



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



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μελέτη βελτίωσης ποιοτικών παραμέτρων στο κρασί κατά την
οινοποίηση και την μεταζυμωτική περίοδο**

ΠΑΝΑΓΟΠΟΥΛΟΥ ΜΑΡΙΛΕΝΑ

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ : ΩΡΑΙΟΠΟΥΛΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΗ

ΑΘΗΝΑ, ΙΟΥΝΙΟΣ 2015

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η εκχύλιση των πολυφαινολών (ανθοκυάνες, φλαβαν-3-όλες, κινναμωμικά οξέα και φλαβονόλες) κατά την ερυθρή οινοποίηση δύο ποικιλιών, του Αγιωργίτικου και του Merlot. Επίσης, συγκρίθηκαν ως προς το φαινολικό φορτίο του παραγόμενου κρασιού, δύο μέθοδοι λευκής οινοποίησης, η κλασική και αυτή με προζυμωτική κρυσεκχύλιση, στην ποικιλία του Μοσχοφίλερου. Στη συνέχεια, εμπλουτίστηκε φρέσκο κρασί της ποικιλίας Merlot με ροσμαρινικό οξύ και αιθανολικά εκχυλίσματα από ρίγανη (*Origanum vulgare* ssp. *Hirtum*) και θρούμπι (*Satureja thymbra*), ώστε να μελετηθεί η επίδρασή τους στο φαινόμενο του σχηματισμού έγχρωμων συμπλόκων (copigmentation) και κατ' επέκταση στο χρώμα του κρασιού, κατά τη διάρκεια της αποθήκευσής τους για 5.5 μήνες.

Όσον αφορά στην εκχύλιση των επιμέρους φαινολικών ομάδων, διαπιστώθηκε ότι οι ανθοκυάνες εκχυλίζονται άμεσα, κατά τις πρώτες κιόλας ώρες της οινοποίησης μετά την έκθλιψη, αφού είναι ευδιάλυτες σε υδατικά διαλύματα και βρίσκονται αποκλειστικά στους φλοιούς των ραγών, απ' όπου και η εκχύλισή τους είναι εύκολη. Παρόμοιο προφίλ εκχύλισης παρουσίασαν οι τρυγικοί εστέρες των κινναμωμικών οξέων, οι οποίοι βρίσκονται στο κρασί σε σημαντικά χαμηλότερη περιεκτικότητα από τις ανθοκυάνες, και οι φλαβονόλες, οι οποίες βρίσκονται σε ακόμα χαμηλότερη. Στην εκχύλιση των φλαβαν-3-ολών και των πολυμερών τους, των προκυανιδινών, παρατηρήθηκε μία υστέρηση. 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. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι η αύξηση της περιεκτικότητας της αιθανόλης κατά την εξέλιξη της αλκοολικής ζύμωσης συντελεί στην καλύτερη εκχύλισή τους. Ακόμη, συγκρίνοντας την ποικιλία Merlot με του Αγιωργίτικου, φάνηκε ότι το Merlot παρουσίασε πιο γρήγορα μέγιστο κατά την εκχύλιση σε όλες τις επιμέρους ομάδες, γεγονός που αποδίδεται στην μορφολογία της ράγας του, που έχει μικρή διάμετρο και λεπτό φλοιό. Τέλος, και στις δύο ποικιλίες που μελετήθηκαν, παρατηρήθηκε ότι αφού οι συγκεντρώσεις των επιμέρους φαινολικών ομάδων φτάσουν σε ένα μέγιστο, στη συνέχεια αρχίζουν και μειώνονται, εκτός των κινναμωμικών οξέων που διατηρούνται σταθερά. Το φαινόμενο αυτό ίσως οφείλεται στον πολυμερισμό, την οξειδωση και στην καθίζηση αυτών των συστατικών. Βέβαια, μετά το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης, οι συγκεντρώσεις των επιμέρους φαινολικών ομάδων, αλλά και των ολικών φαινολικών παρέμειναν πρακτικά σταθερές.

Κατά τη σύγκριση των δύο μεθόδων λευκής οινοποίησης, το κρασί που οινοποιήθηκε με προζυμωτική κρυσεκχύλιση 6 ωρών παρουσίασε αυξημένο φαινολικό φορτίο σε σχέση με αυτό της κλασικής οινοποίησης, κατά 41%. Συγκεκριμένα, οι τρυγικοί εστέρες των κινναμωμικών οξέων αυξήθηκαν κατά 42%, οι φλαβονόλες κατά 134%, ενώ οι φλαβαν-3-όλες παρέμειναν σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι μετά τη προζυμωτική κρυσεκχύλιση, το γλεύκος είχε μία απώλεια φαινολικών συστατικών της τάξης του 7%, με μείωση κυρίως των φλαβονολών.

Με την ενσωμάτωση στο κρασί πρόσθετων συστατικών, ροσμαρινικού οξέος ή εκχυλισμάτων από ρίγανη ή θρούμπι, που περιείχαν φαινολικά οξέα και φλαβονοειδή,

παρατηρήθηκε αύξηση των έγχρωμων συμπλόκων (συμπλοκοποιημένες ανθοκυάνες), με συνέπεια την άμεση ενίσχυση του χρώματος. Αρχικά, παρατηρήθηκε ότι η ενίσχυση του φαινομένου του σχηματισμού έγχρωμων συμπλόκων που προκαλείται από τέτοια συστατικά, δεν εξαρτάται από την περιεκτικότητα του διαλύματος σε ανθοκυάνες (για συγκέντρωση μεγαλύτερη των 95 ppm), και επίσης, ότι αυξάνεται γραμμικά με την συγκέντρωση του προστιθέμενου συστατικού. Η προσθήκη εκχυλίσματος από ρίγανη ή θρούμπι, που περιείχαν περίπου 700 ppm ολικά φαινολικά συστατικά, καθώς και η προσθήκη 700 ppm ροσμαρινικού οξέος, αύξησαν το ίδιο τις συμπλοκοποιημένες ανθοκυάνες του κρασιού αναφοράς, κατά περίπου 6.5% επί των ολικών ανθοκυανών, μειώνοντας τις ελεύθερες και χωρίς να επηρεάζονται οι πολυμερισμένες. Όσον αφορά στη μεταβολή των χρωματικών παραμέτρων, αυτή ήταν αισθητά μεγαλύτερη στα εμπλουτισμένα με εκχυλίσματα κρασιά, καθώς τα εκχυλίσματα, εκτός από κινναμωμικά οξέα (κυρίως ροσμαρινικό οξύ), περιείχαν και άλλα φαινολικά συστατικά (φλαβόνες, φλαβονόλες) που δίνουν διαλύματα κίτρινου χρώματος. Έτσι, ενώ το ροσμαρινικό οξύ αύξησε το ποσοστό του κόκκινου χρώματος του κρασιού (απορρόφηση στα 520 nm), τα εκχυλίσματα το μείωσαν, λόγω της υψηλής απορρόφησής τους και στα 420 nm (ενδεικτικό μήκος κύματος για το κίτρινο χρώμα), και επακόλουθα αύξησαν και την απόχρωση (T) του κρασιού, ενώ το ροσμαρινικό οξύ την μείωσε. Επίσης, η προσθήκη αυτών των συστατικών στο κρασί, μείωσε την φωτεινότητά του (L^*), γεγονός που αποδεικνύει την ενίσχυση του φαινομένου του σχηματισμού έγχρωμων συμπλόκων, και μάλιστα είναι δείκτης της αυξοχρωμικής επίδρασής του. Τα εμπλουτισμένα κρασιά παρουσίασαν χαμηλότερες τιμές της απόχρωσης (h^*), μεταβολής ενδεικτικής της βαθοχρωμικής μετατόπισης που προκαλεί το φαινόμενο σχηματισμού έγχρωμων συμπλόκων.

