI-MS, έγινε αρχικά διαχωρισμός και στη συνέχεια ταυτοποίηση φαινολικών σε πέντε (5) διαφορετικά κρασιά. Τα κρασιά που αναλύθηκαν προέρχονταν από τις ποικιλίες Αγιωργίτικο (2 κρασιά), Ασύρτικο, Cabernet Sauvignon και Merlot. Οι χρόνοι έκλουσης, τα μέγιστα απορρόφησης, οι ιονισμένες μορφές και τα κύρια θραύσματα των φαινολικών συστατικών που ταυτοποιήθηκαν παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 9.1:

Φαινολικό συστατικό	***$t_{εκ}$ [min]***	***λ_{max} [nm]***	***$[M-H]^+$ και κύριο θραύσμα [m/z]***
Gallic acid	7,8	275	169, 125*
trans-Caftaric acid	11,9	329	311, 179*
(+)-Catechin	-	285	289*
trans-Coutaric acid	15,2	316	295, 163*
Caffeic acid	17,9	324	179, 135*
Delphinidin-3-glucoside(Dp-3glc)	24,1	526, 346, 278	465, 303
p-Coumaric acid	25,1	310	163, 119*
Myricetin-3-glucuronide (Mv-3-glc)	27,1	260, 356	493, 317*
Myricetin-3-glucoside	27,8	260, 257	479, 317*
Petunidin-3-glucoside(Pt-3-glc)	29,8	526, 350, 276	479, 317
Quercetin-3-glucuronide	31,5	257, 355	477, 301*
Quercetin-3-glucoside	32,3	258, 354	463, 301*
Cyanidin-3-glucoside (Cn-3-glc)	32,7	516, 280	449,287
Peonidin-3-glucoside(Pn-3-glc)	33,3	518, 362, 278	463, 301
Laricitrin-3-glucoside	33,6	258, 357	493, 331*
Malvidin-3-glucoside	35,1	530, 350, 278	493, 331
Myricetin	39	255, 374	317*
Isorhamnetin-3-glucoside	39,1	255, 356	477, 315*
Syringetin-3-glucoside	40	256, 358	507, 345*
Cyanidin-3-acetyl glucoside (Cn-3-acglc)	40,8	-	491, 287
Petunidin-3-acetyl glucoside (Pt-3-acglc)	42,5	528, 278	521, 317
Quercetin	47,7	256, 372	301*
Peonidin-3-acetyl glucoside (Pn-3-acglc)	48,5	526, 372, 282	505, 301
Malvidin-3-acetyl glucoside(Mv-3-acglc)	51	530, 350, 278	535, 331
Malvidin-3-caffeoyl glucoside(Mv-3-acglc)	52,7	-	655, 351
Cyanidin-3-coumaroyl glucoside(Cn-3-coumglc)	53,1	-	595, 287
Petunidin-3-coumaroyl glucoside(Pt-3-coumglc)	55,5	532, 282	625, 317
Peonidin-3-coumaroyl glucoside(Pn-3-coumglc	60,1	522, 282	609, 301
Malvidin-3-coumaroyl glucoside (Mv-3-coumglc)	61,7	536, 284	639, 331

Πίνακας 9.1 Χρόνοι έκλουσης, μέγιστα απορρόφησης, ιονισμένα κατιόντα/ανιόντα και κύρια θραύσματα των φαινολικών συστατικών που ταυτοποιήθηκαν σε πέντε (5) φρέσκα κρασιά των ποικιλιών Αγιωργίτικο, Ασύρτικο, Cabernet Sauvignon και Merlot (*$[M-H]^-$ και κύριο θραύσμα)

Συγκεκριμένα ταυτοποιήθηκαν από τα φαινολικά οξέα του κρασιού το γαλλκό οξύ (υδροξυ-βενζοϊκό οξύ), το trans-καφταρικό και trans-κουταρικό οξύ (τρυγικοί εστέρες των κιναμωμικών οξέων) καθώς και το καφεϊκό και π-κουμαρικό οξύ (κιναμωμικά οξέα). Από τις φλαβονόλες ταυτοποιήθηκαν η μυρισετίνη και η κερκετίνη στην άγλυκη μορφή τους καθώς και οι γλυκοζίτες και τα γλυκουρονίδια των δύο αυτών φλαβονολών. Επιπλέον φλαβονόλες, που ταυτοποιήθηκαν, είναι οι γλυκοζίτες της λαρικιτρίνης, της ισοραμνετίνης και της σιρινγκετίνης. Έγινε, ακόμα ταυτοποίηση των γλυκοζιτών και των ακετυλιωμένων γλυκοζιτών των πέντε (5) ανθοκυανών, της δελφινιδίνης, της κυανιδίνης, της πετουνιδίνης, της παιονιδίνης και της μαλβιδίνης καθώς και των κουμαριλωμένων γλυκοζιτών της πετουνιδίνης, της παιονιδίνης και της μαλβιδίνης, ενώ ταυτοποιήθηκε και ο καφεϊλιωμένος γλυκοζίτης της μαλβιδίνης. Τέλος, ταυτοποιήθηκε και η μονομερής κατεχίνη (φλαβαν-3-όλη), η οποία όμως δεν ήταν δυνατόν να ποσοτικοποιηθεί με τη χρησιμοποιούμενη χρωματογραφική μέθοδο όπως συνέβη και με το γαλλικό οξύ.

9.2.2 Ποσοτικοποίηση φαινολικών συστατικών

9.2.2.1 Φαινολικά οξέα

Στον πίνακα 9.2 εμφανίζονται οι συγκεντρώσεις των φαινολικών υδροξυ-κιναμωμικών οξέων για τα πέντε φρέσκα κρασιά, δηλαδή του καφεϊκού και του π-κουμαρικού οξέος, καθώς και των εστέρων τους, trans-καφταρικό οξύ και trans-κουταρικό οξύ. Η ανάλυση έγινε με τη χρωματογραφική μέθοδο, με το σύστημα HPLC-DAD στα 320 nm.

	Συγκέντρωση φαινολικών οξέων [mg/L]				
Φαινολικά οξέα	**Αγιωργίτικο (ΤΕΙ)**	**Αγιωργίτικο (Τσέλεπος)**	**Merlot**	**Cabernet Sauvignon**	**Ασύρτικο**
trans-Caftaric acid	48.6	45.0	18.8	23.1	14.9
trans-Coutaric acid	23.8	24.7	2.9	6.0	2.8
Caffeic acid	Ίχνη	Ίχνη	4.2	3.7	Ίχνη
p-Coumaric acid	Ίχνη	Ίχνη	Ίχνη	Ίχνη	Ίχνη

Πίνακας 9.2 Συγκεντρώσεις των φαινολικών οξέων και των εστέρων τους σε ισοδύναμα mg/L καφεϊκού οξέος [CAE]

Παρατηρήθηκε ότι σε όλα τα φρέσκα κρασιά τα κιναμωμικά παράγωγα εμφανίζονται κυρίως ως τρυγικοί εστέρες (καφταρικό και κουταρικό οξύ) καθώς οι αντίστοιχες υδρολυμένες μορφές τους (καφεϊκό και π-κουμαρικό οξύ) ανιχνεύτηκαν μόνο σε ίχνη στις ελληνικές ποικιλίες (Ασύρτικο, Αγιωργίτικο) και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις στις ξένες ποικιλίες (Cabernet, Merlot). Στα δύο κρασιά από την ποικιλία Αγιωργίτικο, παρά την πολύ διαφορετική οινοποίηση τους (κρυοεκχύλιση μίας (1) και πέντε (5) ημερών αντίστοιχα και εκχύλιση πέντε (5) και δεκαπέντε (15) ημερών αντίστοιχα), παρατηρήθηκαν παραπλήσιες συγκεντρώσεις των επιμέρους τρυγικών εστέρων. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι οι τρυγικοί εστέρες εκζυλίζονται γρήγορα στο κρασί και η μεγάλης διάρκειας εκχύλιση δεν επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τη συγκέντρωση τους, κάτι που είναι αναμενόμενο αφού είναι η μόνη ομάδα φαινολικών ουσιών που εντοπίζεται όχι μόνο στα στερεά μέρη αλλά και στη σάρκα του σταφυλιού. Στις ξένες ποικιλίες Merlot και Cabernet οι συγκεντρώσεις των τρυγικών εστέρων ήταν αρκετά μικρότερες ενώ τη μικρότερη συγκέντρωση τρυγικών εστέρων εμφάνισε το λευκό κρασί από την ποικιλία Ασύρτικο.

9.2.2.2 Φλαβονόλες

Στον πίνακα 9.3 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των επιμέρους φλαβονολών που υπολογίστηκαν με βάση την απορρόφηση τους στα 360 nm από το σύστημα HPLC-DAD, με τη χρωματογραφική μέθοδο για τα πέντε (5) φρέσκα κρασιά.

	Συγκέντρωση επιμέρους φλαβονολών [mg/L]				
Φλαβονόλες	***Αγιωργίτικο (TEI)***	***Αγιωργίτικο (Τσέλεπος)***	***Merlot***	***Cabernet Sauvignon***	***Ασύρτικο***
Myricetin-3-glucuronide	1.6	3.2	1.4	2.5	-
Quercetin-3-glucuronide	6.6	14.1	2.2	6.3	3.3
Ολικά γλυκουρονίδια	***8.2***	***17.3***	***3.6***	***8.8***	***3.3***
Myricetin-3-glucoside	10.2	11.5	2.5	3.3	-
Quercetin-3-glucoside	5.7	7.4	4.4	3.8	2.4
Laricitrin-3-glucoside	3.2	4.2	1.7	2.2	-
Isorhamnetin-3-glucoside	1.7	2.1	Ίχνη	Ίχνη	Ίχνη
Syringetin-3-glucoside	4.1	5.4	2.5	3.5	-
Ολικοί γλυκοζίτες	***24.9***	***30.6***	***11.1***	***12.8***	***2.4***
Myricetin	3.7	6.5	15.3	19.0	Ίχνη
Quercetin	6.3	18.0	22.5	17.6	1.1
Ολικές άγλυκες	***10.0***	***24.5***	***37.8***	***17.6***	***1.1***
Ολικές φλαβονόλες	***43.1***	***72.4***	***52.5***	***39.2***	***6.8***

Πίνακας 9.3 Συγκέντρωση επιμέρους φλαβονών σε ισοδύναμα mg/L κερκετίνης [*Quercetin eq.*]

Όλες οι φλαβονόλες που ταυτοποιήθηκαν, ανιχνεύτηκαν και στα τέσσερα ερυθρά κρασιά. Στο Ασύρτικο, που όπως ήταν αναμενόμενο η συγκέντρωση των φλαβονολών ήταν πολύ μικρότερη (ίχνη) σε σχέση με τα ερυθρά κρασιά καθώς δεν πραγματοποιήθηκε εκχύλιση κατά την οινοποίηση, ανιχνεύτηκε η κερκετίνη και στις τρεις (3) μορφές της (άγλυκη, γλυκουρονίδιο και γλυκοζίτης της κερκετίνης) ενώ ακόμα σε ίχνη βρέθηκαν ο γλυκοζίτης της ισοραμνετίνης και η άγλυκη μυρικετίνη.

Η συγκέντρωση των ολικών αλλά και των επιμέρους φλαβονολών ποικίλει σημαντικά στα ερυθρά κρασιά. Τη μεγαλύτερη συγκέντρωση ολικών φλαβονολών εμφάνισε το Αγιωργίτικο με τη μακρά περίοδο εκχύλισης (Τσέλεπος), η οποία ήταν κατά 68% μεγαλύτερη από το κρασί της ίδιας ποικιλίας με την περιορισμένη εκχύλιση (TEI), κάτι που δείχνει ότι η χρονική διάρκεια της εκχύλισης επιδρά σημαντικά στη ποσότητα φλαβονολών που εκχυλίζονται στο κρασί. Στις ξένες ποικιλίες Cabernet και Merlot επικρατούν ποσοτικά οι άγλυκες μορφές της κερκετίνης και της μυρικετίνης κάτι που δεν ισχύει για τα κρασιά από το Αγιωργίτικο.

9.2.2.3 Ανθοκυάνες

Στον Πίνακα 9.4 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των επιμέρους ανθοκυανών στις διάφορες μορφές που εμφανίζονται. Καθώς το Ασύρτικο αποτελεί ένα λευκό κρασί (στην οινοποίηση του οποίου δεν πραγματοποιήθηκε προζυμωτική κρυοεκχύλιση), το ανθοκυανικό του περιεχόμενο είναι πάρα πολύ χαμηλό και οι λίγες επιμέρους ανθοκυάνες που εντοπίστηκαν σε αυτό βρίσκονταν σε ίχνη και δεν εμφανίζονται στον πίνακα.

	Συγκέντρωση επιμέρους ανθοκυανών [mg/L]			
Ανθοκυάνες	***Αγιωργίτικο (ΤΕΙ)***	***Αγιωργίτικο (Τσέλεπος)***	***Merlot***	***Cabernet Sauvignon***
Dp-3-glc	10.4	24.6	49.2	49.2
Cn-3-glc	-	-	Ίχνη	-
Pt-3-glc	14.2	36.5	54.0	48.6
Pn-3-glc	11.7	25.1	25.9	17.8
Mv-3-glc	209.8	443.4	277.4	446.1
Ολικές Γλυκοζυλιωμένες	***246.1***	***529.6***	***406.5***	***561.7***
Dp-3-acglc	-	-	14.4	16.2
Cn-3-acglc	-	-	Ίχνη	-
Pt-3-acglc	9.0	-	13.0	14.3
Pn-3-acglc	-	12.0	15.7	14.0
Mv-3-acglc	20.5	35.8	63.1	156.5
Ολικές ακετυλιωμένες	***29.5***	***47.8***	***106.2***	***201.0***
Dp-3-coumglc	-	-	-	9.9
Cn-3-coumglc	-	-	-	-
Pt-3-coumglc	10.6	-	14.1	11.7
Pn-3-coumglc	8.2	13.1	11.4	-
Mv-3-coumglc	34.1	65.3	39.0	56.3
Mv-3-cis-coumglc	-	12.9	-	-
Ολικές Κουμαριλιωμένες	***52.9***	***91.3***	***64.5***	***77.9***
Mv-3-cafglc	-	-	Ίχνη	-
Ολικές Μονομερείς ανθοκυάνες	***328.5***	***668.7***	***577.2***	***840.6***

Πίνακας 9.4 Συγκεντρώσεις κύριων ανθκυανικών συστατικών σε ισοδύναμα mg/L του 3-γλυκοζίτη της μαλβιδίνης [Mv-3-glc eq.]

Ο 3-γλυκοζίτης της μαλβιδίνης ήταν και η κύρια μονομερής ανθοκυάνη σε όλες τις περιπτώσεις. Ο ακετυλιώμενος γλυκοζίτης της μαλβιδίνης ήταν η 2^{η} κύρια ανθοκυάνη στις ξένες ποικιλίες Cabernet και Merlot, ενώ στα δύο κρασιά από την

ποικιλία του Αγιωργίτικου εμφάνισε την 2η υψηλότερη συγκέντρωση ο trans-κουμαριλιωμένος γλυκοζίτης της μαλβιδίνης. Η κυανιδίνη ήταν η ανθοκυανιδίνη με την μικρότερη συγκέντρωση ανεξαρτήτως ποικιλίας και ανιχνεύτηκε σε ίχνη μόνο στην ποικιλία Merlot. Γενικά, στην ποικιλία Merlot ταυτοποιήθηκαν οι περισσότερες (14) διαφορετικές ανθοκυάνες, στο Αγιωργίτικο οι λιγότερες (9).

9.2.3 Διάκριση ερυθρών ποικιλιών με βάση το φαινολικό τους προφίλ

Το ολικό φαινολικό φορτίο, που υπολογίστηκε με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu, οι μονομερείς ανθοκυάνες και οι ολικές φλαβονόλες των τεσσάρων (4) ερυθρών κρασιών παρουσιάζονται στον πίνακα 9.5 , καθώς και η ποσόστωση των επιμέρους μορφών τους. Επιπλέον, υπολογίζεται και το ποσοστό που αντιπροσωπεύει η μαλβιδίνη σε κάθε ποικιλία όντας η ανθοκυάνη με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση σε όλα τα κρασιά που μελετήθηκαν τόσο στην γλυκοζυλιωμένη μορφή της, όσο και στην ακετυλιωμένη και κουμαριλιωμένη αντίστοιχα.

Το ότι η ποσοτικοποίηση, μόνο, του ανθοκυανικού περιεχομένου δεν μπορεί να διακρίνει μια ποικιλία κρασιού, φαίνεται από το γεγονός ότι οι ολικές ελεύθερες ανθοκυάνες για τα δύο φρέσκα κρασιά της ίδιας ποικιλίας παρουσιάζουν απόκλιση περίπου 100%. Η τόσο μεγάλη απόκλιση είναι αναμενόμενη εάν ληφθεί υπόψη ότι στις δυο οινοποιήσεις της συγκεκριμένης ποικιλίας δεν ήταν ίδιος ο χρόνος εκχύλισης, ο τρόπος οινοποίησης, αλλά ακόμα και η προέλευση των σταφυλιών. Αντίθετα, αυτό που υπό συνθήκες αναφέρεται στη διεθνή βιβλιογραφία ότι χαρακτηρίζει ανεξάρτητα από τις παραπάνω παραμέτρους μια ποικιλία σταφυλιού, είναι οι αναλογίες μεταξύ συγκεκριμένων γλυκοζιτών.

Ως εκ τούτου, για τα τέσσερα (4) κρασιά που μελετήθηκαν, υπολογίστηκαν και παρουσιάζονται στον Πίνακα 9.5 και οι λόγοι ***Σγλυκοζιλιωμένων/Σακετυλιωμένων***, ***Σγλυκοζιλιωμένων/Σκουμαριλιωμένων*** και ***Σακετυλιωμένων/Σκουμαριλιωμένων*** γλυκοζιτών, οι οποίοι προτείνονται στη βιβλιογραφία για την διάκριση των κρασιών ως προς την ποικιλία. Επιπλέον χρησιμοποιήθηκε ο λόγος ***(Pn-3-glc+pt-3-glc)/(dp-3-glc+cn-3-glc***) ο οποίος προτείνεται από τους Figueiredo-González et al. για τον ίδιο σκοπό και που ουσιαστικά είναι ενδεικτικός για τη δράση του ενζύμου 3΄Ο-μεθυλ τρανσφεράση (3΄ΟΜΤ), το οποίο μετατρέπει μέσω Ο-μεθυλίωσης στη θέση 3 της ανθοκυανιδίνης, την κυανιδίνη σε πεονιδίνη και την δελφινιδίνη σε πετουνιδίνη.

Βασικές φαινολικοί παράμετροι	*Αγιωργίτικο (ΤΕΙ)*	*Αγιωργίτικο (Τσέλεπος)*	*Merlot*	*Cabernet Sauvignon*
Ολικά φαινολικά [mg/L GAE]	2591.67	3186.7	2553.3	2736.7
Μονομερεις ανθοκυάνες [mg/L mv-3-glc eq.]	328.5	668.7	577.2	840.6
% ολική μαλβιδίνη	80.5	81.4	65.7	78.4
∑ γλυζκοζυλιωμένες/ ∑ακετυλιωμένες	8.34a	11.08a	3.83b	2.79b
∑γλυκοζυλιωμένες/ ∑κουμαριλιωμένες	4.65d	5.80c	6.30b	7.21a
∑ ακετυλιωμένες/ ∑κουμαριλιωμένες	0.56c	0.52c	1.65b	2.58a
(Pn-3-glc+pt-3-glc)/ (dp-3-glc+cn-3-glc)	2.49a	2.50a	1.62b	1.35b
Ολικές φλαβονόλες [mg/L Q eq.]	43.1	72.4	52.5	39.2
% γλυκοζίτες των φλαβονολών	57.8	42.3	21.1	32.7
% γλυκουρονίδια των φλαβονολών	19.0	23.9	6.9	22.4
% Άγλυκες φλαβονόλες	23.2	33.8	72.0	44.9
% ολική κερκετίνη	43.2	54.6	55.4	47.6
%ολική μυρικετίνη	36.0	29.3	36.6	42.6

Πίνακας 9.5 Συγκεντρώσεις ολικών φαινολικών, μονομερών ανθοκυανών, ολικών φλαβονολών, ποσόστωση επιμέρους ομάδων των ανθοκυανών και φλαβονολών, και λόγοι που χρησιμοποιούνται για τη διάκριση των ποικιλιών

Πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση (one way ANOVA, Duncan test.) $p>0.05$ που έδειξε ότι οι υπολογιζόμενοι λόγοι των γλυκοζιτών των ανθοκυανών διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους. Συγκεκριμένα, από τον Πίνακα 9.5 φαίνεται ότι με βάση τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα και οι 4 λόγοι διαχωρίζουν το Αγιωργίτικο από τις άλλες δύο ερυθρές ποικιλίες. Οι προτεινόμενοι από τη βιβλιογραφία λόγοι των γλυκοζυλιωμένων / ακετυλιωμένων και γλυκοζυλιωμένων / κουμαριλιωμένων ανθοκυανών παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων των ποικιλιών Cebernet και Merlot. Οι δύο αυτές διεθνείς ποικιλίες έχουν παρόμοιο οργανοληπτικό χαρακτήρα και τις ίδιες ανάγκες κλιματικών συνθηκών για να ωριμάζουν βέλτιστα. Τα στοιχεία αυτά ίσως δικαιολογούν τη μεγαλύτερη «συγγένεια» των φαινολικών τους προφίλ σε σχέση με το Αγιωργίτικο. Επιπλέον, και στα δύο κρασιά από Αγιωργίτικο, οι % ολικές μαλβιδίνες εμφανίζουν περίπου την ίδια τιμή κοντά στο 81%. Το Merlot εμφανίζει παραπλήσιο ποσοστό ολικών

μαλβιδινών (78%) ενώ στο Cabernet Sauvignon οι % ολικές μαλβιδίνες είναι μόλις 66%.

Παρατηρώντας στον Πίνακα 9.5 τη σύσταση των φλαβονολών, φαίνεται ότι εμφανίζονται και εκεί διαφορές μεταξύ των διαφορετικών ποικιλιών. Λόγω της πολύ μικρής συγκέντρωσης τους στο κρασί, όμως δε χρησιμοποιείται συνήθως σύσταση τους, για την διάκριση των ποικιλιών. Τα ποσοστά των γλυκοζυλιωμένων και άγλυκων μορφλων των φλαβονολών παρουσιάζουν μεγάλες διαφοροποιήσεις τόσο μεταξύ των διαφορετικών ποικιλιών όσο και μεταξύ των δύο κρασιών από Αγιωργίτικο. Σε όλες τις περιπτώσεις, η κερκετίνη στις διάφορες μορφές που εμφανίζεται, ήταν η κύρια φλαβονόλη και δεύτερη μεγαλύτερη συγκέντρωση παρουσίαζε η μυρικετίνη.

9.3 Μελέτη εξέλιξης φαινολικών κατά την αποθήκευση κρασιού από τις ποικιλίες Ασύρτικο και Αγιωργίτικο υπό τροποποιημένη ατμόσφαιρα αζώτου (N_2)

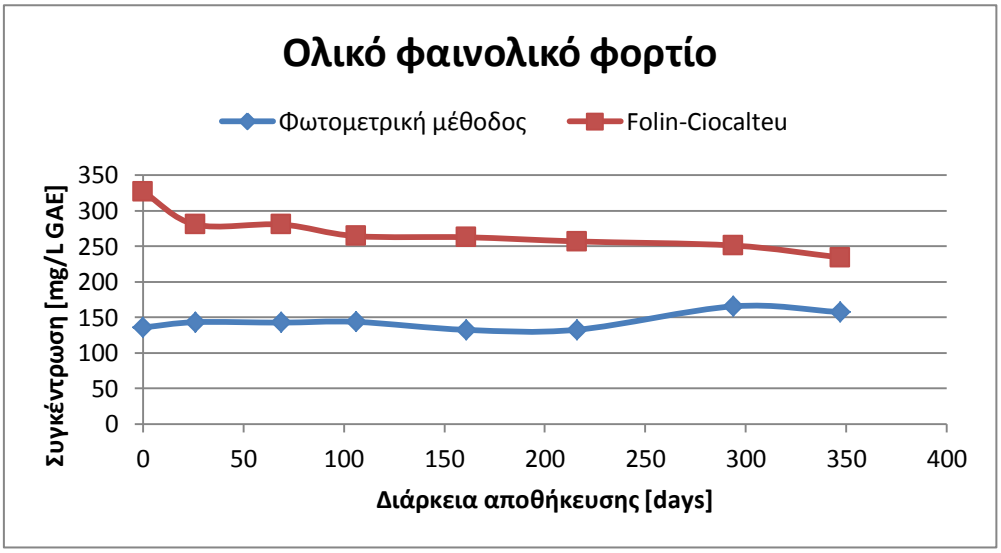
Στη παρόν υποκεφάλαιο παρουσιάζονται οι μεταβολές των ολικών φαινολικών, των επιμέρους υποομάδων τους (φαινολικά οξέα, φλαβονόλες, ανθοκυάνες) καθώς και οι χρωματικές παράμετροι για ένα λευκό κρασί (Ασύρτικο) και ένα ερυθρό (Αγιωργίτικο) ύστερα από την οινοποίηση που πραγματοποιήθηκε σε ημιβιομηχανική κλίμακα στο Τ.Ε.Ι. Οινολογίας Αθηνών, συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης τους σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα αζώτου (N_2).

Η οινοποίηση του κρασιού από την ποικιλία Ασύρτικο διήρκησε 6 μέρες, δεν περιελάμβανε προζυμωτική κρυοεκχύλιση και συνολικά παράχθηκαν περίπου 10 hL κρασιού. Η συσκευασία έγινε με πολυστρωματικούς πλαστικούς περιέκτες (laminated bags) σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα αζώτου (N_2). Η οινοποίηση του κρασιού από την ποικιλία Αγιωργίτικο περιελάμβανε 20 ώρες κρυοεκχύλισης και στη συνέχεια αφού ξεκίνησε η αλκοολική ζύμωση το γλεύκος παρέμεινε σε επαφή με τα στέμφυλα για άλλες πέντε (5) μέρες. Η συσκευασία σε πολυστρωματικούς πλαστικούς περιέκτες υπό τροποποιημένη ατμόσφαιρα αζώτου (N_2) έγινε όπως ακριβώς και στο Ασύρτικο.

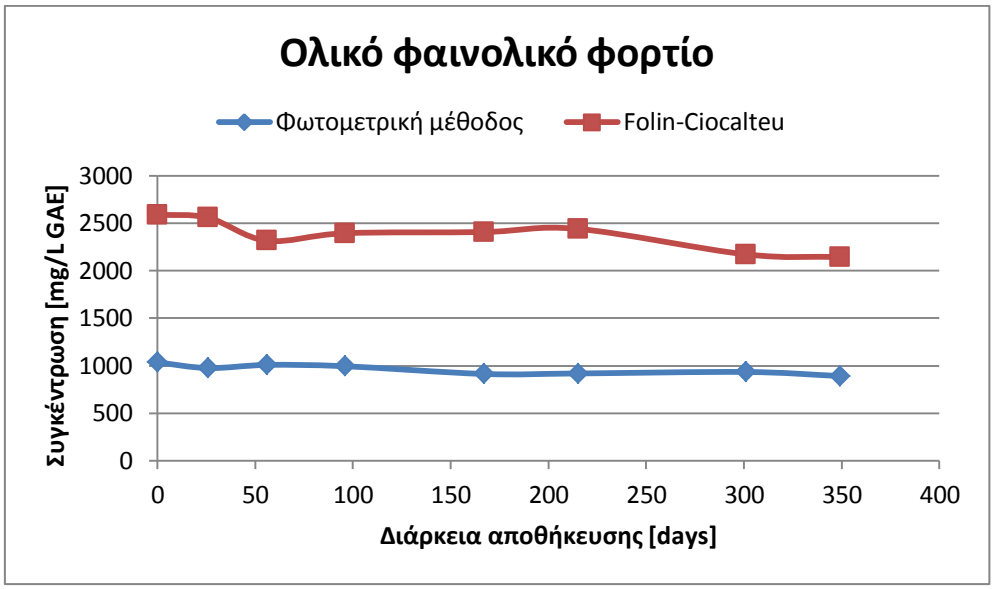
Μελετήθηκε η εξέλιξη των ολικών φαινολικών και των επιμέρους ομάδων τους, (φαινολικών οξέων, φλαβονολών) καθώς και των χρωματικών παραμέτρων συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης για τα το κρασί της κάθε ποικιλίας. Επιπλέον, λόγω του αυξημένου φαινολικού φορτίου του ερυθρού κρασιού μελετήθηκε η εξέλιξη της συγκέντρωσης των μονομερών ανθοκυανών για το Αγιωργίτικο, η οποία στο λευκό κρασί είναι σχεδόν μηδενική.

9.3.1 Εξέλιξη ολικών φαινολικών κατά την αποθήκευση

Στα Διαγράμματα 9.2 και 9.3 παρουσιάζεται η μεταβολή της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών συστατικών με τη φωτομετρική μέθοδο (φασματομετρία UV-Vis στα 280 nm) και με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu για τα κρασιά από την ποικιλία Ασύρτικο και Αγιωργίτικο, αντίστοιχα. Οι συγκεντρώσεις που προκύπτουν και από τις δύο μεθόδους δίνονται σε ισοδύναμα mg/L γαλλικού οξέος (GAE).



Διάγραμμα 9.2 Εξέλιξη συγκέντρωσης ολικών φαινολικών συστατικών, εκφρασμένα σε mg/L ισοδύναμα γαλλικού οξέος [GAE], με τη φωτομετρική μέθοδο και με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu κατά την αποθήκευση κρασιού από την ποικιλία Ασύρτικο σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα N_2



Διάγραμμα 9.3 Εξέλιξη συγκέντρωσης ολικών φαινολικών συστατικών σε mg/L ισοδύναμα γαλλικού οξέος [GAE], με τη φωτομετρική μέθοδο και με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu κατά την αποθήκευση κρασιού από την ποικιλία Αγιωργίτικο σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα N_2

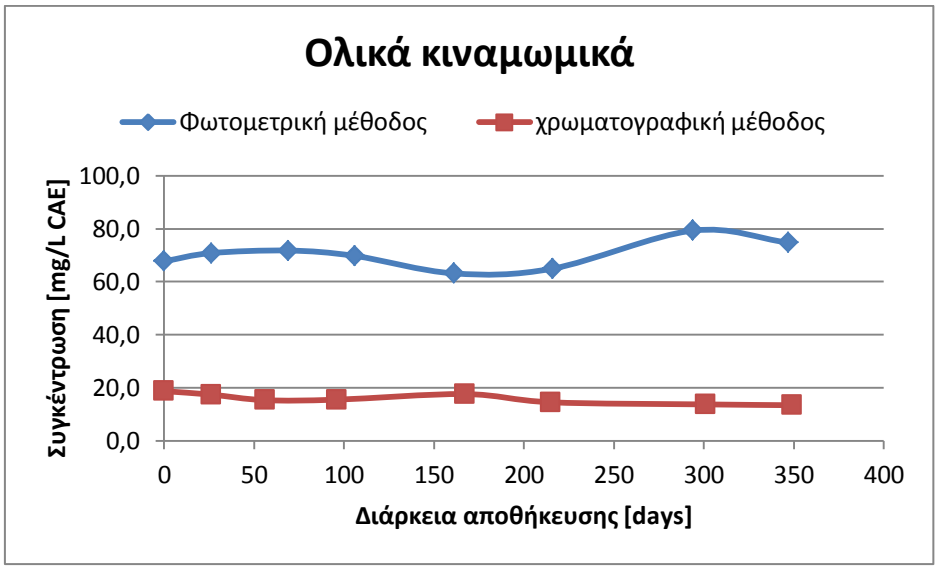
Παρατηρώντας τα δύο διαγράμματα γίνεται αντιληπτό, αρχικά, ότι οι δύο μέθοδοι για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών παρουσιάζουν μεγάλες αποκλίσεις μεταξύ τους. Και στις δύο περιπτώσεις ο προσδιορισμός με την μέθοδο Folin-Ciocalteu δίνει συγκεντρώσεις περίπου 2,5 φορές μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες της φωτομετρικής μεθόδου. Κάτι τέτοιο είναι λογικό αν ληφθεί υπόψιν ότι τα ολικά φαινολικά συστατικά αναφέρονται σε ένα πλήθος ενώσεων διαφορετικής δομής, μεγέθους και ιδιοτήτων τα οποία όμως εκφράζονται στη περίπτωση της φωτομέτρησης σε ισοδύναμα μιας συγκεκριμένης ένωσης (γαλλικό οξύ) με συγκεκριμένα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά, ενώ από την άλλη μεριά με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu μετρούνται με συμπλοκομετρία το πλήθος των φαινολικών υδροξυλίων του κάθε φαινολικού συστατικού. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι 32 mg/L ζυγισμένου καφεικού οξέος που προστέθηκαν σε 12% αλκοολικό διάλυμα νερού στο εργαστήριο προσδιορίστηκαν ως 34 mg/L ισοδύναμα γαλλικού οξέος με τη φωτομετρική μέθοδο και ως 73 mg/L ισοδύναμα γαλλικού οξέος με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu ενώ 50 mg/L 3-γλυκοζίτη της μαλβιδίνης σε όμοιο διάλυμα προσδιορίστηκαν ως 21 mg/L ισοδύναμα γαλλικού οξέος με τη φωτομετρική μέθοδο και 55 mg/L ισοδύναμα γαλλικού με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Τελικά, από τη σύγκριση του προφίλ της

εξέλιξης των ολικών φαινολικών με τις δύο μεθόδους, μπορούν να εξαχθούν κάποια κοινά συμπεράσματα, ενώ οι διαφορετικές απόλυτες τιμές αντικατοπτρίζουν τη διαφορετική προσέγγιση της κάθε μεθόδου και δεν είναι συγκρίσιμες. Σημειώνεται ότι ο συντελεστής συσχέτισης των αποτελεσμάτων για τις δύο μεθόδους μέτρησης υπολογίστηκε σε $r=0.67$ (Pearson correlation, $p<0.05$).

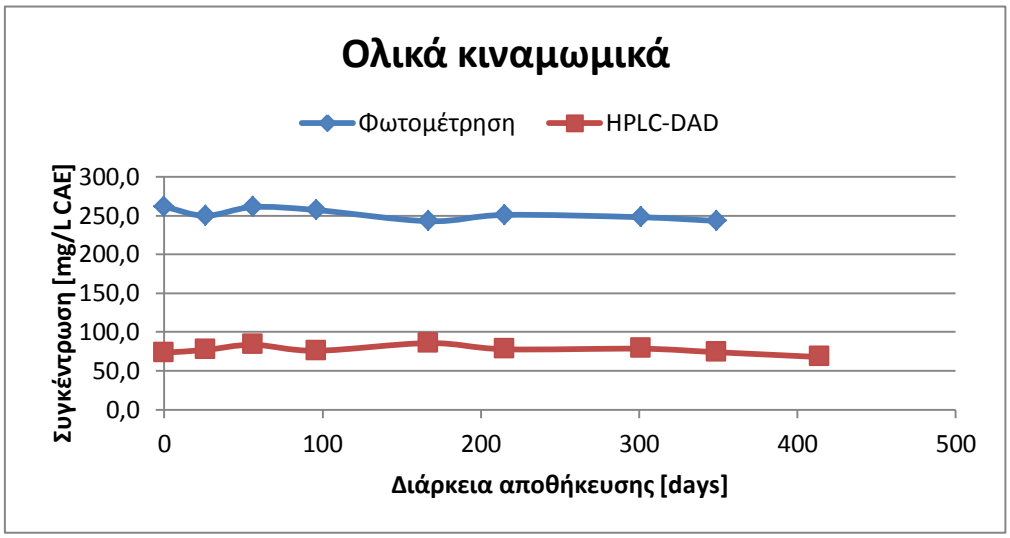
Από τα δύο διαγράμματα φαίνεται ακόμα μια μικρή τάση μείωσης της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης (με εξαίρεση τη φωτομετρική μέθοδο στο Ασύρτικο που δε δείχνει κάποια σημαντική μεταβολή του ολικού φαινολικού φορτίου), κάτι που είναι λογικό να συμβαίνει λόγω χημικών οξειδωτικών δράσεων και συμφωνεί με τα βιβλιογραφικά δεδομένα. Επιπλέον, όπως ήταν αναμενόμενο το ερυθρό κρασί εμφανίζει πολύ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από το αντίστοιχο λευκό κρασί, σχεδόν μια τάξη μεγέθους μεγαλύτερες, γεγονός που οφείλεται στην εκχύλιση των φαινολικών στο γλεύκος κατά τη περίοδο παραμονής του γλεύκους με τα στέμφυλα στον οινοποιητή.