Καθ' όλη την αποθήκευση των εμπλουτισμένων κρασιών φάνηκε ότι η προσθήκη συστατικών, που μπορούν να σχηματίσουν με τις ανθοκυάνες έγχρωμα σύμπλοκα, δεν επηρεάζει το ρυθμό πολυμερισμού των ανθοκυανών, και μετά την πάροδο 5.5 μηνών οι πολυμερισμένες ανθοκυάνες ανήλθαν στο 80% περίπου των ολικών ανθοκυανών. Επίσης, δεν επηρεάζεται ούτε ο ρυθμός μείωσης των ελεύθερων ανθοκυανών, ούτε αυτός των συμπλοκοποιημένων. Συγκεκριμένα, το κρασί αναφοράς στην αρχή του πειράματος είχε $44.6\% \pm 0.4\%$ ελεύθερες και $27.5\% \pm 0.3\%$ συμπλοκοποιημένες ανθοκυάνες, ενώ στο τέλος του $10.4\% \pm 1.7\%$ και $7.5\% \pm 2.1\%$, αντίστοιχα. Στο τέλος του πειράματος, λόγω του τόσο υψηλού βαθμού πολυμερισμού, το μεγαλύτερο μέρος του χρώματος των κρασιών οφειλόταν στις πολυμερισμένες ανθοκυάνες, και συνεπώς οι χρωματικές διαφορές ανάμεσα στα εμπλουτισμένα κρασιά και στο κρασί αναφοράς αμβλύθηκαν, σε σχέση με τις αρχικές διαφορές.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Εισαγωγή.....	11
1. Το σταφύλι και το κρασί.....	13
1.1.Χημική σύσταση του σταφυλιού.....	13
1.2.Στάδια ανάπτυξης του σταφυλιού.....	14
1.3.Σύσταση του γλεύκους.....	15
1.4.Αλκοολική ζύμωση.....	17
1.5.Μηλογαλακτική ζύμωση.....	18
1.6. Το κρασί και το οφέλη του στην υγεία.....	18
1.7.Η πρώτη ύλη της οινοποίησης.....	20
1.7.1. Ελληνικές ποικιλίες.....	20
1.7.2. Ξένες ποικιλίες.....	23
2. Λευκή και ερυθρή οινοποίηση.....	24
2.1.Λευκή οινοποίηση.....	24
2.1.1. Κλασική λευκή οινοποίηση.....	24
2.1.2. Λευκή οινοποίηση με προζυμωτική εκχύλιση.....	27
2.1.3. Λευκή οινοποίηση με κρυοεκχύλιση.....	29
2.2.Ερυθρή οινοποίηση.....	29
2.2.1. Κλασική ερυθρή οινοποίηση.....	30
2.2.2. Χρήση εμπορικών σκευασμάτων ενζύμων.....	32
2.2.3. Προζυμωτική εκχύλιση «εν ψυχρώ».....	34
2.2.4. Θερμοοινοποίηση.....	34
2.2.5. Ανθρακική αναεροβίωση.....	36
2.3.Διεργασίες μετά την οινοποίηση.....	37
2.3.1. Μετάγγιση.....	37
2.3.2. Διαύγαση.....	37
2.3.3. Σταθεροποίηση.....	40
2.3.3.1. Σταθεροποίηση με ψύξη.....	40
2.3.3.2. Σταθεροποίηση με θέρμανση.....	40
2.3.3.3.Σταθεροποίηση με άλλα μέσα.....	41
3. Πολυφαινόλες.....	41
3.1.Τα φαινολικά παράγωγα στο σταφύλι και στο κρασί.....	41
3.2.Φλαβονοειδείς φαινόλες.....	44
3.2.1. Φλαβονόλες.....	44
3.2.2. Κατεχίνες (φλαβαν-3-όλες).....	45
3.2.3. Ανθοκυάνες.....	47
3.3.Μη φλαβονοειδείς φαινόλες.....	50
3.4.Η θέση των φαινολικών στο σταφύλι.....	52
3.5.Εκχύλιση πολυφαινολών.....	53
3.5.1. Σειρά εκχύλισης πολυφαινολών.....	53
3.5.2. Παράγοντες που επηρεάζουν την εκχύλιση.....	54
3.5.2.1.Διάρκεια παραμονής του γλεύκους με τα στέμφυλα.....	55

3.5.2.2. Διαβροχή των στεμφύλων με το γλεύκος.....	55
3.5.2.3. Θερμοκρασία	56
3.5.2.4. Αιθανόλη.....	56
3.5.2.5. Θειώδης ανυδρίτης.....	57
3.5.2.6. Λοιποί παράγοντες.....	57
4. Το χρώμα στα λευκά και κόκκινα κρασιά.....	58
4.1. Το χρώμα στα λευκά κρασιά.....	58
4.2. Το χρώμα στα κόκκινα κρασιά.....	60
4.2.1. Οι ανθοκυάνες και η υποκατάστασή τους.....	60
4.2.2. Αντιδράσεις διάσπασης των ανθοκυανών.....	63
4.2.3. Αντιδράσεις των ανθοκυανών με άλλα συστατικά του κρασιού.....	64
4.2.3.1. Η αυτοσυνένωση των ανθοκυανών και το φαινόμενο του σχηματισμού έγχρωμων συμπλόκων.....	65
4.2.3.2. Πολυμερισμός ανθοκυανών - ταννινών.....	70
4.2.3.3. Πολυμερισμός ανθοκυανών - ταννινών μέσω ακεταλδεΐδης.....	72
4.2.3.4. Πυρανοανθοκυάνες.....	74
4.2.3.5. Προϊόντα ξανθυλίου.....	75
4.2.4. Εξέλιξη του χρώματος.....	75
4.3. Μετρήσεις χρώματος και χρωματικοί δείκτες.....	78
5. Υλικά και μέθοδοι.....	79
5.1. Διαδικασίες οινοποιήσεων και σχεδιασμός πειραμάτων.....	79
5.1.1. Διαδικασίες οινοποιήσεων.....	79
5.1.1.1. Κλασική οινοποίηση ποικιλίας Μοσχοφίλερου	79
5.1.1.2. Οινοποίηση ποικιλίας Μοσχοφίλερου με προζυμωτική εκχύλιση.....	79
5.1.1.3. Ερυθρή οινοποίηση ποικιλίας Merlot.....	80
5.1.1.4. Ερυθρή οινοποίηση ποικιλίας Αγιωργίτικου.....	80
5.1.2. Προσθήκη εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών σε φρέσκο κρασί.....	81
5.2. Συσκευές.....	82
5.3. Αναλυτικές μέθοδοι.....	83
5.3.1. Προσδιορισμός ολικών φαινολικών και επιμέρους ομάδων.....	83
5.3.1.1. Μέθοδος Folin – Ciocalteu.....	83
5.3.1.2. Φασματοφωτομετρική μέθοδος.....	83
5.3.2. Προσδιορισμός φλαβαν-3-ολών.....	84
5.3.3. Προσδιορισμός συμπλοκοποιημένων ανθοκυανών.....	85
5.3.4. Ανάλυση φαινολικών ενώσεων μέσω HPLC.....	86
5.3.5. Προσδιορισμός χρώματος.....	86
5.3.5.1. Φασματοφωτομετρική μέθοδος.....	86
5.3.5.2. Προσδιορισμός μέσω χρωματόμετρου CIELAB.....	87
6. Αποτελέσματα – Συζήτηση.....	88
6.1. Α' Μέρος: Μεταβολές κατά την οινοποίηση.....	88
6.1.1. Εκχύλιση φαινολικών ενώσεων.....	88
6.1.1.1. Αγιωργίτικο.....	88

6.1.1.2.Merlot.....	90
6.1.1.3.Μοσχοφίλερο.....	92
6.1.2. Εξέλιξη φαινολικών ενώσεων κατά τη ζύμωση-σύγκριση ποικιλιών και διεργασιών	93
6.1.2.1.Κόκκινα κρασιά.....	93
6.1.2.2.Λευκά κρασιά.....	96
6.1.3. Προσδιορισμός φαινολικών ενώσεων στα κόκκινα κρασιά με HPLC-σύγκριση ποικιλιών.....	100
6.2.B' Μέρος: Μεταβολές κατά την αποθήκευση του φρέσκου κρασιού και μελέτη βελτίωσης χρώματος με συμπλοκοποίηση.....	101
6.2.1. Δοκιμαστικά πειράματα μελέτης του φαινομένου του σχηματισμού έγχρωμων συμπλόκων σε εκχυλίσματα φλοιών.....	101
6.2.1.1.Μελέτη της επίδρασης της συγκέντρωσης ανθοκυανών στο φαινόμενο σχηματισμού έγχρωμων συμπλόκων	102
6.2.1.2.Μελέτη της επίδρασης της συγκέντρωσης πρόσθετων συστατικών στο φαινόμενο σχηματισμού έγχρωμων συμπλόκων.....	103
6.2.1.2.1. Προσθήκη ροσμαρινικού οξέος.....	103
6.2.1.2.2. Προσθήκη αιθανολικού εκχυλίσματος ρίγανης.....	105
6.2.2. Εμπλουτισμός του κρασιού με συστατικά που σχηματίζουν έγχρωμα σύμπλοκα με τις ανθοκυάνες.....	108
6.2.2.1.Εξέλιξη φαινομένου συμπλοκοποίησης ανθοκυανών.....	111
6.2.2.2.Εξέλιξη χρώματος μέσω χρωματόμετρου CIELAB.....	117
6.2.2.3.Εξέλιξη χρώματος μέσω φασματοφωτομετρικής μεθόδου.....	120
7. Συμπεράσματα.....	127
7.1.A' Μέρος: Μεταβολές κατά την οινοποίηση.....	127
7.2.B' Μέρος: Μεταβολές κατά την αποθήκευση του φρέσκου κρασιού και μελέτη βελτίωσης χρώματος με συμπλοκοποίηση.....	127
8. Βιβλιογραφία.....	129

ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

<u>Εικόνα 1:</u> Αγιωργίτικο	20
<u>Εικόνα 2:</u> Μοσχοφύλερο	22
<u>Εικόνα 3:</u> Merlot	23
<u>Εικόνα 4:</u> Ασυνεχές πνευματικό πιεστήριο	25
<u>Εικόνα 5:</u> Δεξαμενές με μανδύα ψύξης για τη ρύθμιση της θερμοκρασίας της αλκοολικής ζύμωσης.....	26
<u>Εικόνα 6:</u> Θλιπτήριο - αποβοστρυχωτής σταφυλιών.....	30
<u>Εικόνα 7:</u> Δεξαμενή ερυθρής οινοποίησης με ενσωματωμένο σύστημα ανακύκλωσης του γλεύκους.....	31
<u>Εικόνα 8:</u> Φίλτρο γης διατόμων για χονδροειδή διήθηση	38
<u>Εικόνα 9:</u> Φίλτρο πλακών με φιλτρόχαρτα για διήθηση μετά την χονδροειδή διήθηση.....	39
<u>Εικόνα 10:</u> Δεξαμενή σταθεροποίησης με διπλό τοίχωμα και ενδιάμεση μόνωση.....	40
<u>Εικόνα 11:</u> Οι φλαβονοειδείς και οι μη φλαβονοειδείς φαινόλες, και η προέλευσή τους.....	43
<u>Εικόνα 12:</u> Βασικός σκελετός των φλαβονοειδών	44
<u>Εικόνα 13:</u> Φλαβονόλες.....	44
<u>Εικόνα 14:</u> Τα μόρια των φλαβαν-3-ολών στα σταφύλια.....	45
<u>Εικόνα 15:</u> Δομή μορίων ανθοκυανιδίων	48
<u>Εικόνα 16:</u> Δομή των (a) μονογλυκοζίτης-3 της ανθοκυάνης, (b) ακυλιωμένος μονογλυκοζίτης-3 από το π-κουμαρικό οξύ στην θέση 5 της γλυκόζης.....	48
<u>Εικόνα 17:</u> Βενζοϊκά και κινναμωμικά οξέα στο κρασί.....	50
<u>Εικόνα 18:</u> Γαλλικό οξύ, ελλαγικό οξύ και μία ελλαγιτανίνη	51
<u>Εικόνα 19:</u> Ισορροπία μεταξύ των διαφόρων μορφών των ανθοκυανών στο κρασί.....	62
<u>Εικόνα 20:</u> Οι αλληλεπιδράσεις των ανθοκυανών: (A) αυτοσυνένωση ανθοκυανών, (B) ενδομοριακός σχηματισμός έγχρωμου συμπλόκου ανθοκυάνης, (C) σύμπλοκο με μέταλλα, (D) διαμοριακός σχηματισμός έγχρωμων συμπλόκων με ένα συστατικό με ελεύθερο ζεύγος ηλεκτρονίων.....	66
<u>Εικόνα 21:</u> Παράδειγμα της σταθεροποίησης των ανθοκυανών μέσω σχηματισμού ενώσεων από μεταφορά φορτίου (αλληλεπίδραση ανθοκυανών με φαινολικά συστατικά)	67
<u>Εικόνα 22:</u> Πιθανός μηχανισμός σχηματισμού προϊόντων προσθήκης T-A και T-T.....	72
<u>Εικόνα 23:</u> Μηχανισμός αντιδράσεων σχηματισμού προϊόντων T-A και T-T υπό την παρουσία ακεταλδεΐδης	73
<u>Εικόνα 24:</u> Αυτοοξειδωση ορθο-διφαινολών για την παραγωγή πολυμερών ορθο-διφαινολών και υπεροξειδίου του υδρογόνου, το οποίο θα ενεργοποιήσει την οξείδωση της αιθανόλης σε ακεταλδεΐδη	74
<u>Εικόνα 25:</u> Δομή των τριών κατηγοριών πυροανθοκυανών (πορτισίνες, βιτισίνες, πινοτίνες) που έχουν βρεθεί στο κρασί	74
<u>Εικόνα 26:</u> Δομή μορίου ξανθυλίου	75
<u>Εικόνα 27:</u> Ροσμαρινικό οξύ.....	81
<u>Εικόνα 28:</u> Αντίδραση συμπύκνωσης του αντιδραστηρίου DMACA (a) με (+)-κατεχίνη (b) και προϊόν την έγχρωμη ένωση (c).....	84
<u>Εικόνα 29:</u> Απεικόνιση των χρωμάτων για τις τιμές της παραμέτρου h^*	119

ΠΙΝΑΚΑΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

- Διάγραμμα 1: Εκχύλιση επιμέρους φαινολικών ομάδων και ολικών φαινολικών κατά την ερυθρή οινοποίηση της ποικιλίας Αγιωργίτικο (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))..... 88
- Διάγραμμα 2: Εκχύλιση επιμέρους φαινολικών ομάδων και ολικών φαινολικών κατά την ερυθρή οινοποίηση της ποικιλίας Merlot (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))..... 90
- Διάγραμμα 3: Εκχύλιση επιμέρους φαινολικών ομάδων και ολικών φαινολικών κατά την προζυμωτική κρυοεκχύλιση της ποικιλίας Μοσχοφίλερο (TP: ολικό φαινολικό φορτίο (ισοδύναμα γαλλικού οξέος), TCat: φλαβαν-3-όλες (ισοδύναμα κατεχίνης), TCAcids: τρυγικοί εστέρες (ισοδύναμα καφεϊκού οξέος), TFlav: φλαβονόλες (ισοδύναμα κερκετίνης)) 92
- Διάγραμμα 4: Εκχύλιση και εξέλιξη των ολικών φαινολικών (εκφρασμένων σε ισοδύναμα ppm γαλλικού οξέος / GAE) κατά τη ζύμωση των ερυθρών ποικιλιών (συνεχόμενες γραμμές: τέλος εκχύλισης, διακεκομμένες: τέλος ζύμωσης για τις αντίστοιχες (χρωματικά) ποικιλίες) 94
- Διάγραμμα 5: Εκχύλιση και εξέλιξη των ολικών ανθοκυανών (εκφρασμένων σε ισοδύναμα ppm γλυκοζίτη-3 της μαλβιδίνης / mn-3-glc) κατά τη ζύμωση των ερυθρών ποικιλιών (συνεχόμενες γραμμές: τέλος εκχύλισης, διακεκομμένες: τέλος ζύμωσης για τις αντίστοιχες (χρωματικά) ποικιλίες)..... 94
- Διάγραμμα 6: Εκχύλιση και εξέλιξη των ολικών φλαβαν-3-ολών (εκφρασμένων σε ισοδύναμα ppm κατεχίνης / catechin) κατά τη ζύμωση των ερυθρών ποικιλιών (συνεχόμενες γραμμές: τέλος εκχύλισης, διακεκομμένες: τέλος ζύμωσης για τις αντίστοιχες (χρωματικά) ποικιλίες) 95
- Διάγραμμα 7: Εκχύλιση και εξέλιξη των τρυγικών εστέρων των κινναμωμικών οξέων (εκφρασμένων σε ισοδύναμα ppm καφεϊκού οξέος / caffeic acid) κατά τη ζύμωση των ερυθρών ποικιλιών (συνεχόμενες γραμμές: τέλος εκχύλισης, διακεκομμένες: τέλος ζύμωσης για τις αντίστοιχες (χρωματικά) ποικιλίες) 95
- Διάγραμμα 8: Εκχύλιση και εξέλιξη των ολικών φλαβονολών (εκφρασμένων σε ισοδύναμα ppm κερκετίνης / quercetin) κατά τη ζύμωση των ερυθρών ποικιλιών (συνεχόμενες γραμμές: τέλος εκχύλισης, διακεκομμένες: τέλος ζύμωσης για τις αντίστοιχες (χρωματικά) ποικιλίες) 96
- Διάγραμμα 9: Εξέλιξη των ολικών φαινολικών (εκφρασμένων σε ισοδύναμα ppm γαλλικού οξέος /GAE) κατά τη ζύμωση της ποικιλίας του Μοσχοφίλερου(διακεκομμένες γραμμές: τέλος ζύμωσης για τα αντίστοιχα (χρωματικά) κρασιά) 97
- Διάγραμμα 10: Εξέλιξη των τρυγικών εστέρων των κινναμωμικών οξέων (εκφρασμένων σε ισοδύναμα ppm καφεϊκού οξέος /caffeic acid) κατά τη ζύμωση της ποικιλίας του

Μοσχοφίλερου (διακεκομμένες γραμμές: τέλος ζύμωσης για τα αντίστοιχα (χρωματικά) κρασιά)	98
<u>Διάγραμμα 11</u> : Εξέλιξη των ολικών φλαβονολών (εκφρασμένων σε ισοδύναμα ppm κερκετίνης /quercetin) κατά τη ζύμωση της ποικιλίας του Μοσχοφίλερου (διακεκομμένες γραμμές: τέλος ζύμωσης για τα αντίστοιχα (χρωματικά) κρασιά).....	98
<u>Διάγραμμα 12</u> : Εξέλιξη των ολικών φλαβαν-3-ολών (εκφρασμένων σε ισοδύναμα ppm κατεχίνης /catechin) κατά τη ζύμωση της ποικιλίας του Μοσχοφίλερου(διακεκομμένες γραμμές: τέλος ζύμωσης για τα αντίστοιχα (χρωματικά) κρασιά).....	99
<u>Διάγραμμα 13</u> : Ποσοστό των συμπλοκοποιημένων, των μονομερών και των πολυμερισμένων ανθοκυανών στα διαλύματα των εκχυλισμάτων φλοιών διαφορετικών συγκεντρώσεων σε ανθοκυάνες, αλλά σταθερής περιεκτικότητας σε καθαρό ροσμαρινικό οξύ (672 ppm)	102
<u>Διάγραμμα 14</u> : Απορρόφηση διαλυμάτων εκχυλισμάτων διαφορετικών συγκεντρώσεων ανθοκυανών, αλλά σταθερής περιεκτικότητας σε καθαρό ροσμαρινικό οξύ στα 520 nm.....	103
<u>Διάγραμμα 15</u> : Ποσοστό των συμπλοκοποιημένων, των μονομερών και των πολυμερισμένων ανθοκυανών σε διαλύματα εκχυλισμάτων φλοιών με συγκέντρωση ανθοκυανών 123.3 ppm και διαφορετικών συγκεντρώσεων σε πρόσθετο ροσμαρινικό οξύ από 0 έως 350 ppm (Ccof/Cantho: ppm ροσμαρινικού οξέος / ppm ανθοκυανών).....	104
<u>Διάγραμμα 16</u> : Μεταβολή των συμπλοκοποιημένων ανθοκυανών στα εμπλουτισμένα εκχυλίσματα φλοιών (μπλε χρώμα: ποσοστό των συμπλοκοποιημένων ανθοκυανών στο εκχύλισμα φλοιών χωρίς πρόσθετο ροσμαρινικό οξύ, πορτοκαλί χρώμα: ποσοστιαία αύξηση των συμπλοκοποιημένων ανθοκυανών με την προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων ροσμαρινικού οξέος)	104
<u>Διάγραμμα 17</u> : Απορρόφηση στα 520 nm των διαφορετικών (ως προς την περιεκτικότητα σε ροσμαρινικό οξύ) διαλυμάτων των εκχυλισμάτων των φλοιών και η αντίστοιχη χρωματική ένταση	105
<u>Διάγραμμα 18</u> : Ποσοστό των συμπλοκοποιημένων, των μονομερών και των πολυμερισμένων ανθοκυανών σε διαλύματα εκχυλισμάτων φλοιών με συγκέντρωση ανθοκυανών 172.5 ppm και διαφορετικών συγκεντρώσεων σε πρόσθετο εκχύλισμα ρίγανης από 0 έως 490 ppm (Ccof/Cantho: ppm πρόσθετου εκχυλίσματος ρίγανης / ppm ανθοκυανών).....	106
<u>Διάγραμμα 19</u> : Μεταβολή των συμπλοκοποιημένων ανθοκυανών στα εμπλουτισμένα εκχυλίσματα φλοιών (μπλε χρώμα: ποσοστό των συμπλοκοποιημένων ανθοκυανών στο εκχύλισμα φλοιών χωρίς πρόσθετο εκχύλισμα ρίγανης, πορτοκαλί χρώμα: ποσοστιαία αύξηση των συμπλοκοποιημένων ανθοκυανών με την προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων εκχυλίσματος ρίγανης)	106
<u>Διάγραμμα 20</u> : Απορρόφηση στα 520 nm των διαφορετικών (ως προς την περιεκτικότητα σε πρόσθετο εκχύλισμα ρίγανης) διαλυμάτων των εκχυλισμάτων των φλοιών και η αντίστοιχη χρωματική ένταση.....	107
<u>Διάγραμμα 21</u> : Απορρόφηση στα 520 nm των κρασιών με διαφορετικές συγκεντρώσεις σε πρόσθετο υδατικό εκχύλισμα από θρούμπι (προσθήκη ως προς ολικά φαινολικά - ppm GAE)	108

<u>Διάγραμμα 22</u> : Περιεκτικότητα των κρασιών σε ολικά φαινολικά εκφρασμένη σε ppm ισοδύναμων γαλλικού οξέος σε συνάρτηση με τον χρόνο	110
<u>Διάγραμμα 23</u> : Περιεκτικότητα των κρασιών σε φλαβαν-3-όλες εκφρασμένη σε ppm ισοδύναμων κατεχίνης σε συνάρτηση με τον χρόνο αποθήκευσης	111
<u>Διάγραμμα 24</u> : Περιεχόμενο των κρασιών σε συστατικά που μπορούν να σχηματίσουν έγχρωμα σύμπλοκα με τις ανθοκυάνες σε συνάρτηση με τον χρόνο αποθήκευσης	112
<u>Διάγραμμα 25</u> : Ποσοστό των συμπλοκοποιημένων ανθοκυανών του κρασιού σε συνάρτηση με τον χρόνο αποθήκευσης	113
<u>Διάγραμμα 26</u> : Ποσοστό των μονομερών ανθοκυανών του κρασιού σε συνάρτηση με τον χρόνο αποθήκευσης	115
<u>Διάγραμμα 27</u> : Ποσοστό των πολυμερισμένων ανθοκυανών σε συνάρτηση με τον χρόνο αποθήκευσης	116
<u>Διάγραμμα 28</u> : Φωτεινότητα (L^*) των κρασιών συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης.....	117
<u>Διάγραμμα 29</u> : Μεταβολή του ολικού χρώματος (ΔE^*) των κρασιών ως προς το κρασί αναφοράς στον χρόνο μηδέν συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης.....	118
<u>Διάγραμμα 30</u> : Μεταβολή της απόχρωσης (h^*) των κρασιών συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης	119
<u>Διάγραμμα 31</u> : Ποσοστό του κίτρινου χρώματος των κρασιών σε συνάρτηση με τον χρόνο αποθήκευσης	120
<u>Διάγραμμα 32</u> : Ποσοστό του κόκκινου χρώματος των κρασιών σε συνάρτηση με τον χρόνο αποθήκευσης	122
<u>Διάγραμμα 33</u> : Ποσοστό του μπλε χρώματος των κρασιών σε συνάρτηση με τον χρόνο αποθήκευσης	123
<u>Διάγραμμα 34</u> : Χρωματική ένταση (CI) των κρασιών σε συνάρτηση με τον χρόνο αποθήκευσης	124
<u>Διάγραμμα 35</u> : Απόχρωση (hue) των κρασιών κατά την διάρκεια της αποθήκευσής τους	125
<u>Διάγραμμα 36</u> : Λαμπρότητα (dA%) των κρασιών κατά την διάρκεια της αποθήκευσής τους..	126

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

<u>Πίνακας 1</u> : Χημική σύσταση των βοστρύχων	13
<u>Πίνακας 2</u> : Χημική σύσταση του φλοιού των ραγών	13
<u>Πίνακας 3</u> : Χημική σύσταση των γιγάρτων των ραγών	14
<u>Πίνακας 4</u> : Επιμέρους ανθοκυάνες των φρέσκων κρασιών των ποικιλιών Αγιωργίτικο και Merlot	100
<u>Πίνακας 5</u> : Επιμέρους φλαβονόλες των φρέσκων κρασιών των ποικιλιών Αγιωργίτικο και Merlot	101
<u>Πίνακας 6</u> : Επιμέρους φαινολικά οξέα των φρέσκων κρασιών των ποικιλιών Αγιωργίτικο και Merlot	101
<u>Πίνακας 7</u> : Σύσταση των αιθανολικών εκχυλισμάτων του θρούμπι και της ρίγανης στο κρασί (ολικά φαινολικά: ισοδύναμα γαλλικού οξέος, ροσμαρινικό-λιθοσπερμικό-σαλβιανολικό οξύ: ισοδύναμα ροσμαρινικού οξέος, λουτεολίνη-: ισοδύναμα κερκετίνης)	109
<u>Πίνακας 8</u> : Απορρόφηση των κρασιών στα 420 nm κατά τη διάρκεια της αποθήκευσής τους. 121	
<u>Πίνακας 9</u> : Απορρόφηση των κρασιών στα 520 nm κατά τη διάρκεια της αποθήκευσής τους. 122	
<u>Πίνακας 10</u> : Απορρόφηση των κρασιών στα 620 nm κατά τη διάρκεια της αποθήκευσής τους 123	

Εισαγωγή

Το αμπέλι είναι, ίσως, από τα παλαιότερα φυτά που παρουσιάστηκαν στη γη και η χρησιμοποίηση των καρπών του, των σταφυλιών, για την παραγωγή κρασιού χρονολογείται περίπου στο 3000 π.Χ.. Το κρασί είναι το αποτέλεσμα της ζύμωσης του χυμού των σταφυλιών, του γλεύκους, από τους ζυμομύκητες, οι οποίοι κυρίως μετατρέπουν τα σάκχαρα του γλεύκους σε αιθανόλη. Η δημοτικότητα του συγκεκριμένου αλκοολούχου ποτού είναι υψηλή σχεδόν σε όλον τον κόσμο, και γι' αυτό η οινοβιομηχανία είναι ένας κλάδος που βρίσκεται ακόμα σε εξέλιξη. Η Ελλάδα, λόγω του κλίματός της και των διαφόρων γηγενών ποικιλιών που καλλιεργούνται σε διάφορα μέρη της, παράγει πολλά κρασιά ανώτερης ποιότητας. Εκτός της γνωστής ιδιότητας του κρασιού που περνά από γενιά σε γενιά μέσω του ρητού «οίνος ευφραίνει καρδίαν ανθρώπου», η μέτρια κατανάλωσή του σε καθημερινή βάση έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να έχει θετικές επιπτώσεις στην υγεία.

Το κρασί είναι ένα πολυσύνθετο μίγμα οργανικών και ανόργανων συστατικών. Ανάμεσα στις διάφορες ουσίες που περιέχονται ξεχωρίζουν οι φαινολικές ενώσεις, αφού διαδραματίζουν σημαντικό και πολυδιάστατο ρόλο στην ποιότητα του κρασιού, και κατ' επέκταση στην αποδοχή του από τον καταναλωτή. Οι φαινολικές ενώσεις είναι αυτές που διαφοροποιούν τα λευκά από τα κόκκινα κρασιά, επηρεάζουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους, όπως είναι το χρώμα και η γεύση, ενώ λόγω της αντιοξειδωτικής τους δράσης, η κατανάλωση του κρασιού σε μικρές ποσότητες συσχετίζεται με θετικές για την υγεία ιδιότητες.