9.3.2 Εξέλιξη φαινολικών οξέων

Η μελέτη της εξέλιξης των φαινολικών οξέων επικεντρώθηκε στα κιναμωμικά οξέα και τους τρυγικούς εστέρες των κιναμωμικών. Στα Διάγραμματα 9.4 και 9.5 παρουσιάζεται η συγκέντρωση των ολικών κιναμωμικών (τρυγικών εστέρων και κιναμωμικών οξέων) συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης με τη φωτομετρική και τη χρωματογραφική μέθοδο (HPLC-DAD) για το Ασύρτικο και το Αγιωργίτικο αντίστοιχα. Οι δύο φασματομετρίες πραγματοποιούνται στα 320 nm και οι συγκεντρώσεις δίνονται ως ισοδύναμα mg/L καφεϊκού οξέος (CAE).



Διάγραμμα 9.4 Εξέλιξη συγκέντρωσης ολικών κιναμωμικών σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος με τη φωτομετρική και με τη χρωματογραφική μέθοδο κατά την παλαίωση κρασιού από την ποικιλία Ασύρτικο σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα N_2

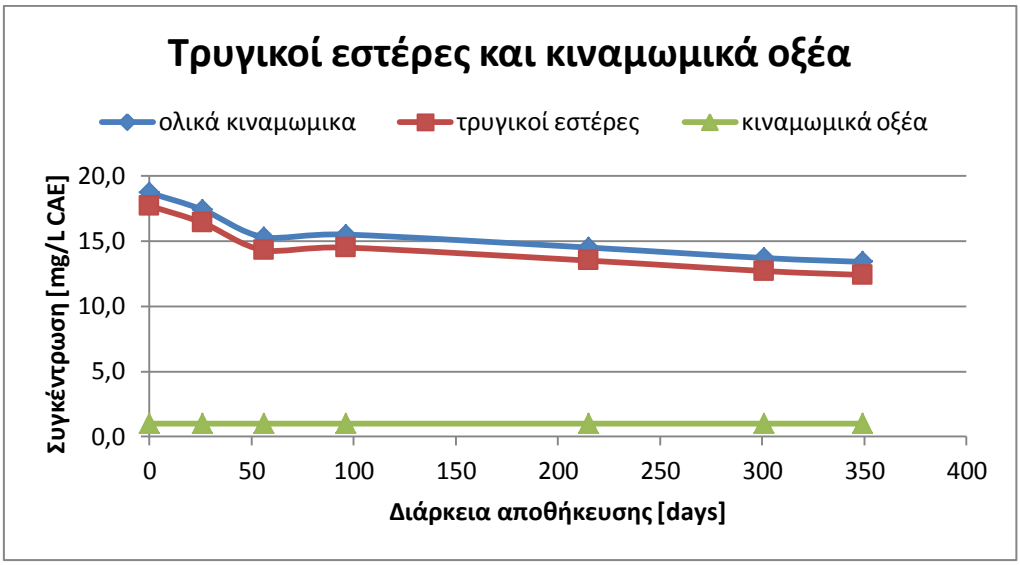


Διάγραμμα 9.5 Εξέλιξη συγκέντρωσης ολικών κιναμωμικών σε ισοδύναμα καφεϊκού οξέος [CAE], με τη φωτομετρική και με τη χρωματογραφική μέθοδο κατά την παλαίωση κρασιού από την ποικιλία Αγιωργίτικο σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα N2

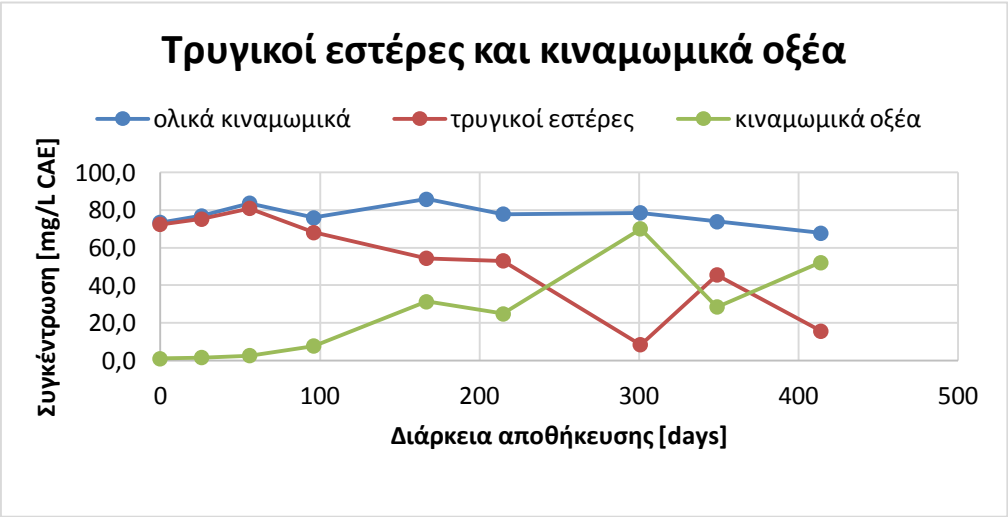
Μελετώντας τα δύο διαγράμματα παρατηρούνται και πάλι αποκλίσεις στις συγκεντρώσεις που προσδιορίζονται με τις δύο διαφορετικές μεθόδους (φωτομετρική και χρωματογραφική). Στην περίπτωση αυτή η ανάλυση που έγινε με τη χρωματογραφική μέθοδο θα πρέπει να θεωρηθεί πιο αξιόπιστη καθώς έγινε ποσοτικοποίηση κάθε επιμέρους ένωσης στα 320nm σε αντίθεση με τη φωτομετρική μέθοδο, στην οποία χρησιμοποιήθηκε η συνολική απορρόφηση του δείγματος στα 320nm, όπου υπάρχει θόρυβος και από τις απορροφήσεις άλλων φαινολικών ουσιών.

Επιπλέον, φαίνεται όπως και στα αντίστοιχα διαγράμματα συγκεντρώσεων των ολικών φαινολικών μια μικρή τάση μείωσης των ολικών κιναμωμικών με την πάροδο του χρόνου (με εξαίρεση, και πάλι, τη φωτομετρική μέθοδο στο Ασύρτικο). Οι συγκεντρώσεις των ολικών κιναμωμικών είναι σημαντικά μεγαλύτερες ($p<0.05$) στο ερυθρό Αγιωργίτικο (4-5 φορές μεγαλύτερες), γεγονός που οφείλεται στην εκχύλιση των φαινολικών οξέων κατά την ρυθρή οινοποίηση.

Στα Διάγραμματα 9.6 και 9.7 παρουσιάζονται οι μεταβολές των συγκεντρώσεων στις δύο βασικές μορφές εμφάνισης των κιναμωμικών συστατικών στο κρασί, ως τρυγικοί εστέρες των κιναμωμικών και ως κιναμωμικά οξέα, συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης μέσω ανάλυσης με τη χρωματογραφική μέθοδο (HPLC-DAD).



Διάγραμμα 9.6 Εξέλιξη συγκεντρώσεων τρυγικών εστέρων και κιναμωμικών οξέων σε ισοδύναμα καφεϊκού οξέος (CAE), κατά την αποθήκευση κρασιού από την ποικιλία Ασύρτικο σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα N_2 με τη χρωματογραφική μέθοδο



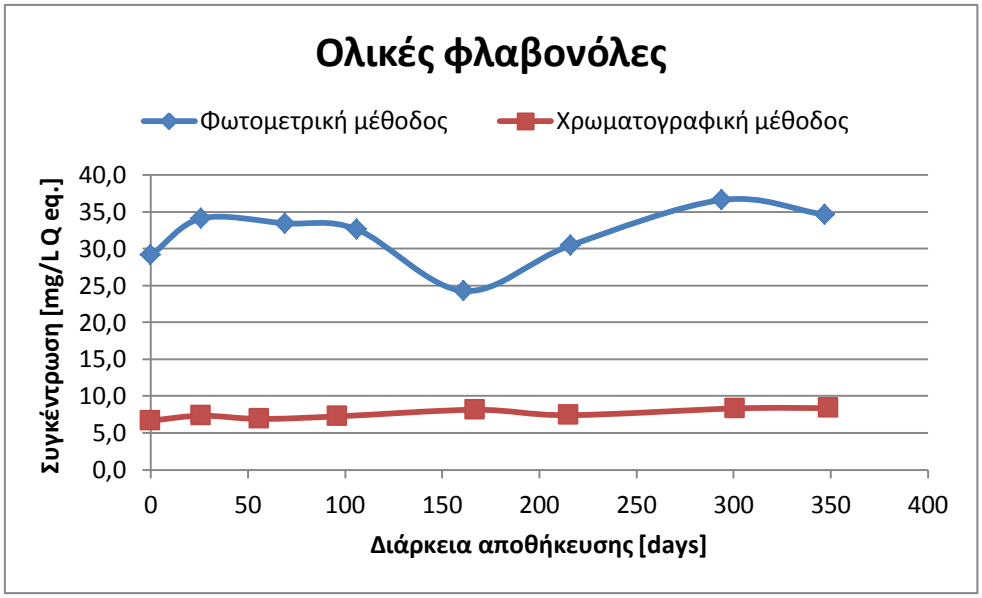
Διάγραμμα 9.7 Εξέλιξη συγκέντρωσης ολικών κιναμωμικών καθώς και των επιμέρους συγκεντρώσεων τρυγικών εστέρων και κιναμωμικών οξέων κατά την αποθήκευση κρασιού από την ποικιλία Αγιωγίτικο σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα N_2 μέσω χρωματογραφικής ανάλυσης

Παρατηρώντας, εκ νέου τα δύο διαγράμματα, συμπεραίνεται πως με την ολοκλήρωση της οινοποίησης τα κιναμωμικά συστατικά απαντώνται σχεδόν αποκλειστικά ως

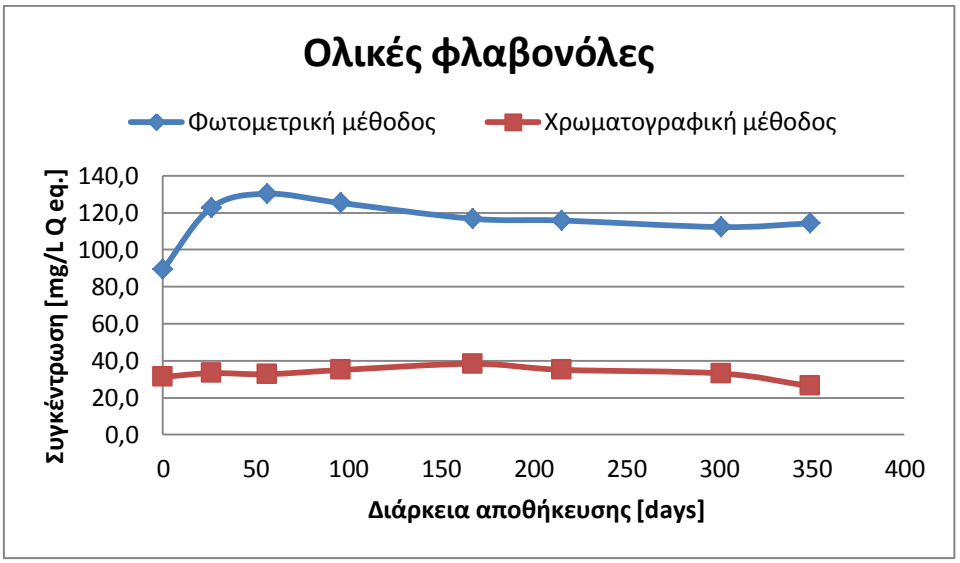
τρυγικοί εστέρες των κιναμωμικών και στο λευκό κρασί (Ασύρτικο) και στο ερυθρό (Αγιωργίτικο). Εντούτοις, ενώ στην αποθήκευση του Ασύρτικου δε φαίνεται να μεταβάλεται η αναλογία εστέρων και οξέων των κιναμωμικών, στο Αγιωργίτικο φαίνεται να πραγματοποιείται υδρόλυση των τρυγικών εστέρων προς κιναμωμικά οξέα και να επιτιγχάνεται γύρω από μια αναλογία συγκεντρώσεων κοντά στο 0,5. Οι συγκεντρώσεις των ολικών κιναμωμικών στο Ασύρτικο ήταν μικρότερες από 20 mg/L εκφρασμένων σε ισοδύναμα καφεϊκού οξέος (CAE), ενώ οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις στο Αγιωργίτικο ξεπέρασαν τα 80 mg/L.

9.3.3 Εξέλιξη φλαβονολών

Οι μεταβολές της συγκέντρωσης των ολικών φλαβονολών συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης τόσο με τη φωτομετρική όσο και με χρωματογραφική μέθοδο για το Ασύρτικο και το Αγιωργίτικο εμφανίζονται στα Διάγραμμα 9.8 και 9.9 αντίστοιχα. Οι συγκεντρώσεις δίνονται σε ισοδύναμα mg/L κερκετίνης (Q eq.) ενώ και στις δύο μεθόδους η φασματομετρία γίνεται στα 360 nm.



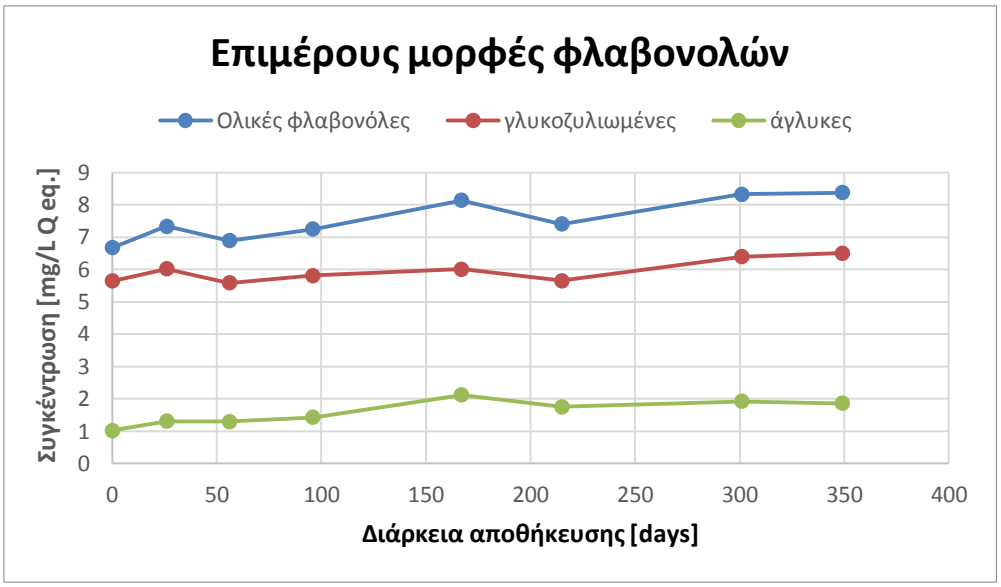
Διάγραμμα 9.8 Εξέλιξη συγκέντρωσης ολικών φλαβονολών σε ισοδύναμα κερκετίνης, (Q eq.) με τη φωτομετρική και τη χρωματογραφική μέθοδο, κατά την αποθήκευση κρασιού από την ποικιλία Ασύρτικο σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα N_2



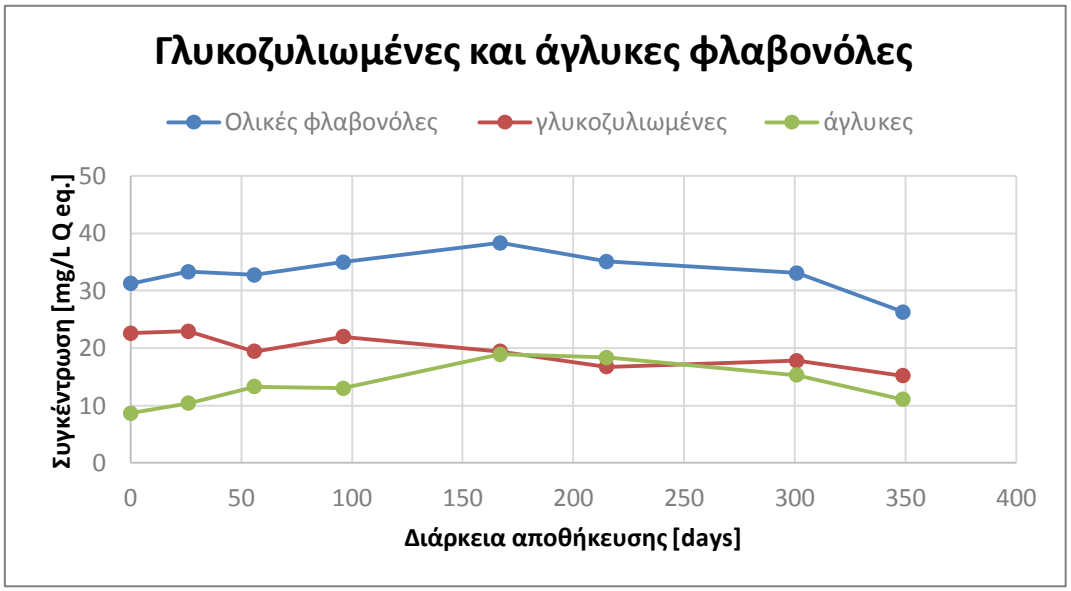
Διάγραμμα 9.9 Εξέλιξη ολικών φλαβονολών σε ισοδύναμα κερκετίνης, (Q. eq.) με τη φωτομετρική και τη χρωματογραφική μέθοδο, κατά την αποθήκευση κρασιού από την ποικιλία Αγιωργίτικο σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα N_2

Από τα δύο διαγράμματα φαίνεται πως οι μικρές συγκεντρώσεις των ολικών φλαβονολών δεν εμφανίζουν κάποια συγκεκριμένη τάση κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης των δειγμάτων αλλά παραμένουν περίπου σταθερές. Το Αγιωργίτικο εμφανίζει και πάλι συγκεντρώσεις φλαβονολών σημαντικά μεγαλύτερες ($p<0.05$) από τις αντίστοιχες στο Ασύρτικο. Οι συγκεντρώσεις των ολικών φλαβονολών που διαχωρίστηκαν και ποσοτικοποίηθηκαν με τη χρωματογραφική μέθοδο στο Ασύρτικο δεν ξεπέρασαν τα 10 mg/L ισοδύναμα κερκετίνης ενώ οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις στο Αγιωργίτικο δεν ξεπέρασαν τα 40 mg/L.