Οι επιμέρους χαρακτηριστικές ομάδες των φαινολικών ενώσεων αποτελούνται από τις ανθοκυάνες, οι οποίες δίνουν το χαρακτηριστικό έντονο χρώμα στα κόκκινα κρασιά, τις φλαβον-3-όλες ή κατεχίνες, οι οποίες μαζί με τα πολυμερή τους, προκυανιδίνες και ταννίνες, ευθύνονται για τη στυφή γεύση των κόκκινων κρασιών, τις φλαβονόλες, οι οποίες αποτελούν τις κίτρινες χρωστικές των λευκών και ερυθρών ποικιλιών σταφυλιού και, τέλος, τα φαινολικά οξέα, τα οποία χωρίζονται σε βενζοϊκά και κινναμωμικά. Η συγκέντρωση στο κρασί των επιμέρους αυτών χαρακτηριστικών ομάδων δεν είναι συνάρτηση μόνο της ποικιλίας του σταφυλιού από το οποίο προέρχονται, αλλά και πλήθους παραμέτρων της οινοποίησης, όπως είναι ο χρόνος εκχύλισης, δηλαδή ο χρόνος επαφής των στεμφύλων με το γλεύκος και η χρήση ή όχι πηκτινοληπτικών ενζύμων, η διάρκεια της παλαίωσης, η ατμόσφαιρα αποθήκευσης του κρασιού κλπ. Οι ρυθμοί εκχύλισης των διαφορετικών φαινολικών ομάδων του κρασιού διαφέρουν και είναι συνάρτηση της πολικότητας των μορίων, της θέσης τους στον καρπό του σταφυλιού, του σχήματος της ράγας, του βαθμού ωρίμανσης κλπ.

Η διεργασία της εκχύλισης είναι απαραίτητη στην ερυθρή οινοποίηση για την παραλαβή του χρώματος από τους φλοιούς των σταφυλιών και όλων των άλλων ενώσεων που θα συμπληρώσουν τη δομή του κρασιού και θα επιτρέψουν την παλαίωσή του. Αντίθετα, στην λευκή οινοποίηση δεν πραγματοποιείται ή γίνεται προζυμωτική εκχύλιση κάποιων ωρών για την ποιοτική αναβάθμιση των λευκών κρασιών, τα οποία είναι φτωχά σε φαινολικές ενώσεις.

Λόγω της σημαντικότητας των φαινολικών ενώσεων στην ποιότητα του κρασιού, στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η εκχύλιση των φαινολικών ομάδων σε δύο ελληνικά κόκκινα κρασιά, ένα της ελληνικής ερυθρής ποικιλίας του Αγιωργίτικου (*Vitis vinifera*) και άλλο ένα της ποικιλίας Merlot (*Vitis vinifera*). Επιλέχθηκαν οι δύο αυτές ποικιλίες, αφού η πρώτη είναι μία πολλά υποσχόμενη ερυθρή ποικιλία με έντονο χρώμα και είναι μία από τις πιο γνωστές σε διεθνές επίπεδο ελληνικές ερυθρές ποικιλίες, και η δεύτερη είναι μία διεθνώς αναγνωρισμένη ποικιλία, που καλλιεργείται σχεδόν σε όλη την Ελλάδα και παράγει, συγκριτικά με άλλες ερυθρές ποικιλίες, «μαλακά» κρασιά με χαρακτηριστικό άρωμα μαύρων ώριμων φρούτων. Επίσης, μελετήθηκε η επίδραση της προζυμωτικής εκχύλισης λίγων ωρών στη λευκή οινοποίηση της ελληνικής ποικιλίας του Μοσχοφίλερου (*Vitis vinifera*). Επιλέχθηκε η συγκεκριμένη ποικιλία αφού είναι μία από τις εκλεκτές ελληνικές λευκές ποικιλίες, που δίνει κρασιά με χαρακτηριστικό άρωμα.

Το χρώμα των κόκκινων κρασιών δεν εξαρτάται μόνο από το πλήθος των ανθοκυανών που θα εκχυλιστούν από τους φλοιούς, αλλά και από την εκχύλιση των υπόλοιπων φαινολικών ομάδων, καθώς και από τις συνθήκες αποθήκευσης και εμφιάλωσης. Κατά τη διάρκεια της παλαίωσης το χρώμα των κόκκινων κρασιών μεταβάλλεται και σταθεροποιείται μέσω μίας περίπλοκης σειράς μηχανισμών. Άμεσα, λαμβάνει χώρα το φαινόμενο του σχηματισμού έγχρωμων συμπλόκων (copigmentation), η ένωση δηλαδή των ανθοκυανών με άλλα άχρωμα συστατικά του κρασιού όπως η επικατεχίνη, οι προκυανιδίνες, οι φλαβονόλες, τα κινναμωμικά οξέα και οι εστέρες τους, ενισχύοντας έτσι το χρώμα. Επίσης, στην σταθεροποίηση του χρώματος, η οποία γίνεται βραδέως, συμβάλλει ο πολυμερισμός των ανθοκυανών με φλαβαν-3-όλες και προκυανιδίνες, καθώς και ο σχηματισμός νέων έγχρωμων ενώσεων, όπως οι πυρανοανθοκυάνες.

Αφού το χρώμα αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των κόκκινων κρασιών, στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια ενίσχυσής του μέσω του σχηματισμού έγχρωμων συμπλόκων. Για το λόγο αυτό, προστέθηκαν ξηρά αιθανολικά εκχυλίσματα δύο ελληνικών αρωματικών φυτών που ανήκουν στην οικογένεια *Lamiaceae* (*Satureja thymbra*, *Origanum vulgare* ssp. *Hirtum*) σε φρέσκο κρασί της ποικιλίας Merlot. Και τα δύο εκχυλίσματα περιείχαν υψηλά ποσοστά ροσμαρινικού οξέος (σύνθετο κινναμωμικό οξύ), οπότε κρίθηκε σκόπιμη και η προσθήκη καθαρού ροσμαρινικού οξέος στο κρασί για σύγκριση. Μελετήθηκαν τα χρωματικά χαρακτηριστικά των κρασιών αυτών κατά την αποθήκευση, καθώς και το ποσοστό των συμπλοκοποιημένων ανθοκυανών.

Συνεπώς, η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία έχει ως στόχο να διερευνήσει τον εμπλουτισμό του κρασιού σε φαινολικό φορτίο κατά την οινοποίηση, αλλά και τη δυνατότητα ανάπτυξης εντονότερου χρώματος κατά τη μεταζυμωτική περίοδο. Με τον τρόπο αυτό, βελτιώνονται κάποιες ποιοτικές παράμετροι του κρασιού (χρώμα, γεύση, σώμα) αλλά και κάποιες τεχνολογικές (αντοχή στο χρόνο).

1. Το σταφύλι και το κρασί

Κρασί είναι το ποτό, το οποίο προέρχεται από τη μερική ή ολική αλκοολική ζύμωση νωπών σταφυλιών. Η Ευρωπαϊκή ένωση δίνει τον ορισμό: «κρασί καλείται το προϊόν που παράγεται αποκλειστικά με αλκοολική ζύμωση, ολική ή μερική, νωπών σταφυλιών, σπασμένων ή όχι, ή γλεύκους σταφυλιών». Ορίζεται, δηλαδή, από το νόμο ότι το σταφύλι είναι η πρώτη ύλη της οινοβιομηχανίας.

Το σταφύλι αποτελείται από τους βόστρυχους και τις ράγες. Οι βόστρυχοι, που ονομάζονται κοτσάνια, έχουν διπλό φυσιολογικό ρόλο. Μεταφέρονται μ' αυτούς οι θρεπτικές ουσίες στους καρπούς και κρατάνε τις ράγες. Οι ράγες αποτελούνται από το φλοιό, τη σάρκα και τα γίγαρτα (κουκούτσια). Το σταφύλι περιλαμβάνει 3-6.5% βοστρύχους και 93.5-97% ράγες. Οι ράγες αποτελούνται από 7-12% φλοιό, 83-87% σάρκα και 2-6% γίγαρτα. Ο φλοιός χαρακτηρίζει την οινική ποιότητα της ποικιλίας, λόγω των αρωματικών ουσιών και χρωστικών που έχει. Η ποιότητα, όμως, εξαρτάται από την ωρίμανση του σταφυλιού, την υγεία και το φορτίο του ανά φυτό (Τσέτουρας 2008).

1.1. Χημική σύσταση του σταφυλιού

Η χημική σύσταση των βοστρύχων, των φλοιών και των γιγάρτων των ραγών παρουσιάζονται στους Πίνακες 1, 2 και 3:

Πίνακας 1: Χημική σύσταση των βοστρύχων

Νερό (ανάλογα με το βαθμό ωρίμανσης)	65-85%
Σάκχαρα	1%
Ταννίνες	2-4%
Αζωτούχες ουσίες	1-1.5%
Ανόργανες ουσίες	2-2.5%
Ρητίνες	1%
Διάφορα οργανικά οξέα	0.5-2%

Τα ανόργανα συστατικά του βοστρύχου αποτελούνται από άλατα φωσφορικά, ασβεστίου και καλίου.

Πίνακας 2: Χημική σύσταση του φλοιού των ραγών

Νερό	75-80%
Όξινα συστατικά	1-1.5%
Ανόργανες ουσίες	1.5-2%
Ταννίνες	1-2%
Αζωτούχες ουσίες	1.5-2%
Διάφορες ουσίες	10-15%

Πίνακας 3: Χημική σύσταση των γιγάρτων των ραγών

Νερό	36-40%
Όξινα συστατικά	1%
Ανόργανες ουσίες	2-4%
Ταννίνες	5-8%
Αζωτούχες ουσίες	5%
Διάφορες ουσίες	10-15%
Ελαιώδεις ουσίες	10-20%
Υδρογονάνθρακες	34-36%

Η σάρκα των ραγών είναι το κύριο συστατικό του γλεύκους. Ο χυμός των κυττάρων της είναι περίπου το 99.5% και οι κυτταρικές μεμβράνες το 0.5%. Η σάρκα συνήθως περιέχει 65-80% νερό και 17-25% ζυμώσιμα σάκχαρα. Περιέχει, επίσης, οργανικά οξέα, αζωτούχες ενώσεις, ανόργανα άλατα, πηκτινικές ουσίες, ταννίνες και αρωματικές ουσίες, πολύ λιγότερες όμως από το φλοιό. Τα ζυμώσιμα σάκχαρα και τα οργανικά οξέα προσδίδουν στο κρασί τη γευστική του ισορροπία (Τσέτουρας 2008).

1.2. Στάδια ανάπτυξης του σταφυλιού

Μετά την καρπόδεση, κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού, ολοκληρώνεται η κανονική ανάπτυξη του σταφυλιού. Σημαντικό ρόλο παίζουν η θερμοκρασία, οι βροχές, καθώς και η ισορροπημένη θρέψη. Σε όλο το διάστημα αυτής της περιόδου, οι ράγες είναι σκληρές και πράσινες, λόγω της άφθονης χλωροφύλλης που υπάρχει στους φλοιούς τους. Ο βόστρυχας παίρνει τις οριστικές του διαστάσεις.

Το γυάλισμα (ή αλλιώς φούσκωμα ή περκασμός) του σταφυλιού είναι το χαρακτηριστικό στάδιο της ανάπτυξής του. Τότε αρχίζει η βαθμιαία διάσπαση της χλωροφύλλης του φλοιού των ραγών και η προοδευτική εμφάνιση της χρώσης, που χαρακτηρίζει την κάθε ποικιλία. Στο στάδιο αυτό οι ράγες αυξάνονται μέχρι το διπλάσιο περίπου, αλλάζουν χρώμα και γίνονται μεταβολές στα σάκχαρα, τις χρωστικές και σε άλλα χαρακτηριστικά που δίνουν τη γεύση, το άρωμα και τις ξεχωριστές ιδιότητες κάθε ποικιλίας. Οι ράγες γίνονται πιο μαλακές και ελαστικές και εμπλουτίζονται σε σάκχαρα. Η συσσώρευση των σακχάρων στη ράγα προκαλεί οσμωτική έλξη νερού, με αποτέλεσμα τη γρήγορη διόγκωση των ραγών και τη μείωση της οξύτητας. Η μείωση της οξύτητας οφείλεται στην αραίωση και την εξουδετέρωση που παθαίνουν τα οξέα της ράγας από το νερό και τα περιεχόμενα σε αυτό ανόργανα στοιχεία.

Το στάδιο της ωρίμανσης του σταφυλιού είναι το τέλος του ετήσιου κύκλου ζωής του αμπελιού. Η ωρίμανση αρχίζει αμέσως μετά το στάδιο του γυαλίσματος και διακρίνεται σε φυσιολογική και τεχνολογική ωρίμανση. Φυσιολογική ωρίμανση ονομάζεται η στιγμή κατά την οποία τα γίγαρτα είναι ικανά να βλαστήσουν και να δώσουν νέα φυτά, ενώ τεχνολογική είναι η

στιγμή κατά την οποία η ποσότητα των σακχάρων στο χυμό έχει φτάσει ένα μέγιστο, ενώ τα οξέα, τα αρωματικά και τα φαινολικά συστατικά βρίσκονται σε επιθυμητά επίπεδα. Η τεχνολογική ωρίμανση είναι αυτή που καθορίζει την έναρξη του τρύγου. Το στάδιο της ωρίμανσης περιλαμβάνει την αύξηση της συγκέντρωσης των σακχάρων, τη μείωση της οξύτητας, την αύξηση του μεγέθους των ραγών και τον σχηματισμό των χρωστικών, των ταννινών, καθώς και των αρωματικών ουσιών (Σουφλερός 2000, Τσέτουρας 2008).

Πολλοί παράγοντες επηρεάζουν την ωρίμανση και την ποιότητα των σταφυλιών, που διακρίνονται σε σταθερούς και μεταβλητούς. Στους σταθερούς παράγοντες περιλαμβάνονται η ποικιλία της αμπέλου, το είδος του υποκείμενου (συνίσταται η χρήση υποκείμενου διαφορετικού από το υπέργειο φυτό για λόγους αυτοπροστασίας του φυτού), η ηλικία του φυτού, το κλίμα και το έδαφος της περιοχής που είναι φυτεμένα. Στους μεταβλητούς παράγοντες περιλαμβάνονται οι καιρικές συνθήκες, οι αποστάσεις φύτευσης, οι καλλιεργητικές τεχνικές και οι διάφορες ασθένειες που μπορεί να προκύψουν κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου (Σουφλερός 2000).

1.3. Σύσταση του γλεύκους

Το γλεύκος αποτελείται από 65-80% νερό και 17-25% σάκχαρα. Το υπόλοιπο 5-6% αποτελείται από διάφορες ουσίες υπό διάλυση, όπως οργανικά οξέα (τρυγικό, μηλικό, κιτρικό κ.α.), ανόργανα συστατικά (άλατα των ανόργανων οξέων με μέταλλα ασβεστίου, καλίου, μαγνησίου, μαγγανίου, σιδήρου, αργιλίου, νατρίου), αζωτούχες ενώσεις, πηκτινικές ουσίες, φαινολικά συστατικά (κυρίως ταννίνες και χρωστικές ουσίες), αρωματικές ουσίες, διάφορα ένζυμα και, τέλος, βιταμίνες, οι οποίες παίζουν σπουδαίο ρόλο επειδή είναι πρόσθετοι παράγοντες ανάπτυξης των ζυμομυκήτων της αλκοολικής ζύμωσης.

Τα κύρια σάκχαρα του γλεύκους είναι η γλυκόζη και η φρουκτόζη, των οποίων η αναλογία είναι ίση με 0.95 κατά την ωρίμανση. Η περιεκτικότητα των σακχάρων στο γλεύκος είναι αντιστρόφως ανάλογη με την περιεκτικότητα σε οξέα. Το αυξημένο ποσοστό των οξέων στο κρασί δίνει ευχάριστη γεύση, συντελεί στη διατήρησή του και αποτρέπει τα διάφορα θολώματα. Τα κύρια οργανικά οξέα που περιέχονται στο γλεύκος είναι το τρυγικό, το μηλικό και το κιτρικό με προέλευση το σταφύλι, το ηλεκτρικό και το γαλακτικό που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και το πτητικό οξικό οξύ. Από τα παραπάνω οξέα το μηλικό, το τρυγικό, το κιτρικό και το γαλακτικό οξύ, τα οποία περιέχουν στο μόριό τους ομάδες υδροξυλίων, έχουν την ιδιότητα να δεσμεύουν το σίδηρο, με αποτέλεσμα να αποφεύγονται τα θολώματα σιδήρου (Τσέτουρας 2008, Σουφλερός 2000).

Τα ανόργανα συστατικά σχηματίζονται στους βλαστούς του φυτού και μετακινούνται στη συνέχεια στα σταφύλια, απ' όπου τελικά περνούν στο γλεύκος. Οι ανόργανες ουσίες διακρίνονται σε ανιόντα και κατιόντα. Τα κυριότερα ανιόντα που περιέχονται στο γλεύκος είναι ανιόντα Cl^- με ανώτερο επιτρεπτό όριο στο κρασί 0.5 g/L NaCl , ανιόντα SO_4^{2-} σε περιεκτικότητα 0.1-0.4 g/L K_2SO_4 , η οποία αυξάνεται με την προσθήκη θειώδη ανυδρίτη και ανιόντα PO_4^{3-} . Τα φωσφορικά οξέα συμμετέχουν στους ενδιάμεσους μεταβολισμούς και στις κυριότερες χημικές μεταβολές του κρασιού. Η σπουδαιότητα που παρουσιάζει ο φώσφορος οδηγεί μερικές φορές στην προσθήκη

φωσφορικού αμμωνίου στο γλεύκος για την διευκόλυνση της αλκοολικής ζύμωσης. Η προσθήκη, όμως, αυτή μπορεί να προκαλέσει το «λευκό θόλωμα» στα λευκά κρασιά, αφού το φωσφορικό ιόν, κυρίως παρουσία αέρα, μπορεί να σχηματίσει με τον τρισθενή σίδηρο (Fe^{+++}) ένα αδιάλυτο ίζημα. Επομένως, εάν υπάρχει περίσσεια σιδήρου προστίθεται θεικό αμμώνιο και όχι φωσφορικό.