Στο Διάγραμμα 9.10 παρουσιάζεται η μεταβολη της συγκέντρωσης, συναρτήσει του χρόνου, των γλυκοζυλιωμένων μορφών των φλαβονολών (γλυκοζίτες και γλυκουρονίδια) και των υδρολυμένων άγλυκων μορφών τους με χρήση της χρωματογραφικής μεθόδου (HPLC-DAD).



Διάγραμμα 9.10 Εξέλιξη συγκεντρώσεων ολικών φλαβονολών και των κύριων υπο-ομάδων τους (γλυκοζυλιωμένές και άγλυκες φλαβονόλες) σε ισοδύναμα κερκετίνης (Q. eq.) κατά την αποθήκευση κρασιού από την ποικιλία Ασύρτικο σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα N_2 με τη χρωματογραφική μέθοδο

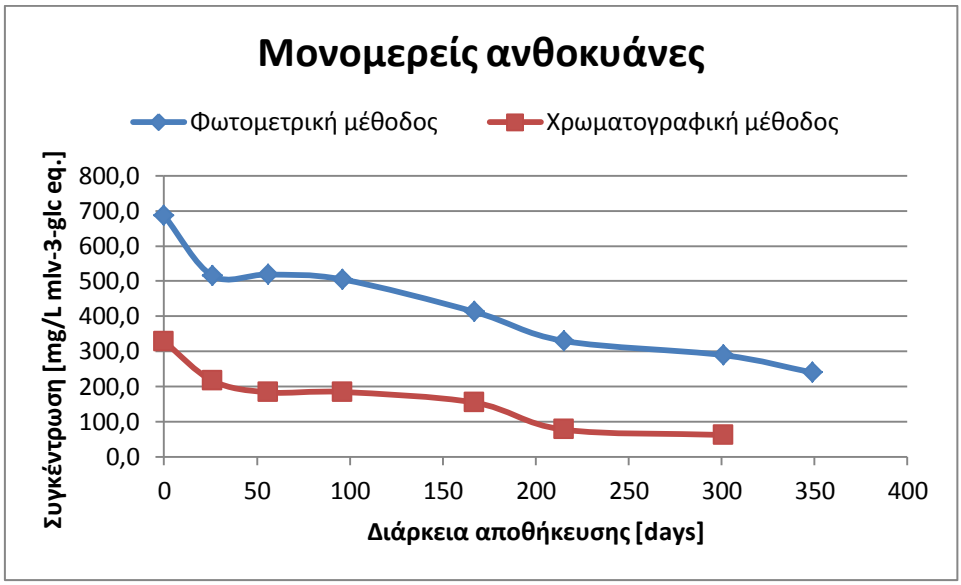


Διάγραμμα 9.11 Εξέλιξη συγκεντρώσεων ολικών φλαβονολών και των επιμέρους κύριων υποομάδων τους (γλυκοζυλιωμένές και άγλυκες φλαβονόλες) σε ισοδύναμα κερκετίνης κατά την αποθήκευση κρασιού από την ποικιλία Αγιωργίτικο σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα N_2 μέσω χρωματογραφικής ανάλυσης

Στο Διάγραμμα 9.11 φαίνεται ότι στο κρασί από την ποικιλία Ασύρτικο, μετά την ολοκλήρωση της οινοποίησης, οι φλαβονόλες βρίσκονται κατά κύριο λόγο σε γλυκοζυλιωμένη μορφή (ως γλυκοζίτες και γλυκουρονίδια) και σε πολύ μικρότερη συγκέντρωση ως υδρολυμένες άγλυκες φλαβονόλες. Η αναλογία μεταξύ των συγκεντρώσεων των δύο μορφών φλαβονολών δε μεταβάλλεται σχεδόν καθόλου συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης. Αντίθετα, στο Αγιωργίτικο υπάρχει διαφορά και στην αρχική αναλογία συγκεντρώσεων των γλυκοζυλιωμένων και άγλυκων μορφών που είναι ελαφρά μετατοπισμένη προς τις άγλυκες μορφές αλλά και κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης μετατοπίζεται περισσότερο προς τις άγλυκες μορφές των φλαβονολών. Είναι αξιοσημείωτο ότι η ισορροπία μεταξύ των δύο μορφών προσεγγίζει και πάλι αναλογία συγκεντρώσεων 0.5.

9.3.4 Εξέλιξη ανθοκυανών

Η συγκέντρωση των ελεύθερων (μονομερών) ανθοκυανών συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης για το Αγιωργίτικο υπό τη τροποποιημένη ατμόσφαιρα αζώτου (N_2) δίνεται στο Διάγραμμα 9.12. Και στις δύο μεθόδους για την ποσοτικοποίηση χρησιμοποιείται η απορρόφηση στα 520 nm, ενώ η συγκέντρωση δίνεται εκφρασμένη σε ισοδύναμα mg/L 3-γλυκοζίτη της μαλβιδίνης (mv-3-glc eq.).



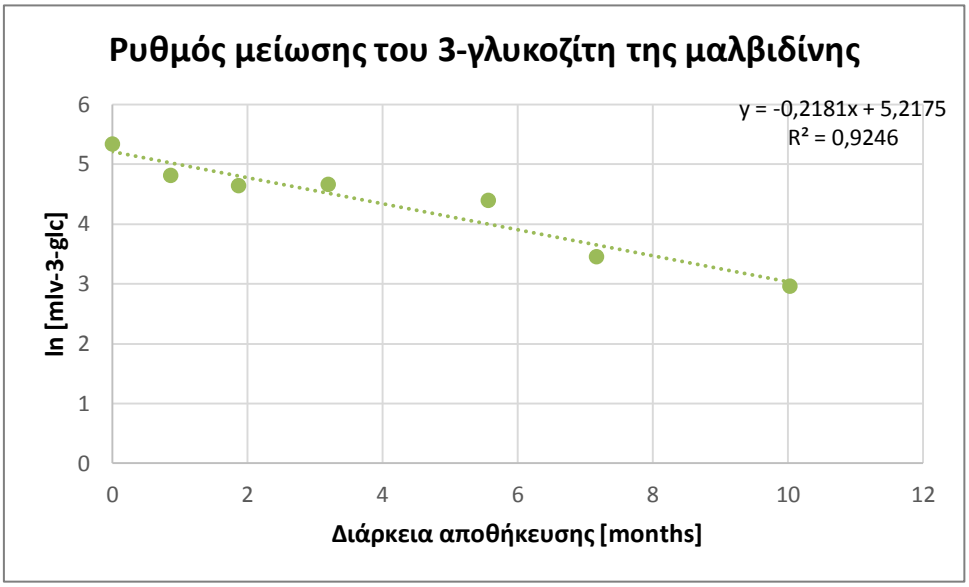
Διάγραμμα 9.12 Εξέλιξη συγκέντρωσης μονομερών ανθοκυανών σε ισοδύναμα 3-γλυκοζίτη της μαλβιδίνης (mv-3-glc eq.) με τη φωτομετρική και τη χρωματογραφική μέθοδο κατά την αποθήκευση κρασιού από την ποικιλία Αγιωργίτικο σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα N2

Και στην εξέλιξη των ανθοκυανών συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης παρατηρείται απόκλιση μεταξύ των δύο μεθόδων. Στην ανάλυση των ανθοκυανών οι αυξημένες συγκεντρώσεις που προσδιορίστηκαν με τη φωτομετρική μέθοδο είναι πιθανό να οφείλονται σε απορροφήσεις από ανθοκυάνες που δημιουργούν έγχρωμα σύμπλοκα (“copigments”) έχοντας διαφορετική απορρόφηση στα 520nm. Σύμφωνα με τον Boulton (2001), κατά τη χρωματογραφική ανάλυση τα έγχρωμα αυτά σύμπλοκα που οφείλονται σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις διασπώνται σε ένα βαθμό και άρα οι αντίστοιχες ανθοκυάνες τους μπορούν να ποσοτικοποιηθούν ως μονομερείς. Επομένως η χρωματογραφική μεθοδος μπορεί να δώσει πιο αξιόπιστα αποτελέσματα αναφορικά με τη συγκέντρωση των μονομερών ανθοκυανών.

Και με τις δύο μεθόδους, πάντως, παρατηρείται μεγάλη μείωση των ελεύθερων ανθοκυανών, ***58%*** και ***81%*** περίπου, ύστερα από 300 μέρες αποθήκευσης, για την φωτομετρική και τη χρωματογραφική μέθοδο αντίστοιχα. Παρά το γεγονός ότι στο χρονικό διάστημα αποθήκευσης που εξετάστηκε, οι ελεύθερες ανθοκυάνες μειώθηκαν σημαντικά ($p<0.05$), η συγκέντρωση των ολικών φαινολών δεν έδειξε σημαντικές μεταβολές. Επομένως η μείωση των ανθοκυανών μπορεί να αποδοθεί σε

αντιδράσεις πολυμερισμού τους με τα άλλα φαινολικά συστατικά του οίνου (π.χ. προκυανιδίνες, φλαβονόλες) και όχι σε αντιδράσεις οξείδωσης.

Στο Διάγραμμα 9.13 με βάση τα δεδομένα από τη χρωματογραφική μέθοδο (HPLC-DAD) υπολογίζεται ο ρυθμός μείωσης του 3-γλυκοζίτη της μαλβιδίνης. Η ένωση αυτή αποτελεί τη μονομερή ανθοκυάνη που βρίσκεται σε μεγαλύτερη αφθονία σε όλα τα κρασιά όπως και στο Αγιωργίτικο που εξετάζεται στη παρούσα εργασία.

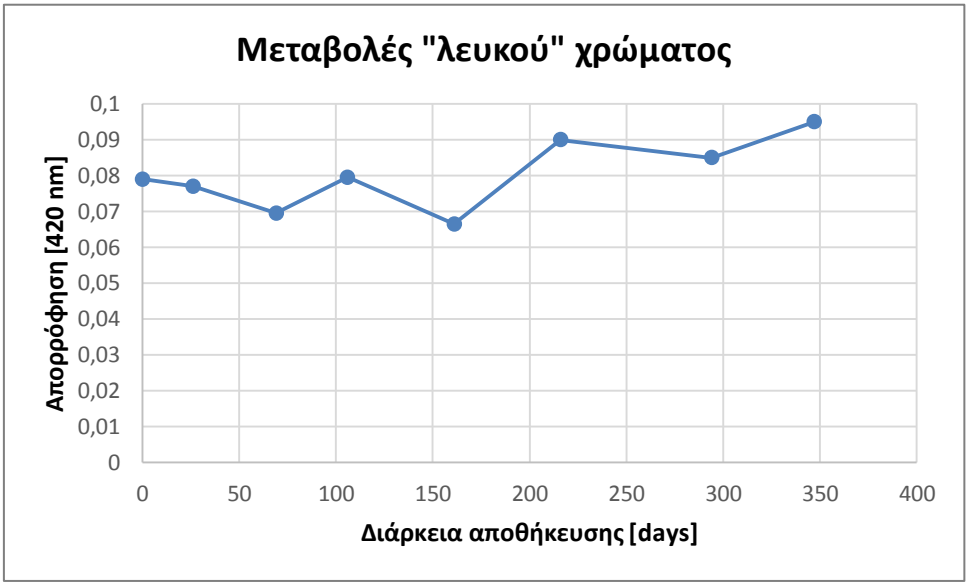


Διάγραμμα 9.13 Ρυθμός μείωσης 3-γλυκοζίτη της μαλβιδίνης- (mv-3-glc) κατά την αποθήκευση κρασιού από την ποικιλία Αγιωργίτικο σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα N_2 μέσω χρωματογραφικής ανάλυσης

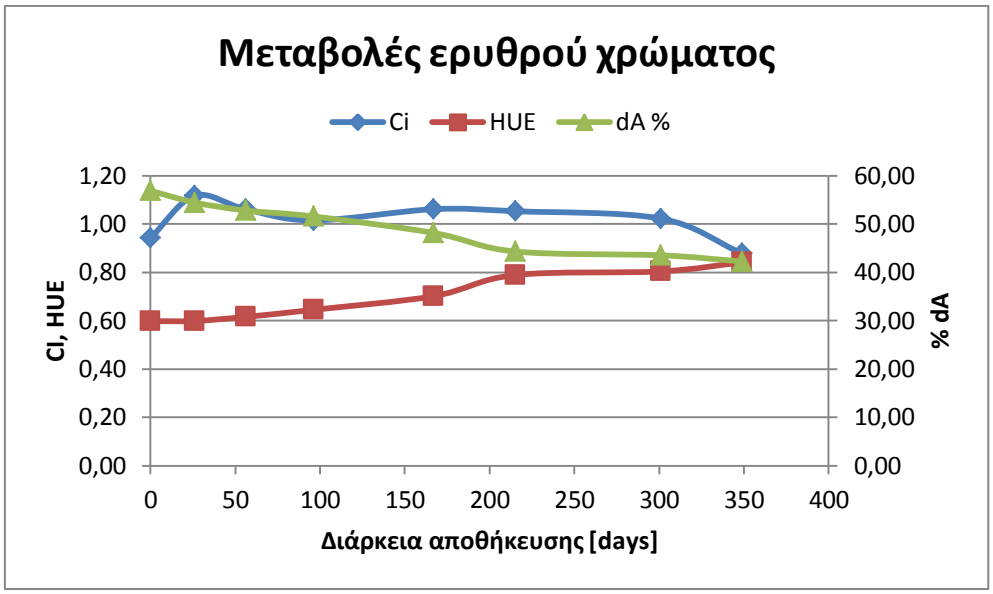
Στο Διάγραμμα 9.13 ο άξονας y αποτελείται από του λογαρίθμους της συγκέντρωσης του 3-γύκοζίτη της μαλβιδίνης. Παίρνοντας τη γραμμή τάσης για τα σημεία που προκύπτουν παρατηρείται ότι η μείωση των ανθοκυανών ακολουθεί κινητική $1^{ης}$ τάξης με ***ρυθμό k=-0.212 months***$^{-1}$ και ικανοποιητικό συντελεστή προσαρμογής $\boldsymbol{R^2=0.92}$. Σε επόμενο υποκεφάλαιο παρουσιάζονται αναλυτικά οι ρυθμοί μείωσης των συνόλων των ανθοκυανών για τις αντίστοιχες ατμόσφαιρες αποθήκευσης τους.

9.3.5 Εξέλιξη χρώματος

Στα λευκά κρασιά χρησιμοποιείται μόνο η απορρόφηση στα 420 nm (κίτρινη απόχρωση) για το χαρακτηρισμό του χρώματος. Στο Διάγραμμα 9.14 παρουσιάζεται η απορρόφηση στα 420 nm συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης για το Ασύρτικο. Στο Διάγραμμα 9.15 παρουσιάζεται η εξέλιξη των χρωματικών παραμέτρων του ερυθρού κρασιού. Η χρωματική ένταση (CI), η απόχρωση (HUE) και η λαμπρότητα (dA%) δίνονται για το κρασί από την ποικιλία Αγιωργίτικο συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης υπό τροποποιημένη ατμόσφαιρα αζώτου (N2).



Διάγραμμα 9.14 Απορρόφηση στα 420 nm κατά τη διάρκεια αποθήκευσης για το κρασί από την ποικιλία Ασύρτικο υπό τροποποιημένη ατμόσφαιρα N_2



Διάγραμμα 9.15 Εξέλιξη χρωματικών παραμέτρων CI, HUE και dA % κατά την αποθήκευση κρασιού από την ποικιλία Αγιωργίτικο σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα N_2

Για το χρώμα στο Ασύρτικο παρατηρείται ότι οι απορροφήσεις στα 420 nm εμφανίζουν μία αύξηση μετά τις 150 μέρες αποθήκευσης. Η αύξηση της απορρόφησης που ήταν ορατή και οπτικά κατά το άνοιγμα των δείγματων (πιο έντονο κίτρινο χρώμα ή ελαφρύ «καφέτιασμα») συμφωνεί με τα βιβλιογραφικά δεδομένα για την αποθήκευση λευκών κρασιών και μπορεί να αποδοθεί σε χημικές οξειδωτικές δράσεις που συμβαίνουν στο λευκό κρασί.

Στο χρώμα του ερυθρού κρασιού, προφανώς, όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή της χρωματικής έντασης (CI) τόσο πιο έντονο χρώμα έχει το κρασί. Παρατηρείται ότι μετά από μία απότομη αύξηση του δείκτη CI κατά την πρώτη δειγματοληψία, η χρωματική ένταση στη συνέχεια μειώνεται με την αύξηση του χρόνου αποθήκευσης, ειδικά μετά τις 300 μέρες αποθήκευσης. Η μείωση αυτή συμφωνεί με τα βιβλιογραφικά δεδομένα και μπορεί να αποδοθεί σε ένα βαθμό στη μείωση των ελεύθερων ανθοκυανών προς συμπλοκοποίηση ή πολυμερισμό τους (Dobrei et al., 2010). Αντίθετα, η αρχική αύξηση δε μπορεί να αποδοθεί σε απελευθέρωση μονομερών ανθοκυανών από το θειώδη ανυδρίτη αφού κάτι τέτοιο δε συμφωνεί με τα δεδομένα συγκεντρώσεων των ελεύθερων ανθοκυανών.