Τα κατιόντα που περνούν στο γλεύκος και στο κρασί είναι κατιόντα K^+ με περιεκτικότητα 0.1-0.8 g/L και παρουσιάζουν ιδιαίτερο τεχνολογικό ενδιαφέρον υπό τη μορφή του όξινου τρυγικού καλίου, κατιόντα Na^+ σε περιεκτικότητα 20-200 mg/L, η οποία αυξάνονται με την προσθήκη θειώδη ανυδρίτη ή μπεντονίτη κακής ποιότητας, κατιόντα Ca^{++} σε περιεκτικότητα 80-100 mg/L και Mg^{++} σε περιεκτικότητα 80-120 mg/L. Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα κατιόντα $\text{Fe}^{++}/\text{Fe}^{+++}$ και $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{++}$ λόγω του ότι παρουσιάζουν θολώματα στο κρασί αν βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις. Ο σίδηρος έχει περιεκτικότητα στο γλεύκος 2-5 mg/L, αλλά φτάνει στο κρασί μέχρι 40-50 mg/L. Η αναλογία δισθενή και τρισθενή σιδήρου μεταβάλλεται ανάλογα με το δυναμικό οξειδοαναγωγής του κρασιού. Ο αερισμός μετατρέπει το δισθενή σε τρισθενή, μορφή η οποία δίνει αδιάλυτες ενώσεις με τις χρωστικές του κρασιού και το φωσφορικό οξύ (σιδηρικό θόλωμα σε περιεκτικότητα $\text{Fe}^{+++} > 12$ mg/L). Το γλεύκος είναι πλούσιο σε χαλκό λόγω των διαφόρων ψεκασμών του αμπελιού. Αυξάνεται κατά την οινοποίηση, όπως και ο σίδηρος, λόγω της επαφής του γλεύκους με σωληνώσεις και κρονούς, και φτάνει τελικά σε περιεκτικότητα 0.1-5 mg/L. Σε αναγωγικό περιβάλλον (έλλειψη αέρα) επικρατεί ο μονοσθενής χαλκός, ο οποίος σχηματίζει ενώσεις με το θεικό οξύ και προκαλεί θολώματα, όταν η συγκέντρωσή του είναι μεγαλύτερη από 0.5 mg/L (Σουφλερός 2000).

Τα ένζυμα που έχουν βρεθεί στο γλεύκος είναι οξειδωτικά, πηκτινολυτικά, πρωτεολυτικά κ.α. Αυτά είναι κυρίως οι καταλάσες, οι οξειδάσες, οι ιμπερτάσες, οι πρωτεάσες, οι πηκτινάσες, οι εστεράσες, οι ταννάσες κ.α. Τα περισσότερα βρίσκονται στον φλοιό των ραγών. Ορισμένα ένζυμα είναι ανεπιθύμητα (οξειδωτικά), ενώ άλλα βοηθούν στην εκχύλιση, στην ομαλή ζύμωση, στη διαύγαση ή στο σχηματισμό εστέρων που είναι υπεύθυνοι για το άρωμα των κρασιών. Η ιμπερτάση, που υδρολύει την σακχαρόζη σε γλυκόζη και φρουκτόζη, βρίσκεται σε αφθονία στις ράγες του σταφυλιού, απ' όπου περνάει στο γλεύκος. Η ποσότητα του ενζύμου αυτού γίνεται ακόμη μεγαλύτερη κατά την αλκοολική ζύμωση ή προς το τέλος αυτής, γιατί παράγεται και από τις ζύμες. Με το πέρασμα του χρόνου, η δραστηριότητά της μειώνεται προοδευτικά, αλλά μερικές φορές εξακολουθεί να διατηρείται ακόμη και στα παλαιά κρασιά (Σουφλερός 2000).

Οι οξειδάσες (υπεροξειδάσες και πολυφαινυλοξειδάσες), επίσης, προέρχονται από το σταφύλι και εντοπίζονται κυρίως στο φλοιό των ραγών. Τα οξειδωτικά ένζυμα που εμπλέκονται στην οξείδωση των φαινολικών συστατικών είναι οι πολυφαινυλοξειδάσες, οι οποίες χαρακτηρίζονται από την παρουσία χαλκού. Τα ώριμα και υγιή σταφύλια περιέχουν την τυροσινάση (*ορθο*-διφαινυλοξειδάση). Εκτός από την τυροσινάση, στην κατηγορία των πολυφαινυλοξειδασών ανήκει και η λακκάση (*παρα*-διφαινυλοξειδάση) που βρίσκεται σε σταφύλια προσβεβλημένα από τον *Botrytis cinerea*. Τα ένζυμα αυτά είναι υπεύθυνα για το καφέτισμα των γλευκών και των λευκών κρασιών, για το κεραμιδί χρώμα που αποκτούν τα νέα κόκκινα κρασιά, για το οξειδωτικό θόλωμα των κρασιών κ.α. Οι οξειδάσες αυξάνουν σημαντικά

την ταχύτητα κατανάλωσης του οξυγόνου από τα γλεύκη και στο στάδιο αυτό η χημική οξείδωση είναι ουσιαστικά αμελητέα (Συμεού 2010).

Τα φαινορικά συστατικά αποτελούνται κυρίως από τις ανθοκυάνες, οι οποίες δίνουν το χαρακτηριστικό έντονο χρώμα στα κόκκινα κρασιά, τις κατεχίνες, οι οποίες μαζί με τα πολυμερή τους, προκυανιδίνες και ταννίνες, ευθύνονται για τη στυφή γεύση των κόκκινων κρασιών, τις φλαβονόλες, οι οποίες αποτελούν τις κίτρινες χρωστικές των λευκών και ερυθρών ποικιλιών σταφυλιού και, τέλος, τα φαινορικά οξέα. Οι φαινολικές ουσίες του γλεύκους και του κρασιού θα εξετασθούν σε ιδιαίτερο κεφάλαιο, καθώς αποτελούν το κύριο αντικείμενο εξέτασης της παρούσας διπλωματικής.

1.4. Αλκοολική ζύμωση

Αλκοολική ζύμωση είναι το βιοχημικό φαινόμενο, κατά το οποίο τα σάκχαρα μετατρέπονται από τα ένζυμα των ζυμών σε οινόπνευμα και παράγεται διοξείδιο του άνθρακα και θερμότητα (περίπου 24 kcal/mole γλυκόζης). Η μετατροπή αυτή παρατηρείται στους σακχαρούχους χυμούς των καρπών, περιλαμβάνει περίπου 30 ξεχωριστές αντιδράσεις και συνοψίζεται στην εξίσωση του Gay-Lussac:



Σχηματίζονται και διάφορα άλλα παραπροϊόντα, αλλά σε πολύ μικρές ποσότητες, όπως γλυκερίνη, οξέα, ζυμέλαια (ανώτερες αλκοόλες), αλδεϋδες, εστέρες κ.α.

Κατά την αλκοολική ζύμωση παράγονται μεγάλες ποσότητες διοξειδίου του άνθρακα, το οποίο αυξάνει τον όγκο του γλεύκους κατά 20%. Από 200 L γλεύκους με περιεκτικότητα σε σάκχαρα 20%, εκλύονται 10 m³ διοξείδιο του άνθρακα. Ένα μέρος διαλύεται στο γλέυκος, ενώ το μεγαλύτερο αποβάλλεται στο περιβάλλον. Η διαλυτότητά του στα κόκκινα κρασιά είναι 0.1-0.5 g/L και στα λευκά 0.5-1 g/L.

Κατά την αλκοολική ζύμωση παρατηρείται αύξηση της θερμοκρασίας και μείωση του ειδικού βάρους. Έτσι, πρέπει να ελέγχεται η πυκνότητα του γλεύκους για την παρακολούθηση της αλκοολικής ζύμωσης, και η θερμοκρασία, αφού οι πιο κατάλληλες θερμοκρασίες για τη λευκή οινοποίηση είναι 16-20 °C και για την ερυθρή 25-30 °C.

Στην αρχή η ζύμωση είναι ζωηρή, και καθώς συνεχίζεται αυξάνεται ο αλκοολικός βαθμός και η ζύμωση μετριάζεται. Όταν ο αλκοολικός τίτλος φτάσει στο 11-12% v/v η ζύμωση γίνεται βραδεία, επειδή περιορίζεται η ανάπτυξη και ο πολλαπλασιασμός των ζυμομυκήτων.

Οι ικανότητες των διαφόρων ειδών την ζύμης, ως προς την ταχύτητα και την αποτελεσματικότητα της ζύμωσης, την αντίσταση στα ποσοστά της παραγόμενης αιθανόλης, τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των κρασιών κ.α., έχουν αυξήσει το ενδιαφέρον των οινοποιών για την ελεγχόμενη αλκοολική ζύμωση με επιλεγμένα είδη ζυμών. Συνήθως, ο εμβολιασμός του γλεύκους γίνεται με τους ζυμομύκητες *Saccharomyces cerevisiae* και *bayanus*, οι οποίοι έχουν μεγάλα ποσοστά βιωσιμότητας (Τσέτουρας 2008).

1.5. Μηλογαλακτική ζύμωση

Μηλογαλακτική ζύμωση είναι η μετατροπή του μηλικού οξέος ($C_4H_6O_5$) σε γαλακτικό οξύ ($C_3H_6O_3$), από τα γαλακτικά βακτήρια, με σύγχρονη παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα. Τα γαλακτικά βακτήρια από το σταφύλι περνούν στο γλεύκος, όπου με την παραγωγή της αλκοόλης, ο πληθυσμός τους μειώνεται και επιζούν μόνο τα πιο ανθεκτικά, τα οποία προς το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης, και εφόσον οι συνθήκες είναι ευνοϊκές, πραγματοποιούν τη μηλογαλακτική ζύμωση.

Η μηλογαλακτική ζύμωση εξασφαλίζει βιολογική σταθερότητα στα κρασιά και είναι απαραίτητη για τα κόκκινα που προορίζονται για παλαίωση. Στα λευκά και ροζέ κρασιά δεν είναι επιθυμητή, επειδή το μηλικό οξύ που περιέχουν (1-2.5 g/L) διατηρεί τη φρουτώδη γεύση και τη φρεσκάδα του νέου κρασιού. Από οινοτεχνικής πλευράς, η μηλογαλακτική ζύμωση έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ολικής οξύτητας (κατά 1-2 βαθμούς) και την αύξηση του pH (κατά 0.1), τη βακτηριακή σταθεροποίηση των κρασιών και τη βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών τους. Μετά την εξαφάνιση του μηλικού οξέος, τα γαλακτικά βακτήρια προσβάλλουν το κιτρικό οξύ και σχηματίζουν οξικό οξύ, με αποτέλεσμα την μικρή αύξηση της πτητικής οξύτητας.