Όσων αφορά τη χρωματική παράμετρο HUE («απόχρωση»), η τελευταία αντιπροσωπεύει την εξέλιξη του χρώματος προς το πορτοκαλί. Όσο υψηλότερη είναι

η τιμή της, τόσο το χρώμα μεταβάλλεται από το κόκκινο προς το πορτοκαλί. Παρατηρείται μία σταθερή αύξηση της τιμής της από την αρχή κιόλας της αποθήκευσης που φτάνει περίπου το ***41%*** στο πέρας της αποθήκευσης σε σχέση με την αρχική τιμή. Η αύξηση αυτή συμφωνεί και πάλι με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (Dobrei et al., 2010), και αποτελεί κριτήριο «παλαίωσης» ενός ερυθρού κρασιού ενώ μπορεί να συσχετιστεί και με τη μείωση των ελεύθερων ανθοκυανών που δίνουν το κόκκινο χρώμα.

Τέλος, ο χρωματικός δείκτης dA%, σχετίζεται με το σχήμα του φάσματος και όσο υψηλότερη είναι η τιμή του, τόσο περισσότερο κυριαρχεί το κόκκινο χρώμα. Παρατηρείται μια σταθερή μείωση της τιμής dA% αντίθετα με την απόχρωση ίση περίπου με ***25%.***

9.4 Σύγκριση εξέλιξης φαινολικών κατά την αποθήκευση κρασιού υπό διαφορετικές τροποποιημένες ατμόσφαιρες

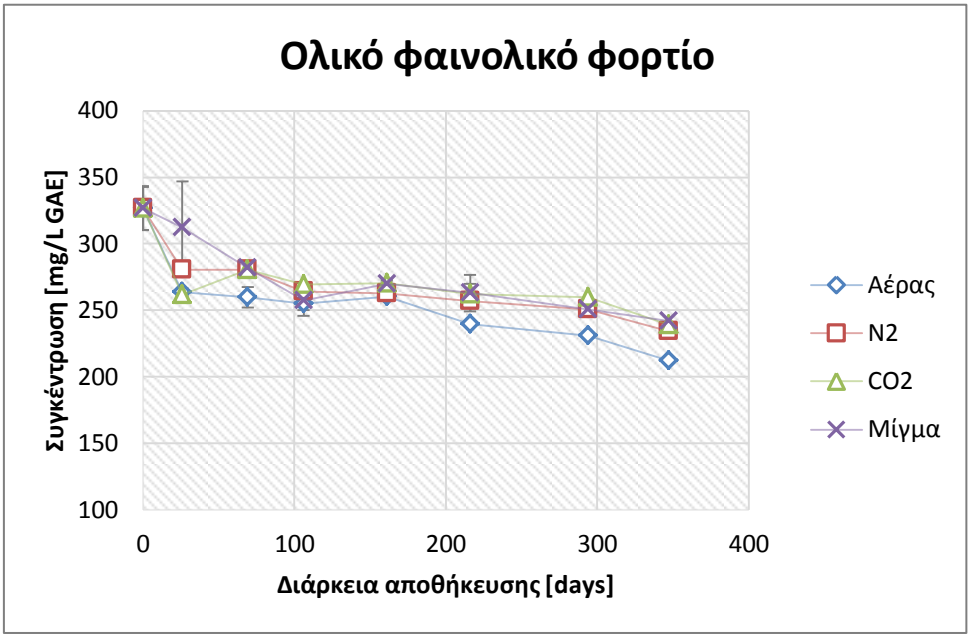
Τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν μέχρι τώρα αφορούσαν την εξέλιξη των ολικών και επιμέρους φαινολικών καθώς και των χρωματικών παραμέτρων συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης σε δείγματα που είχαν συσκευαστεί όλα υπό τροποποιημένη ατμόσφαιρα αζώτου (N_2). Στη συνέχεια, γίνεται μια προσπάθεια εκτίμησης της επίδρασης που μπορεί να έχει η τροποποιημένη ατμόσφαιρα στην εξέλιξη των φαινολικών συστατικών κατά τη διάρκεια αποθήκευσης τους. Για το λόγο αυτό συσκευάστηκαν με τον ίδιο τρόπο δείγματα και από τις δύο ποικιλίες (Ασύρτικο και Αγιωργίτικο) υπό τέσσσερις (4) διαφορετικές ατμόσφαιρες: Ατμόσφαιρα αζώτου (N_2), ατμόσφαιρα διοξειδίου του άνθρακα (CO_2), ατμόσφαιρα μίγματος αεριών αζώτου και διοξειδίου του άνθρακα σε αναλογία 50:50 (μίγμα) και ατμόσφαιρα λεπτού στρώματος ατμοσφαιρικού αέρα (αέρας).

Παρακάτω παρουσιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα για την εξέλιξη των ολικών φαινολικών συστατικών, των επιμέρους υπο-ομάδων τους (τρυγικοί εστέρες των κιναμωμικών οξέων, φλαβονόλες, ανθοκυάνες) και των χρωματικών παραμέτρων για τα δύο κρασιά από την ποικιλία Ασύρτικο και Αγιωργίτικο κατά τη διάρκεια αποθήκευσης τους υπό τις τέσσερις (4) διαφορετικές ατμόσφαιρες. Όλα τα αποτελέσματα προέκυψαν μετά από ανάλυση που πραγματοποιήθηκε με τη

χρωματογραφική μέθοδο με χρήση του συστήματος HPLC-DAD, με εξαίρεση το ολικό φαινολικό φορτίο που μετρήθηκε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu.

9.4.1 Ολικό φαινολικό φορτίο

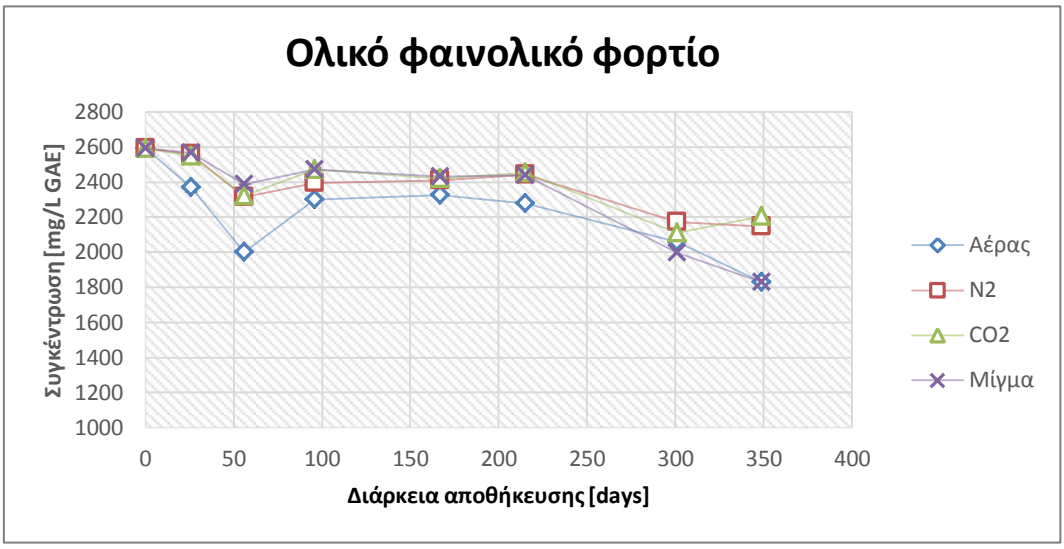
Το ολικό φαινολικό φορτίο για το Ασύρτικο συναρτήσει του χρόνου για τις τέσσερις (4) διαφορετικές ατμόσφαιρες αποθήκευσης παρουσιάζεται στο διάγραμμα 9.16.



Διάγραμμα 9.16 Εξέλιξη συγκέντρωσης ολικών φαινολικών συστατικών σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος [GAE] κατά την αποθήκευση κρασιού από την ποικιλία Ασύρτικο υπό διαφορετικές ατμόσφαιρες αέρα, αζώτου (N_2), διοξειδίου του άνθρακα (CO_2) και μίγματος αζώτου-διοξειδίου του άνθρακα σε αναλογία 50:50 μέσω χρωματογραφικής ανάλυσης

Στο διάγραμμα 9.16 για το Ασύρτικο, παρατηρείται μια τάση για μείωση της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης σε όλες τις ατμόσφαιρες αποθήκευσης. Ενώ οι τρεις τροποποιημένες ατμόσφαιρες (N_2,CO_2 και μίγμα) εμφανίζουν κάποιες διαφορές στο ρυθμό μείωσης του ολικού φαινολικού φορτίου ιδιαίτερα πριν τις 100 πρώτες μέρες, όσο αυξανόταν ο χρόνος αποθήκευσης οι διαφορές αυτές αμβλύνονταν. Η αρχική συγκέντρωση του φρέσκου Ασύρτικου ακριβώς πριν τη συσκευασία ίση με ***326.7 ± 16.6 mg/L GAE*** μετά από σχεδόν ένα χρόνο παλαίωσης (347 μέρες) μειώθηκε σε ***234 ± 4, 239 ± 5*** και ***242 ±3 mg/L GAE*** για τις ατμόσφαιρες αζώτου, διοξειδίου του άνθρακα και μίγματος αντίστοιχα. Οι αντίστοιχες ποσοστιαίες μειώσεις ήταν **28.3%, *26.8%*** και ***25.9%***. Αντίθετα, η

ατμόσφαιρα με το λεπτό στρώμα ατμοσφαιρικού αέρα παρουσίασε μεγαλύτερη μείωση του ολικού φαινολικού φορτίου στα ***212±1 mg/L GAE*** που αντιστοιχεί σε ***35.1%*** μείωση από την αρχική συγκέντρωση. Η διαφορά αυτή υποδηλώνει την εκδήλωση πιο έντονων οξειδωτικών φαινομένων στο λευκό κρασί χωρίς τη χρήση ατμόσφαιρας αδρανούς αερίου, κάτι που είναι λογικό λόγω της μεγαλύτερης περιεκτικότητας του οξυγόνου τόσο στην υπερκείμενη αέρια φάση όσο και στο στο διάλυμα του κρασιού.



Διάγραμμα 9.17 Εξέλιξη συγκέντρωσης ολικών φαινολικών συστατικών σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος [GAE] κατά την αποθήκευση κρασιού από την ποικιλία Αγιωργίτικο υπό διαφορετικές ατμόσφαιρες αέρα, αζώτου (N_2), διοξειδίου του άνθρακα (CO_2) και μίγματος αζώτου-διοξειδίου του άνθρακα σε αναλογία 50:50 μέσω χρωματογραφικής ανάλυσης

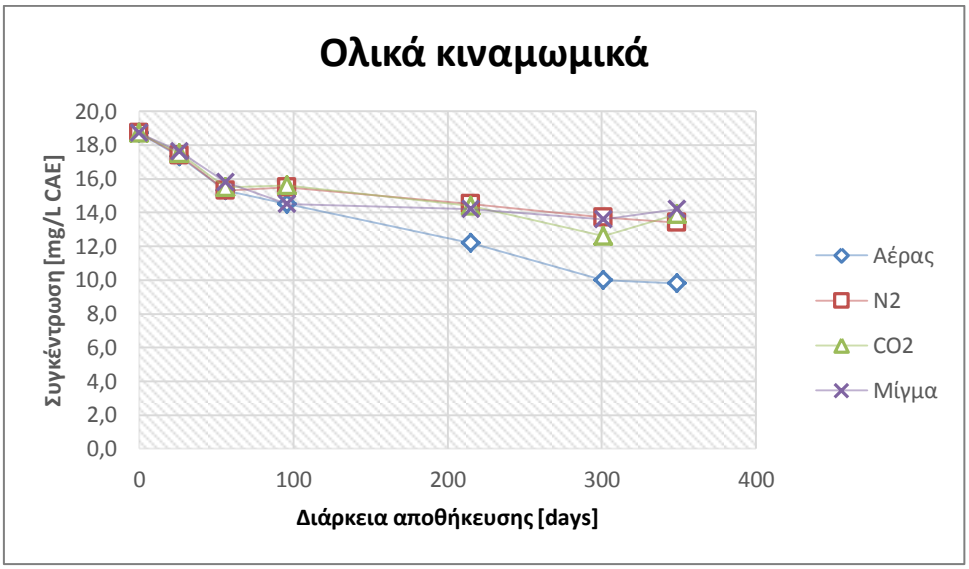
Στα κρασιά από την ποικιλία Αγιωργίτικο παρατηρείται επίσης μια τάση μείωσης του ολικού φαινολικού φορτίου σε όλες τις ατμόσφαιρες αποθήκευσης. Οι ατμόσφαιρες αζώτου και διοξειδίου του άνθρακα δεν παρουσιάζουν στατιστικές διαφορές μεταξύ τους καθ'όλη τη διάρκεια της αποθήκευσης, με την μείωση των ολικών φαινολικών να είναι περίπου ίση με **16%** στο τέλος της αποθήκευσης σε σχέση με το ολικό φαινολικό φορτίου του φρέσκου κρασιού. Από τα ***2592± 36 mg/L GAE*** η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών μειώνεται στα ***2146 ± 180 mg/L GAE*** και ***2204 + 110 mg/L GAE*** για τις ατμόσφαιρες αζώτου και διοξειδίου του άνθρακα αντίστοιχα μετά από 349 μέρες αποθήκευσης**.** Αντίθετα, η ατμόσφαιρα του μίγματος ενώ αρχικά εμφάνιζε παρόμοια συμπεριφορά με τις δύο άλλες τροποποιημένες

ατμόσφαιρες, μετά τις 215 μέρες αποθήκευσης εμφανίζει μια απότομη μείωση, με αποτέλεσμα η συνολική μείωση της συγκέντρωσης να είναι παραπλήσια με την αντίστοιχη της ατμόσφαιρας με το λεπτό στρώμα ατμοσφαιρικού αέρα, η οποία είχε εμφανίσει μειωμένο φαινολικό φορτίο σε σχέση με τις άλλες τρεις ατμόσφαιρες από τις πρώτες κιόλας μέρες αποθήκευσης. Οι τελικές συγκεντρώσεις ολικών φαινολικών μετά από 349 μέρες αποθήκευσης ήταν ***1826±46 mg/L 1839±86 mg/L*** του αέρα και του μίγματος αντίστοιχα, μείωση που αντιστοιχεί περίπου σε 29% επί της αρχικής συγκέντρωσης και στις δύο περιπτώσεις.

Με εξαίρεση την ατμόσφαιρα του μίγματος και τη μεγάλη μείωση στη συγκέντρωση που παρουσίασε προς το τέλος της αποθήκευσης, σε όλες τις άλλες περιπτώσεις η μείωση του ολικού φαινολικού φορτίου σε απόλυτες τιμές ήταν μεγαλύτερη στο Ασύρτικο από το Αγιωργίτικο για κάθε ατμόσφαιρα παλαίωσης κάτι που εξηγείται από το μεγαλύτερο φαινολικό φορτίο του ερυθρού Αγιωργίτικου και την αυξημένη επαφή των φαινολών του με το οξυγόνο προς οξειδωτικές δράσεις.

9.4.2 Φαινολικά οξέα

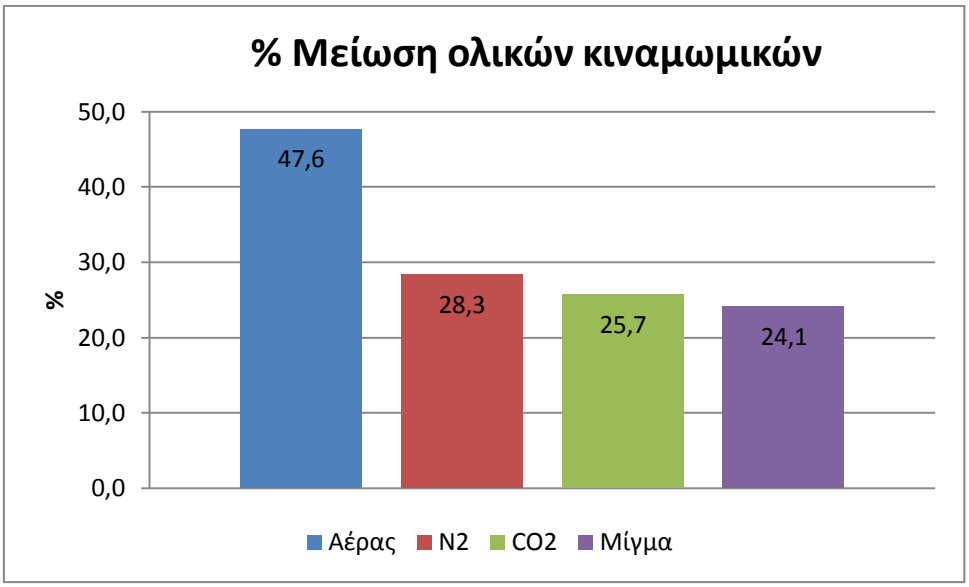
Στο Διάγραμμα 9.18 παρουσιάζεται η μεταβολή των συγκεντρώσεων ολικών κιναμωμικών (τρυγικών εστέρων και κιναμωμικών οξέων) συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης των δειγμάτων κρασιού από την ποικιλία Ασύρτικο για τις τέσσερις (4) ατμόσφαιρες αποθήκευσης.



Διάγραμμα 9.18 Εξέλιξη συγκέντρωσης ολικών κιναμωμικών σε ισοδύναμα καφεϊκού οξέος [CAE] κατά την αποθήκευση κρασιού από την ποικιλία Ασύρτικο υπό διαφορετικές ατμόσφαιρες αέρα, αζώτου (N_2), διοξειδίου του άνθρακα (CO_2) και μίγματος αζώτου-διοξειδίου του άνθρακα σε αναλογία 50:50 μέσω χρωματογραφικής ανάλυσης

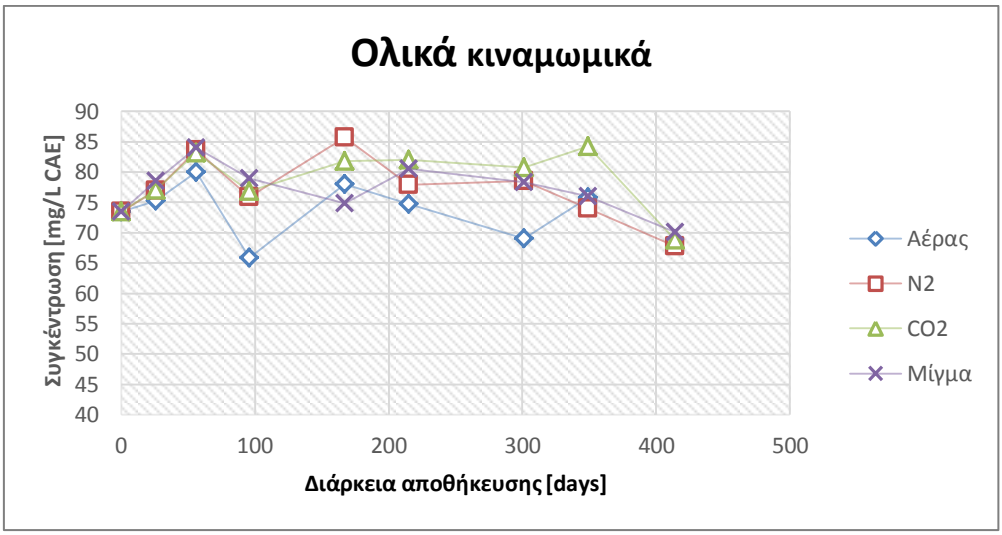
Παρατηρώντας το Διάγραμμα 9.18, είναι φανερό πως οι τρεις (3) τροποποιημένες ατμόσφαιρες παρουσιάζουν όμοια συμπεριφορά κατά την αποθήκευση του Ασύρτικου. Συγκεκριμένα, εμφανίζεται μια μικρή τάση μείωσης των ολικών κιναμωμικών συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης για τις τρεις (3) τροποποιημένες ατμόσφαιρες αζώτου, διοξειδίου του άνθρακα και του μίγματος αερίων. Αντίθετα, η ατμόσφαιρα λεπτού στρώματος ατμοσφαιρικού αέρα, ειδικά μετά τις 100 μέρες αποθήκευσης εμφανίζει μεγαλύτερο ρυθμό μείωσης των ολικών κιναμωμικών σε σχέση με τις άλλες τρεις ατμόσφαιρες.

Η διαφορά αυτή γίνεται εμφανής στο Διάγραμμα 9.19 όπου παρουσιάζεται η ποσοστιαία μείωση των ολικών κιναμωμικών συστατικών (τρυγικοί εστέρες των κιναμωμικών και κιναμωμικά οξέα), μετά από 349 μέρες αποθήκευσης των συσκευασμένων δειγμάτων για τις διαφορετικές ατμόσφαιρες που μελετήθηκαν. Και η μεγάλη μείωση της συγκέντρωσης των ολικών κιναμωμικών στην ατμόσφαιρα του λεπτού στρώματος αέρα μπορεί να αποδοθεί στη μικρή προστασία που έχει το λευκό κρασί σε οξειδωτικές δράσεις λόγω του χαμηλού φαινολικού φορτίου του.



Διάγραμμα 9.19 Ποσοστιαία μείωση συγκέντρωσης ολικών κιναμωμικών κατά την αποθήκευση κρασιού από την ποικιλία Ασύρτικο σε ατμόσφαιρες αέρα, αζώτου (N_2), διοξειδίου του άνθρακα (CO_2) και μίγματος αζώτου-διοξειδίου του άνθρακα σε αναλογία 50:50

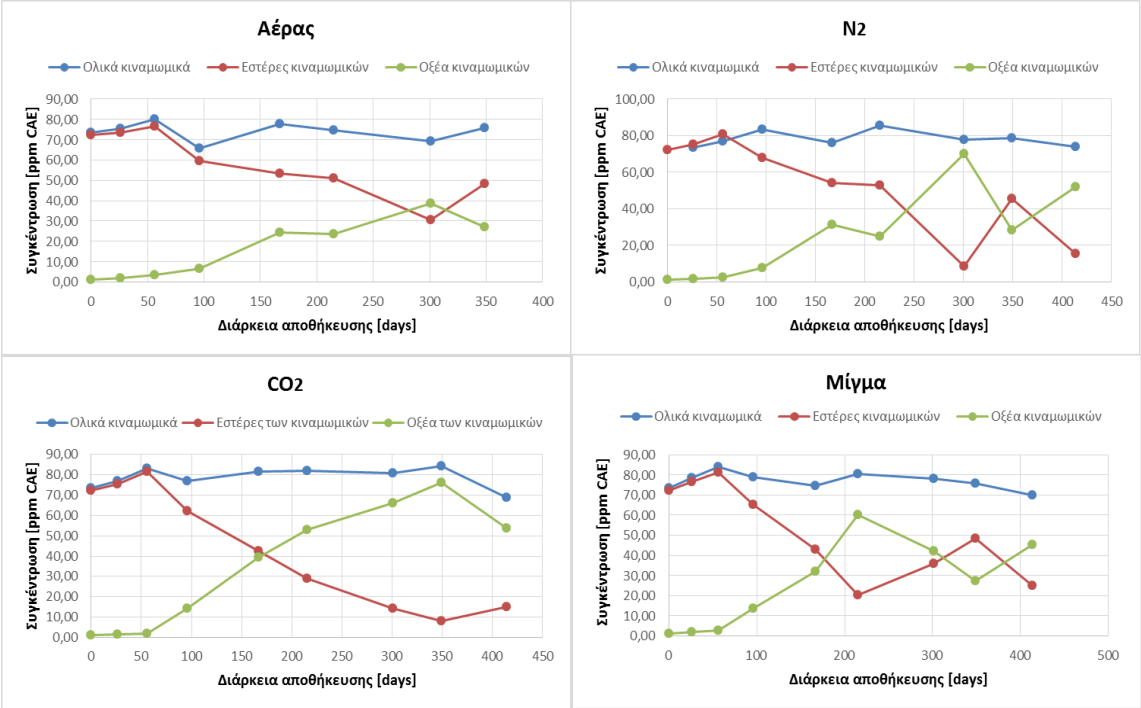
Στο Διάγραμμα 9.20 παρουσιάζονται οι μεταβολές των συγκεντρώσεων ολικών κιναμωμικών συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης για τις τέσσερις διαφορετικές ατμόσφαιρες αποθήκευσης του κρασιού από την ποικιλία Αγιωργίτικο.



Διάγραμμα 9.20 Ποσοστιαία μείωση συγκέντρωσης ολικών κιναμωμικών κατά την αποθήκευση κρασιού από την ποικιλία Ασύρτικο σε ατμόσφαιρες αέρα, αζώτου (N_2), διοξειδίου του άνθρακα (CO_2) και μίγματος αζώτου-διοξειδίου του άνθρακα σε αναλογία 50:50

Στην αποθήκευση του Αγιωργίτικου δεν παρατηρούνται διαφορές ούτε στις μεταβολές των συγκεντρώσεων συναρτήσει του χρόνου μεταξύ των διαφορετικών ατμοσφαιρών αποθήκευσης αλλά ούτε και σημαντική μείωση των ολικών κιναμωμικών κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, τουλάχιστον μέχρι τις 350 μέρες αποθήκευσης. Το υψηλό φαινολικό φορτίο του ερυθρού κρασιού φαίνεται ότι προστατεύει ακόμα και την ατμόσφαιρα του αέρα που περιέχει οξυγόνο από οξειδωτικές δράσεις.

Στη συνέχεια, στο Διάγραμμα 9.21 παρουσιάζεται η εξέλιξη των επιμέρους συγκεντρώσεων των τρυγικών εστέρων και των κιναμωμικών οξέων συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης για την κάθε μια διαφορετική ατμόσφαιρα αποθήκευσης ξεχωριστά.



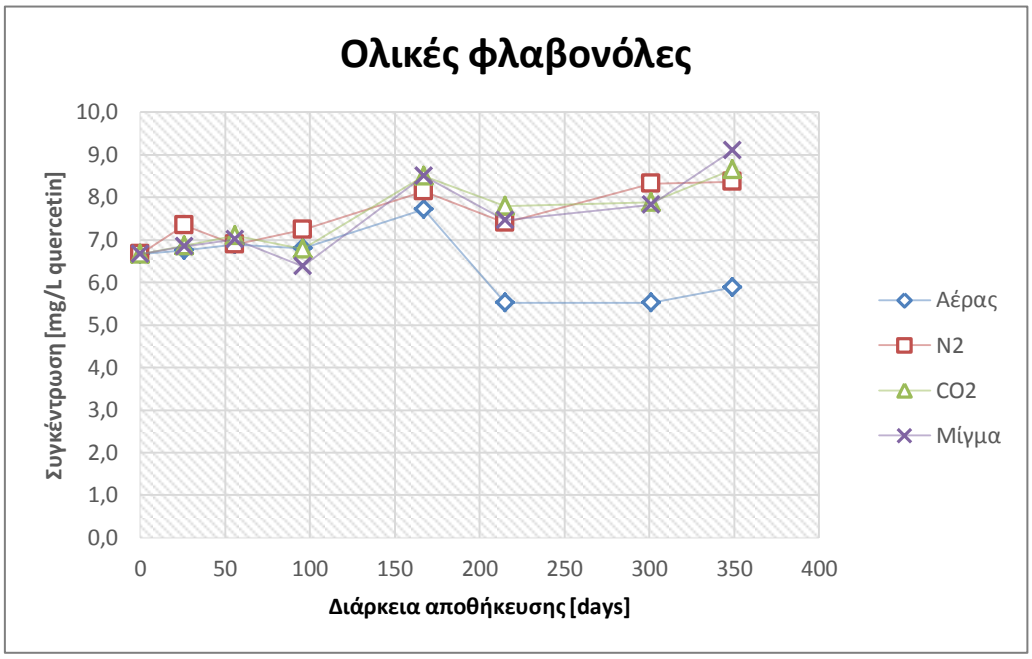
Διάγραμμα 9.21 Εξέλιξη επιμέρους συγκεντρώσεων τρυγικών εστέρων και κιναμωμικών οξέων κατά την αποθήκευση κρασιού από την ποικιλία Αγιωργίτικο στις τέσσερις (4) διαφορετικές ατμόσφαιρες αέρα, αζώτου (N_2), διοξειδίου του άνθρακα (CO_2) και μίγματος αζώτου-διοξειδίου του άνθρακα σε αναλογία 50:50 μέσω χρωματογραφικής ανάλυσης

Παρατηρώντας το διάγραμμα 9.21 προκύπτει ότι κατά την αποθήκευση των δειγμάτων του Αγιωργίτικου, σε όλες τις ατμόσφαιρες αποθήκευσης, μετά τις 50 μέρες αποθήκευσης η ισορροπία μετατοπίζεται προς την υδρόλυση των τρυγικών εστέρων σε κιναμωμικά οξέα. Το αξιοσημείωτο είναι ότι ενώ στις ατμόσφαιρες αέρα, αζώτου και του μίγματος η αναλογία των συγκεντρώσεων εστέρων-οξέων φαίνεται να διακυμαίνεται γύρω από μια σταθερή τιμή σχετικά κοντά στο 0.5, στην ατμόσφαιρα του διοξειδίου του άνθρακα φαίνεται ότι η ισορροπία είναι περισσότερο μετατοπισμένη προς την υδρόλυση των εστέρων με τη σχετική αναλογία των δύο συγκεντρώσεων να παραμένει μικρότερη από 0.3.

9.4.3 Φλαβονόλες

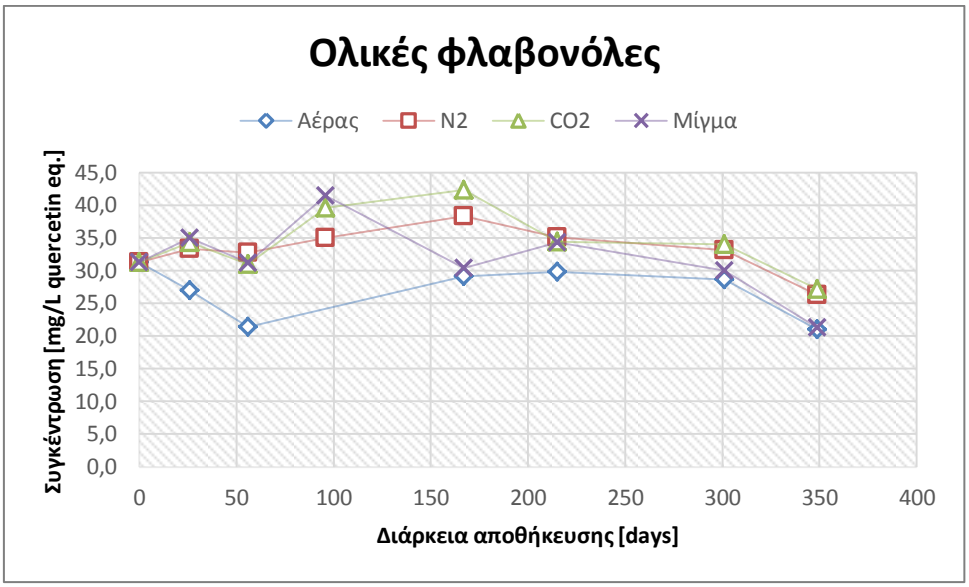
Στα Διαγράμματα 9.22 και 9.23 παρουσιάζεται η μεταβολή της συγκέντρωσης των ολικών φλαβονολών συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης για τις τέσσερις

διαφορετικές ατμόσφαιρες αποθήκευσης των δειγμάτων κρασιού από την ποικιλία Ασύρτικο και Αγιωργίτικο αντίστοιχα.



Διάγραμμα 9.22 Εξέλιξη συγκέντρωσης ολικών φλαβονολών σε ισοδύναμα κερκετίνης κατά την αποθήκευση κρασιού από την ποικιλία Ασύρτικο υπό διαφορετικές ατμόσφαιρες αέρα, αζώτου (N_2), διοξειδίου του άνθρακα (CO_2) και μίγματος αζώτου-διοξειδίου του άνθρακα σε αναλογία 50:50 μέσω χρωματογραφικής ανάλυσης

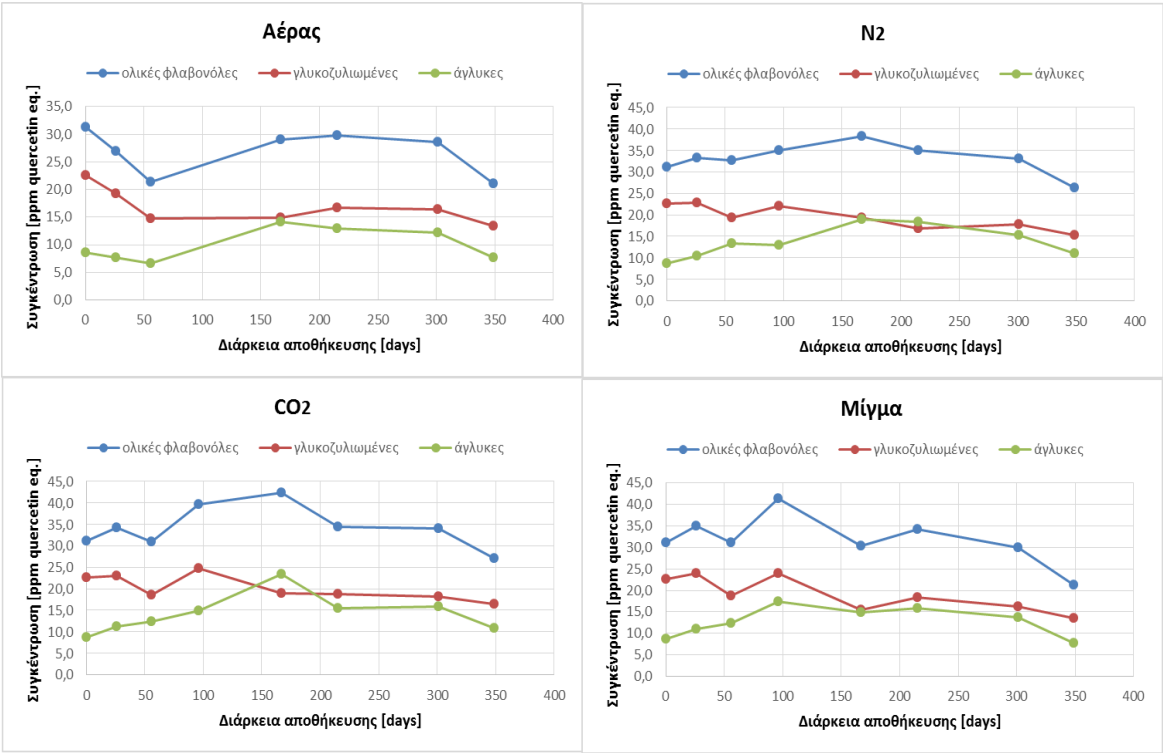
Επειδή σε όλες τις περιπτώσεις οι συγκεντρώσεις των ολικών φλαβονολών είναι πολύ μικρές (κάτω από ***10 mg/L Q. eq***) δεν είναι δυνατή η εξαγωγή αξιόπιστων παρατηρήσεων σε σχέση με τις μεταβολές των συγκεντρώσεων των φλαβονολών.



Διάγραμμα 9.23 Εξέλιξη συγκέντρωσης ολικών φλαβονολών σε ισοδύναμα κερκετίνης κατά την αποθήκευση κρασιού από την ποικιλία Αγιωργίτικο υπό διαφορετικές ατμόσφαιρες αέρα, αζώτου (N_2), διοξειδίου του άνθρακα (CO_2) και μίγματος αζώτου-διοξειδίου του άνθρακα σε αναλογία 50:50 μέσω χρωματογραφικής ανάλυσης

Στο Αγιωργίτικο, μέχρι τις 300 μέρες αποθήκευσης δεν παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσης των ολικών φλαβονολών σε καμία ατμόσφαιρα αποθήκευσης Η συμπεριφορά αυτή μπορεί να αποδοθεί και πάλι στο υψηλό φαινολικό περιεχόμενο του ερυθρού κρασιού που δεν επιτρέπει την εμφάνιση χημικών οξειδωτικών φαινομένων στις φλαβονόλες. Από τα φαινολικά συστατικά του κρασιού οι φλαβονόλες αποτελούν τις λιγότερο ευοξείδωτες ενώσεις.

Οι επιμέρους συγκεντρώσεις των γλυκοζυλιωμένων φλαβονολών καθώς και των υδρολυμένων άγλυκων μορφών τους συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης για το Αγιωργίτικο παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 9.24, για κάθε ατμόσφαιρες αποθήκευσης ξεχωριστά.



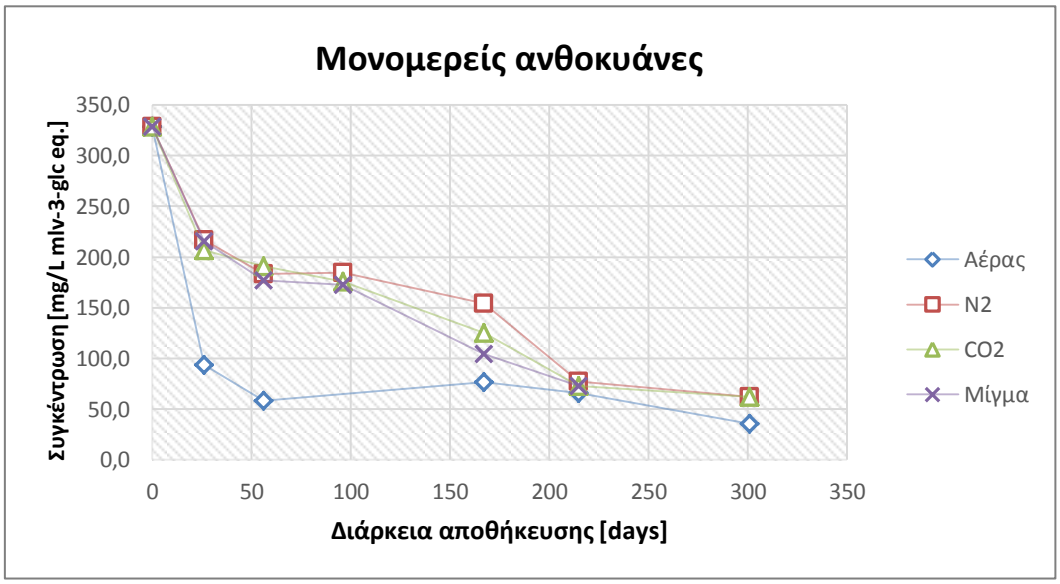
Διάγραμμα 9.24 Εξέλιξη συγκέντρωσης επιμέρους υποομάδων φλαβονολών (γλυκοζυλιωμένων και άγλυκων) σε ισοδύναμα κερκετίνης κατά την αποθήκευση κρασιού από την ποικιλία Αγιωργίτικο στις τέσσερις (4) διαφορετικές ατμόσφαιρες αέρα, αζώτου (N_2), διοξειδίου του άνθρακα (CO_2) και μίγματος αζώτου-διοξειδίου του άνθρακα σε αναλογία 50:50 μέσω χρωματογραφικής ανάλυσης

Οι επιμέρους συγκεντρώσεις γλυκοζυλιωμένων και άγλυκων φλαβονολών παρουσιάζουν παρόμοια συμπεριφορά και στις τέσσερις ατμόσφαιρες αποθήκευσης. Οι γλυκοζυλιωμένες φλαβονόλες που αρχικά εμφανίζονται σε υπερδιπλάσια συγκέντρωση από τις αντίστοιχες άγλυκες μορφές υδρολύονται σταδιακά μέχρι οι συγκεντρώσεις τους να μειωθούν και να γίνουν περίπου ίσες με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις των άγλυκων φλαβονολών σε όλες τις ατμόσφαιρες αποθήκευσης.

9.4.4 Ανθοκυάνες

Οι ελεύθερες ανθοκυάνες εμφανίζουν τον μεγαλύτερο ρυθμό μείωσης από τις φαινολικές ομάδες που εξετάστηκαν με αποτέλεσμα η συμπεριφορά τους υπό τις διαφορετικές ατμόσφαιρες αποθήκευσης να αποκτά ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Στο Διάγραμμα 9.25 παρουσιάζεται η μεταβολή της συγκέντρωσης ελεύθερων

(μονομερών) ανθοκυανών συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης για τις τέσσερις (4) διαφορετικές ατμόσφαιρες αποθήκευσης στο Αγιωργίτκο.



Διάγραμμα 9.25 Εξέλιξη συγκέντρωσης μονομερών ανθοκυανών σε ισοδύναμα μαλβιδίνης-3-γλυκοζίτη κατά την αποθήκευση κρασιού από την ποικιλία Αγιωργίτικο υπό διαφορετικές ατμόσφαιρες αέρα, αζώτου (N_2), διοξειδίου του άνθρακα (CO_2) και μίγματος αζώτου-διοξειδίου του άνθρακα σε αναλογία 50:50 μέσω χρωματογραφικής ανάλυσης

Παρατηρώντας το Διάγραμμα 9.25 φαίνεται ότι στην ατμόσφαιρα αποθήκευσης με το στρώμα αέρα η εξάντληση των ελεύθερων ανθοκυανών ολοκληρώνεται ήδη μετά από 50 μέρες αποθήκευσης. Αντίθετα, ο ρυθμός μείωσης των ελευθερων ανθοκυανών στις τρεις (3) τροποποιημένες ατμόσφαιρες ακολουθεί παρόμοια συμπεριφορά με σταδιακή μείωση μέχρι τις 300 μέρες αποθήκευσης. Η μείωση αυτή των ελεύθερων ανθοκυανών σε όλες τις ατμόσφαιρες αποθήκευσης δεν μπορεί να αποδοθεί σε οξειδωτικά φαινόμενα αφού δεν παρατηρήθηκε ανάλογη μείωση στη συγκέντρωση των ολικών φαινολικών. Όπως αναφέρεται και στη διεθνή βιβλιογραφία, η μείωση αυτή οφείλεται σε αντιδράσεις πολυμερισμού και σε συμπλοκοποιήσεις των ελεύθερων ανθοκυανών (Cheynier, 2006).

Για να μελετηθεί αναλυτικότερα η δέσμευση των μονομερών ανθοκυανών υπολογίστηκαν οι ρυθμοί μείωσης των ελεύθερων ανθοκυανών και των επιμέρους

μορφών τους (γλυκοζίτες, ακετυλιωμένοι γλυκοζίτες, κουμαριλιωμένοι γλυκοζίτες) για τις τέσσερις (4) ατμόσφαιρες αποθήκευσης και παρουσιάζονται στον Πίνακα 9.6:

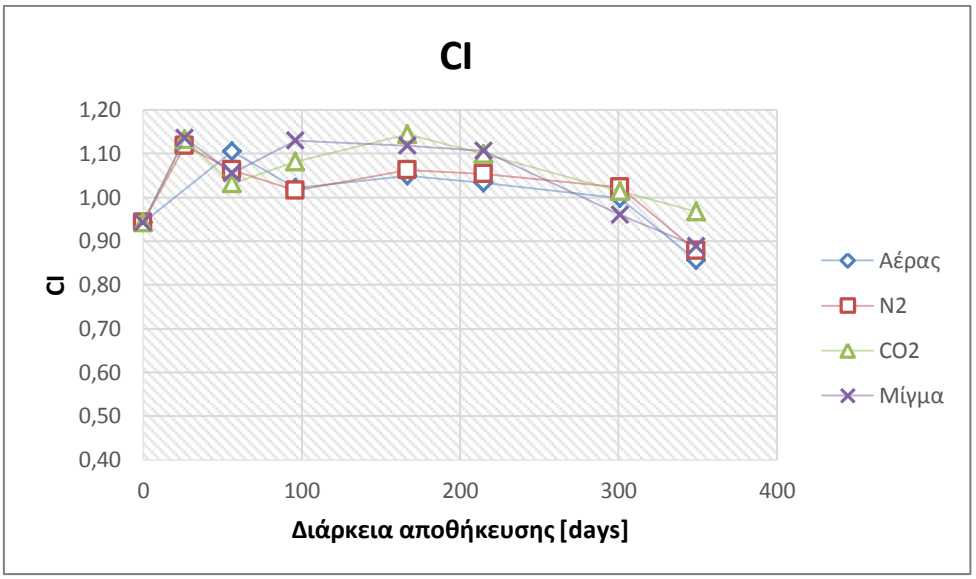
	Αέρας		CO_2		N_2		Μίγμα	
	k [days^{-1}]	***R^2***	***k [days^{-1}]***	***R^2***	***k [days^{-1}]***	***R^2***	***k [days^{-1}]***	***R^2***
Ολικές ανθοκυάνες	**-0.0305**	0.9145	**-0.0053**	0.9444	**-0.0051**	0.9185	**-0.0062**	0.9575
γλυκοζίτες των ανθοκυανών	**-0.0342**	0.8899	**-0.0057**	0.9447	**-0.0055**	0.9199	**-0.0066**	0.952
ακετυλιωμένοι γλυκοζίτες	**-0.012**	0.9965	**-0.0051**	0.9302	**-0.0500**	0.9116	**-0.0054**	0.9008
κουμαριλιωμένοι γλυκοζίτες	**-0.0335**	0.9765	**-0.0040**	0.9059	**-0.0039**	0.8909	**-0.0053**	0.9494

Πίνακας 9.6 Ρυθμοί μείωσης και συντελεστές συσχέτισης ελεύθερων (μονομερών) ανθοκυανών (σε μέρες^{-1}), για τους γλυκοζίτε, τους ακετυλιωμένους γλυκοζίτες, τους κουμαριλιωμένους γλυκοζίτες και για τις ολικές ελεύθερες ανθοκυάνες υπό τις ατμόσφαιρες αποθήκευσης λεπτού στρώματος αέρα, αζώτου (N_2), διοξειδίου του άνθρακα (CO_2) και μίγματος αζώτου-διοξειδίου

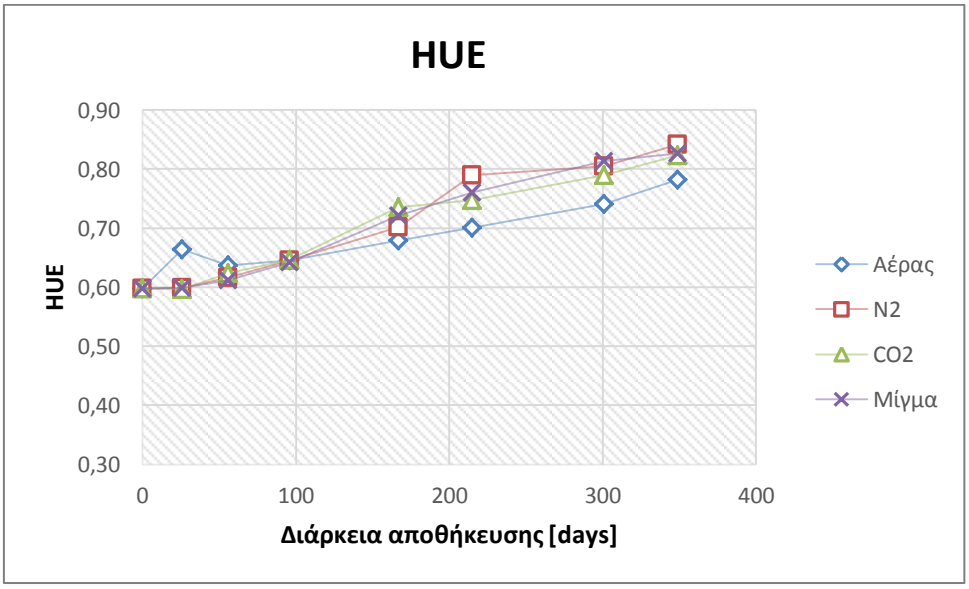
Από την σύγκριση των σταθερών k προκύπτει ότι ο μεγαλύτερος ρυθμός μείωσης των ελεύθερων ανθοκυανών αλλά και κάθε υπό-ομάδας εντοπίζεται στην ατμόσφαιρα του λεπτού στρώματος ατμοσφαιρικού αέρα. Οι ατμόσφαιρες αζώτου, διοξειδίου του άνθρακα και μίγματος αερίου δεν φαίνεται να εμφανίζουν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους.Ακόμα, ενώ στις τρεις τροποποιημένες ατμόσφαιρες οι κουμαριλιωμένοι γλυκοζίτες των ανθοκυανών εμφανίζουν τον μικρότερο ρυθμό μείωσης από τις επιμέρους μορφές των ανθοκυανών, στην ατμόσφαιρα του αέρα έχουν τον ίδιο ρυθμό μείωσης με τους απλούς γλυκοζίτες, που είναι σημαντικά μεγαλύτερος από τους ακετυλιωμένους γλυκοζίτες.

9.4.5 Χρώμα

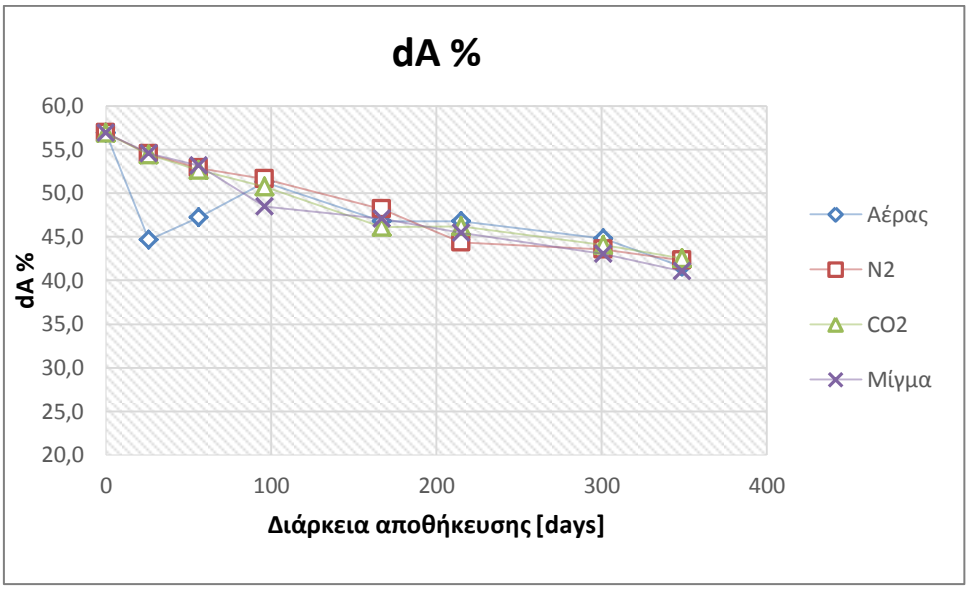
Στα Διαγράμματα 9.26, 9.27 και 9.28 παρουσιάζονται για το κρασί από την ποικιλία Αγιωργίτκο, οι χρωματικές παράμετροι: χρωματική ένταση (CI), “απόχρωση” (HUE) και “λαμπρότητα” αντίστοιχα συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης για τις τέσσερις (4) διαφορετικές ατμόσφαιρες αποθήκευσης.



Διάγραμμα 9.26 Εξέλιξη χρωματικής έντασης (CI) κατά την αποθήκευση κρασιού από την ποικιλία Αγιωργίτικο υπό διαφορετικές ατμόσφαιρες αέρα, αζώτου (N_2), διοξειδίου του άνθρακα (CO_2) και μίγματος αζώτου-διοξειδίου του άνθρακα σε αναλογία 50:50



Διάγραμμα 9.27 Εξέλιξη χρωματικής παραμέτρου HUE (απόχρωση) κατά την αποθήκευση κρασιού από την ποικιλία Αγιωργίτικο υπό διαφορετικές ατμόσφαιρες αέρα, αζώτου (N_2), διοξειδίου του άνθρακα (CO_2) και μίγματος αζώτου-διοξειδίου του άνθρακα σε αναλογία 50:50



Διάγραμμα 9.28 Εξέλιξη χρωματικής παραμέτρου dA% (λαμπρότητα) κατά την αποθήκευση κρασιού από την ποικιλία Αγιωργίτικο υπό διαφορετικές ατμόσφαιρες αέρα, αζώτου (N_2), διοξειδίου του άνθρακα (CO_2) και μίγματος αζώτου-διοξειδίου του άνθρακα σε αναλογία 50:50

Εξετάζοντας τα Διαγράμματα 9.26-9.28 παρατηρείται ότι όλες οι ατμόσφαιρες αποθήκευσης παρουσιάζουν παρόμοια συμπεριφορά αναφορικά με τις χρωματικές παραμέτρους συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης. Σε όλες τις περιπτώσεις η χρωματική ένταση (CI) και η λαμπρότητα (dA%) μειώνονται με αύξηση της διάρκειας αποθήκευσης ενώ η απόχρωση (HUE) αυξάνεται σταδιακά. Η ατμόσφαιρα διοξειδίου του άνθρακα φαίνεται να διατηρεί καλύτερα τη χρωματική ένταση (CI) του ερυθρού κρασιού για διάρκεια αποθήκευσης ενός χρόνου (349 μέρες) σε σχέση με τις άλλες ατμόσφαιρες αποθήκευσης ενώ η ατμόσφαιρα του αέρα παρουσιάζει το μικρότερο ρυθμό αύξησης της παραμέτρου HUE.

10 Συμπεράσματα

Η μελέτη της εκχύλισης των φαινολικών συστατικών του κρασιού κατά τη διάρκεια της οινοποίησης, έδειξε ότι ανθοκυάνες, κινναμωμικά παράγωγα και γλυκοζίτες των φλαβονολών εκχυλίζονται άμεσα από τις πρώτες κιόλας ημέρες τις οινοποίησης. Αντίθετα η εκχύλιση των φλαβ-3-ολών εμφανίζει μια φάση υστέρησης, η οποία οφείλεται στην μεγαλύτερη διαλυτότητα αυτών των μορίων σε αιθανολικά διαλύματα καθώς και στο ότι ευρίσκονται ως επί το πλείστον στα γίγαρτα από όπου η εκχύλιση είναι σχετικά πιο αργή σε σχέση με τα συστατικά των εξωτερικών στρωμάτων του φλοιού.

Κατά τη διάρκεια της διεργασίας της κρυοεκχύλισης αυξημένο ρυθμό παρουσίασαν τα πιο πολικά και υδατοδιαλυτά φαινολικά συστατικά, ενώ η εκχύλιση των φλαβαν-3-ολών σχεδόν αναστέλλεται.

Η μελέτη του φαινολικού προφίλ 5 ελληνικών κρασιών με χρήση HPLC-DAD-ESI-MS/MS επέτρεψε την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση περισσοτέρων από 20 φαινολικών μορίων. Τα φαινολικά αυτά μόρια ανήκουν στις ομάδες των φαινολικών οξέων (κουταρικό & καφταρικό οξύ), φλαβονολών (κερκετίνη, μυρικετίνη), φλαβαν-3-ολών (κατεχίνη) και ανθοκυανών (μαλβιδίνη).

Για τα μελετώμενα ερυθρά κρασιά, ο υπολογισμός των λόγων των περιεκτικοτήτων κάποιων χαρακτηριστικών συνόλων ανθοκυανών (π.χ. Σγλυκοζυλιωμένων/Σακετλιωμένων) επέτρεψε ως ένα βαθμό την διάκριση των ποικιλιών. Τα δύο κρασιά από την ποικιλία Αγιωργίτικο, εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε όλους αυτούς τους λόγους όταν συγκρίθηκαν με τους αντίστοιχους λόγους από τα κρασιά των διεθνών ποικιλιών Cabernet Sauvignon και Merlot.

Κατά την αποθήκευση των κρασιών σε διαφορετικές τροποποιημένες ατμόσφαιρες, παρατηρήθηκε ότι η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών δεν παρουσίασε σημαντική μείωση κατά την αποθήκευση, διάρκειας ενός χρόνου, των δύο κρασιών σε καμία ατμόσφαιρα αποθήκευσης.

Επίσης, η συγκέντρωση των φλαβονολών συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης δεν παρουσίασε σημαντικές διαφορές σε καμία ατμόσφαιρα αποθήκευσης στο Αγιωργίτικο και στο Ασύρτικο.

Τα κινναμωμικά οξέα στο Ασύρτικο κατά την αποθήκευση μειώθηκαν σε ποσοστό 25-30%. Η μείωση αυτή ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στην ατμόσφαιρα του λεπτού στρώματος αέρα, όπου προσέγγισε το 50%. Αντίστοιχη μείωση δε παρατηρήθηκε στο Αγιωργίτικο. Σε όλες τις στμόσφαιρες αποθήκευσης στο Αγιωργίτικο, οι τρυγικοί εστέρες υδρολύθηκαν σε ποσοστό 50% προς τα αντίστοιχα κινναμωμικά οξέα. Στην ατμόσφαιρα διοξειδίου του άνθρακα οι τρυγικοί εστέρες υδρολύθηκαν σε ποσοστό μεγαλύτερο του 70%. Η υδρόλυση αυτή καταλύεται ενζυμικά και γι' αυτό δεν παρατηρείται στη λευκή ποικιλία.

Η ατμόσφαιρα λεπτού στρώματος αέρα παρουσίασε σημαντικά μεγαλύτερο ρυθμό μείωσης των ελεύθερων ανθοκυανών σε σύγκριση με τις τρεις τροποποιημένες ατμόσφαιρες. Συγκεκριμένα, ο ρυθμός μείωσης των ελεύθερων ανθοκυανών ήταν k_1***=0.0305 days***$^{-1}$ ενώ για τις τροποποιημένες ατμόσφαιρες του αζώτου, του διοξειδίου του άνθρακα και του μίγματος οι ρυθμοί μείωσης ήταν k_2***=0.0053 days***$^{-1}$, k_3***=0.0051 days***$^{-1}$ και k_4***=0.0062 days***$^{-1}$ αντίστοιχα. Οι τροποποιημένες ατμόσφαιρες δεν παρουσίασαν μεταξύ τους στατιστικά σημαντικές διαφορές

Η ένταση του χρώματος (CI) και η λαμπρότητα (dA%) παρουσίασαν μια τάση μείωσης κατά τη διάρκεια αποθήκευσης του ερυθρού κρασιού. Αντίθετα, η απόχρωση (HUE) αυξήθηκε και στις τέσσερις ατμόσφαιρες αποθήκευσης. Οι διαφορές μεταξύ των ατμοσφαιρών αποθήκευσης δεν ήταν στατιστικά σημαντικές.

Συνολικά, όσον αφορά την αποθήκευση σε διαφορετικές τροποποιημένες ατμόσφαιρες δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην εξέλιξη της σύστασης των φαινολικών συστατικών. Και οι τρεις τροποποιημένες ατμόσφαιρες διατήρησαν εξίσου καλά τα δύο κρασιά κατά την αποθήκευση τους, επομένης η επιλογή της κατάλληλης τροποποιημένης ατμόσφαιρας κατά την αποθήκευση κρασιού μπορεί να γίνει με κριτήριο τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά που αποδίδουν στο κρασί καθώς και με βάση του κόστους τους.

11 Βιβλιογραφία

11.1 Διεθνής Βιβλιογραφία

Alamo, M., Bernal, J. L. & Gómez - Cordovés, C. (2000). Behavior of monosaccharides, phenolic compounds, and colour of red wines aged in used oak barrels and in bottle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 48, 4613-4618.

Allen, D.B (1991). Inerting wine tanks with temperature and pressure compensating gas systems. *The Australian Grapegrower and Winemaker* (pp 23 – 24)

Álvarez I., Aleixandre J.L., García M.J., Lizama V., Aleixandre-Tudó J.L. Eur. Food Res. Technol. 228: 501–510 (2009).

Arnous A., Makris D.P., Kefalas P. J. Food Compos. Anal. 15:655–665 (2002).

Bimpilas A., Tsimogiannis D., Balta-Brouma K., Lymperopoulou T., Oreopoulou V. Food Chem. 178:164–171 (2015).

Boulton, R. (2001). The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: a critical review. *American Journal of Enology and Viticulture*,*52*(2), 67-87.

Buckingham, J., & Munasinghe, V. (n.d.) *Dictionary of flavonoids*.

Brouillard, R., & Dubois, J. E. (1977). Mechanism of the structural transformations of anthocyanins in acidic media. *Journal of the American Chemical Society*, *99*(5), 1359-1364.

Busse-Valverde N., Gómez-Plaza E., López-Roca J.M., Gil-Muñoz R., Bautista-Ortín A.B. J. Agric. Food Chem. 59:5450–5455 (2011).

Cagnasso, E., Rolle, L., Caudana, A., & Gerbi, V. (2008). Relationship between grape phenolic maturity and red wine phenolic composition. *Ital. J. Food Sci*,*20*, 365-381.

Casassa, L. F., Bolcato, E. A., & Sari, S. E. (2015). Chemical, chromatic, and sensory attributes of 6 red wines produced with prefermentative cold soak.*Food chemistry*, *174*, 110-118.

Castaneda-Ovando, A., Pacheco-Hernandez, M., Paez-Hernandez,M., Rodriguez, J. & Galan-Vidal, C. (2009), Chemical studies of anthocyanins: A review, *Food Chemistry*, 113, 859-871.

Castillo-Muρoz, N., Gσmez-Alonso, S., Garcνa-Romero, E., & Hermosνn-Gutiιrrez, I. (2007). Flavonol profiles of Vitis vinifera red grapes and their single-cultivar wines. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55, 992–1002.

Cheynier, V. Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications. *In Flavonoids in wine*. Florida (2006), p. 273–299.

Cliff M.A., King M.C., Schlosser J. Food Res. Int. 40:92–100 (2007).

Conde, C., Silva, P., Fontes, N., Dias, A. C. P., Tavares, R. M., Sousa, M. J., & Gerós, H. (2007). Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality.

Constantí, M., Poblet, M., Arola, L., Mas, A., & Guillamón, J. M. (1997). Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation in a newly established winery. *American Journal of Enology and Viticulture*, *48*(3), 339-344.

Costantini, A., García-Moruno, E., & Moreno-Arribas, M. V. (2009). Biochemical transformations produced by malolactic fermentation. In *Wine chemistry and biochemistry* (pp. 27-57). Springer New York.

Davis, C. R., Wibowo, D. J., Lee, T. H., & Fleet, G. H. (1986). Growth and metabolism of lactic acid bacteria during and after malolactic fermentation of wines at different pH. *Applied and Environmental Microbiology*, *51*(3), 539-545.

De Santis, D., & Frangipane, M. (2010). Effect of prefermentative cold maceration on the aroma and phenolic profiles of a merlot red wine. *Italian Journal of Food Science*, *22*(1), 47-54.

Eisenman, L. (2008). Clarification and Stabilization. In *The home winemakers manual* (pp.88-97).

Fanzone M., Zamora F., Jofré V., Assof M., Gómez-Cordovés C., Peña-Neira Á. J. Sci. Food Agric. 92:704–718 (2012).

Fernandez-Zurbano, P., Ferreira, V., Peña, C., Escudero, A., & Cacho, J. (1999). Effects of maceration time and pectolytic enzymes added during maceration on the phenolic composition of must. *Food Science and Technology International*,*5*(4), 319-325.

Ferrando, M., Güell, C., & López, F. (1998). Industrial wine making: Comparison of must clarification treatments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*(4), 1523-1528.

Ferrarini, R., Celotti, E., Zironi, R., & Buiatti, S. (1995). Recent advances in the process of flotation applied to the clarification of grape musts. *Journal of Wine Research*, *6*(1), 19-33.

Figueiredo-González M., Martínez-Carballo E., Cancho-Grande B., Santiago J.L., Martínez M.C., Simal-Gándara J. Food Chem. 130:9–19 (2012).

Ghidossi, R., Poupot, C., Thibon, C., Pons, A., Darriet, P., Riquier, L., ... & Peuchot, M. M. (2012). The influence of packaging on wine conservation. *Food Control*, 23(2), 302-311.

Giunchi, A., Versari, A., Parpinello, G. P., & Galassi, S. (2008). Analysis of mechanical properties of cork stoppers and synthetic closures used for wine bottling. *Journal of food engineering*, *88*(4), 576-580.

Gómez-Plaza, E., Gil-Muñoz, R., López-Roca, J. M., Martínez-Cutillas, A., & Fernández-Fernández, J. I. (2001). Phenolic compounds and color stability of red wines: Effect of skin maceration time. *American Journal of Enology and Viticulture*, *52*(3), 266-270.

González-Manzano, S., Santos-Buelga, C., Dueñas, M., Rivas-Gonzalo, J.C. & Escribano-Bailón, T. (2008). Colour implications of self-association processes of wine anthocyanins. *European Food Research and Technology.*, 226, 483–490.

González-Neves, G., Franco, J., Barreiro, L., Gil, G., Moutounet, M. & Carbonneau, A. (2007). Varietal differentiation of Tannat. Cabernet-Sauvignon and Merlot grapes and wines according to their anthocyanic composition. *European Food Research and Technology*. 225, 111–117.

Gunata, Y. Z., Sapis, J. C., & Moutounet, M. (1987). Substrates and aromatic carboxylic acid inhibitors of grape phenol oxidases. *Phytochemistry*, *26*(6), 1573-1575.

Harbertson, J. F., Hodgins, R. E., Thurston, L. N., Schaffer, L. J., Reid, M. S., Landon, J. L., ... & Adams, D. O. (2008). Variability of tannin concentration in red wines. *American journal of enology and viticulture*, *59*(2), 210-214.

He, F., Liang, N., Mu, L., Pan, Q., Wang, J., Reeves, M., & Duan, C. (2012). Anthocyanins and Their Variation in Red Wines I. Monomeric Anthocyanins and Their Color Expression. *Molecules*, *17*(12), 1571-1601.

Ivanova-Petropulos V., Ricci A., Nedelkovski, D., Dimovska V., Parpinello G.P., Versari A. Food Chem. 171:412–420 (2015).

Jackson, R. S. (2008). *Wine science: principles and applications* (pp. 270-331). San Diego: Academic Press.

Jurd, L. (1969). Review of polyphenol condensation reactions and their possible occurrence in the aging of wines. *American Journal of Enology and Viticulture,20*(3), 191-195.

Kallithraka, S., Tsoutsouras, E., Tzourou, E., & Lanaridis, P. (2006). Principal phenolic compounds in Greek red wines. Food Chemistry, 99, 784–793.

Lewis, D. (1990). Blanketing in storage tanks. *The Australian Grapegrower and Winemaker*

Lonvaud-Funel, A. (1999). Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. In *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications* (pp. 317-331). Springer Netherlands.

Mentana, A., Pati, S., La Notte, E., & Del Nobile, M. A. (2009). Chemical changes in Apulia table wines as affected by plastic packages. *LWT-Food Science and Technology*, *42*(8), 1360-1366.

Mihnea, M., González-SanJosé, M. L., Ortega-Heras, M., & Pérez-Magariño, S. (2015). A comparative study of the volatile content of Mencía wines obtained using different pre-fermentative maceration techniques. *LWT-Food Science and Technology*.

Minussi, R. C., Rossi, M., Bologna, L., Cordi, L., Rotilio, D., Pastore, G. M., & Durán, N. (2003). Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines. *Food Chemistry*, *82*(3), 409-416.

Monagas, M., Bartolomé, B., & Gómez-Cordovés, C. (2005). Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. *Critical reviews in food science and nutrition*, *45*(2), 85-118.

Moreno-Arribas, M. V., & Polo, M. C. (2009). *Wine chemistry and biochemistry* (Vol. 378). New York: Springer.

Okamura, S., & Watanabe, M. (1982). Purification and properties of hydroxycinnamic acid ester hydrolase from Aspergillus japonicus. *Agricultural and Biological Chemistry*, *46*(7), 1839-1848.

Ortega-Regules A., Ros-García J.M., Bautista-Ortín A.B., López-Roca J.M., Gómez-Plaza E. Eur. Food Res. Technol. 227: 223–231 (2008).

Peyrot des Gachons, C., & Kennedy, J. A. (2003). Direct method for determining seed and skin proanthocyanidin extraction into red wine. *Journal of agricultural and food chemistry*, *51*(20), 5877-5881.

Puértolas, E., Álvarez, I., & Raso, J. (2011). Changes in phenolic compounds of Aragón red wines during alcoholic fermentation. *Food Science and Technology International*, 17, 77–86.

Reynolds, A., Cliff, M., Girard, B., & Kopp, T. G. (2001). Influence of fermentation temperature on composition and sensory properties of Semillon and Shiraz wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, *52*(3), 235-240.

Ribereau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2006). *Handbook of Enology.* West Sussex-UK: John Wiley and Sons Ltd.

Rivas-Gonzalo, J. C., Bravo-Haro, S., & Santos-Buelga, C. (1995). Detection of compounds formed through the reaction of malvidin 3-monoglucoside and catechin in the presence of acetaldehyde. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *43*(6), 1444-1449.

Robards, K., Prenzler, P. D., Tucker, G., Swatsitang, P., & Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food chemistry*, *66*(4), 401-436.

Robinson, J., Harding, J., & Vouillamoz, J. (2012). *Wine grapes*. New York: Ecco.

Sacchi, K. L., Bisson, L. F., & Adams, D. O. (2005). A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, *56*(3), 197-206.

Shirakura, A., Nakaya, M., Koga, Y., Kodama, H., Hasebe, T., & Suzuki, T. (2006). Diamond-like carbon films for PET bottles and medical applications.*Thin Solid Films*, *494*(1), 84-91.

Sokolowsky, M., Rosenberger, A., & Fischer, U. (2015). Sensory impact of skin contact on white wines characterized by descriptive analysis, time–intensity analysis and temporal dominance of sensations analysis. *Food Quality and Preference*, *39*, 285-297.

Souquet, J. M., Labarbe, B., Le Guernevé, C., Cheynier, V., & Moutounet, M. (2000). Phenolic composition of grape stems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(4), 1076-1080.

Stoclet J.C., Chataigneau T., Ndiaye M., Oak M.H., El Bedoui J., Chataigneau M., Schini-Kerth V.B. Eur. J. Pharmacol. 500:299–313 (2004).

Terrier, N., Poncet-Legrand, C., & Cheynier, V. (2009). Flavanols, flavonols and dihydroflavonols. In *Wine chemistry and biochemistry* (pp. 463-507). Springer New York.

Vidal, S., & Aagaard, O. (2008). Oxygen management during vinification and storage of Shiraz wine. *Wine Industry Journal*, *23*(5), 56-63.

Vivas, N., & Glories, Y. (1996). Role of oak wood ellagitannins in the oxidation process of red wines during aging. *American journal of enology and viticulture*,*47*(1), 103-107.

Waterhouse A.L. Handbook of food analytical chemistry Determination of total phenolics. New Jersey (2005), p. 463–471.

Wilson, D.L., (1985). Sparging with inert gas to remove oxygen and carbon dioxide, The Australian Grapegrower & Winemaker (pp 112-114)

Zamora, F. (2009). Biochemistry of alcoholic fermentation. In *Wine Chemistry and Biochemistry* (pp. 3-26). Springer New York.

11.2 Ελληνική Βιβλιογραφία

Κουράκου–Δραγώνα, Σ. (1998). Θέματα Οινολογίας. Αθήνα: Τροχαλία.

Σουφλερός, Ε. (1997). Οινολογία, Επιστήμη και Τεχνογνωσία, Τομός Ι. Θεσσαλονίκη: Τυπογραφία Παπαγεωργίου.

Σουφλερός, Ε. (1997). Οινολογία, Επιστήμη και Τεχνογνωσία, Τομός ΙΙ. Θεσσαλονίκη: Τυπογραφία Παπαγεωργίου.

Συμεού, Ε. (2010). Διδακτορική Διατριβή: Μελέτη των φαινολικών συστατικών σταφυλιών και οίνου, Χίου και Νεμέας και της επίδρασης των ενζύμων και άλλων παραμέτρων σε αυτά, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.

Τσακίρης (1998). Οινολογία από το κρασί στι σταφύλι. Αθήνα: Έκδοση Τρόφιμα και ποτά

Τσέτουρας, Π. (2008). Οινοτεχνία, Η Επιστήμη του κρασιού στην πράξη. Αθήνα: Εκδόσεις Σταμούλη Α.Ε.