Η μηλογαλακτική ζύμωση ευνοείται σε θερμοκρασίες 21-27 °C, και απουσία θειώδη ανυδρίτη, αφού προσθήκη 10 g/hL σκοτώνει τα γαλακτικά βακτήρια. Πρέπει να αρχίζει αμέσως μετά την αλκοολική ζύμωση και να τελειώνει όσο το δυνατόν ταχύτερα. Η έναρξή της συνήθως γίνεται ύστερα από εμβολιασμό με γαλακτικά βακτήρια. Η παρακολούθησή της γίνεται με χρωματογραφία χάρτου, μέχρι να εξαφανισθεί το μηλικό οξύ. Μόλις τελειώσει η μηλογαλακτική ζύμωση πρέπει αμέσως να προστεθεί στο κρασί θειώδης ανυδρίτης για την αναστολή της δράσης των γαλακτικών βακτηρίων, γιατί είναι δυνατόν να προσβάλλουν τα υπόλοιπα σάκχαρα (αραβινόζη, ξυλόζη), που δεν ζυμώνονται, τη γλυκερίνη, το τρυγικό και το κιτρικό οξύ και να δημιουργηθούν ασθένειες στο κρασί (Τσέτουρας 2008).

1.6. Το κρασί και τα οφέλη του στην υγεία

Η ευεργετική επίδραση του κρασιού στην υγεία έχει αναγνωριστεί εδώ και αιώνες. Ο Ιπποκράτης συνιστούσε ειδικά κρασιά ως αντιπυρετικά, διουρητικά ή απολυμαντικά πληγών, αλλά και ως διατροφικά πρόσθετα, ήδη από το 450 π.Χ. περίπου. Οι περισσότεροι παθογόνοι παράγοντες που απειλούν τον άνθρωπο εξουδετερώνονται ή εξαλείφονται από τα οξέα και την αιθανόλη του κρασιού. Για αυτούς τους λόγους, μέχρι τον 18^ο αιώνα, το κρασί θεωρείτο ασφαλέστερο ποτό από το νερό.

Η τυπική διαίτα των κατοίκων της νότιας Γαλλίας περιλαμβάνει μεγάλες ποσότητες τυριών, βουτύρου, αυγών, κρεάτων και άλλων φαγητών με μεγάλη περιεκτικότητα σε λίπη και χοληστερόλη. Αν και θα έπρεπε αυτή η διαίτα να ευνοεί τις καρδιακές παθήσεις, εν τούτοις αποδείχθηκε ότι το ποσοστό τους ήταν εξαιρετικά χαμηλότερο αυτού των ΗΠΑ και αυτό ήταν το ονομαζόμενο «Γαλλικό Παράδοξο». Η τακτική, αλλά μέτρια κατανάλωση κρασιού

αποκαλύφθηκε ότι ήταν ο καθοριστικός παράγοντας του Γαλλικού Παράδοξου. Η καθημερινή μέτρια κατανάλωση κόκκινου κρασιού δρα προστατευτικά και προληπτικά κατά της στεφανιαίας νόσου αλλά και σε πολλές μορφές καρκίνου. Τούτο οφείλεται στα φλαβονοειδή που περιέχονται στο κόκκινο κρασί, τα οποία ενεργούν ως αντιοξειδωτικά, εμποδίζοντας τις ελεύθερες ρίζες να βλάψουν τα κύτταρα. Κάποια ειδικά συστατικά των φλαβονοειδών αποδείχτηκε πρόσφατα ότι εμποδίζουν τη σκλήρυνση των αρτηριών.

Όπως απέδειξαν περισσότερες από 400 μελέτες σε όλο τον κόσμο, πολλές από αυτές μακροχρόνιες και σε μεγάλα δείγματα, άτομα βασικά υγιή που καταναλώνουν μέτριες ποσότητες κρασιού τακτικά, ζουν περισσότερο. Οι βασικοί ευεργετικοί παράγοντες από την κατανάλωση του κρασιού, αποδείχτηκε ότι είναι το μέτρο και η τακτική και συστηματική κατανάλωσή του. Έτσι, το κρασί, κυρίως με τα φαινολικά συστατικά που περιέχει, έχει θετικές επιδράσεις στην καρδιά και στις καρδιαγγειακές παθήσεις, μειώνοντας τον κίνδυνο θανάτου από τη στεφανιαία νόσο, βοηθά στη ρύθμιση της πίεσης του αίματος, μειώνει τον κίνδυνο ανάπτυξης διαβήτη τύπου 2 και βελτιώνει τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα. Επίσης, βοηθά τα άτομα που πάσχουν από αρθρίτιδες και δυσκοιλιότητες, και ανακουφίζει άμεσα από τη γρίπη και τη δυσκοιλιότητα.

Το κρασί σε μικρή ποσότητα, είναι ένα ήπιο ηρεμιστικό, που ελαττώνει το άγχος και περιορίζει την ένταση. Ως μέρος της καθημερινής διαίτας, το κρασί δρα ως ορεκτικό, και δίνει στο σώμα ενέργεια, ουσίες που υποβοηθούν την πέψη, μικρές ποσότητες βιταμινών, καθώς και αντιοξειδωτικές ουσίες όπως είναι η ρεσβερατρόλη, που περιέχεται στο κόκκινο κρασί. Έχει αποδειχθεί ότι η ρεσβερατρόλη εμποδίζει την ανάπτυξη μιας πρωτεΐνης που οδηγεί στην ασθένεια της καρδιακής ίνωσης, που ελαττώνει την αντλητική ικανότητα της καρδιάς όταν την χρειάζεται περισσότερο, δηλαδή σε περιπτώσεις άγχους. Μελέτες έδειξαν ότι η ρεσβερατρόλη επεκτείνει την ζωή των κυττάρων και δρα αντιγηραντικά. Έχει, επίσης, παρατηρηθεί πως αναστέλλει την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του μαστού, του παχέος εντέρου, του προστάτη και του στόματος. Καταπολεμά, επίσης, τον καρκίνο αναστέλλοντας μια πρωτεΐνη, την NF – kappaB, η οποία προστατεύει τα καρκινικά κύτταρα κατά την αντικαρκινική δράση της χημειοθεραπείας. Δρα ουσιαστικά ως αντιβιοτικό, που αποτρέπει τα υγιή κύτταρα να μετατραπούν σε καρκινικά και διακόπτει την εξάπλωση των κακοηθειών.

Τέλος, κρατώντας το κρασί στο στόμα ανεβάζουμε τη θερμοκρασία του, επιτρέποντας την απελευθέρωση όλων των αρωματικών στοιχείων της συγκεκριμένης ποικιλίας αλλά και την επαφή με όλα τα τμήματα της στοματικής κοιλότητας. Προκαλείται έτσι η αίσθηση της φυσικής απόλαυσης και η έκκριση σάλιου. Αυτή η διαδικασία διεγείρει τη ροή πεπτικών υγρών και ιδιαίτερα της πτυαλίνης, ενζύμου που βοηθά στην απορρόφηση από τον οργανισμό των υδατανθράκων και των αμυλούχων ουσιών, επιταχύνοντας την πέψη (Αναστασοπούλου & Σαββίδου 2012).

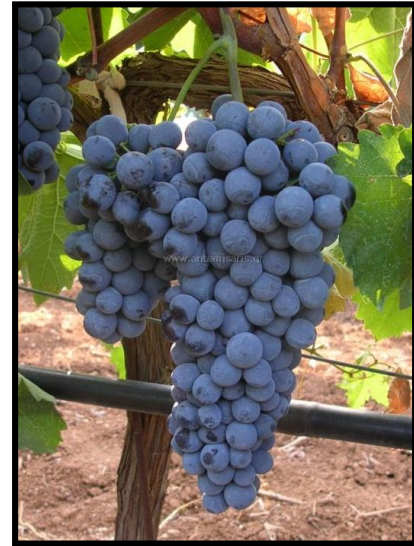
1.7. Η πρώτη ύλη της οινοποιίας

Η πρώτη ύλη της οινοποιίας είναι τα κρασοστάφυλα. Οι ποικιλίες που καλλιεργούνται στην Ελλάδα είναι πολλές. Οι ιδιότητες και οι χαρακτήρες των ποικιλιών έχουν μεγάλη σημασία για την οινοβιομηχανία, αφού διαμορφώνουν την ποιότητα των κρασιών. Στην Ελλάδα καλλιεργούνται ποικιλίες ενδογενείς, αλλά και άλλες ξενικής προέλευσης.

1.7.1. Ελληνικές ποικιλίες

Αγιωργίτικο: Είναι μία από τις ευγενέστερες Ελληνικές ερυθρές ποικιλίες. Καλλιεργείται αποκλειστικά στην περιοχή της Νεμέας, λόγω της άριστης προσαρμογής της. Είναι πολυδύναμη ερυθρή ποικιλία, δηλαδή μπορεί να δώσει πάνω από ένα τύπο κρασιού. Σε περιοχές με μικρό υψόμετρο δίνει υψηλόβαθμα κρασιά καλής οξύτητας, με βαθύ ρουμπινί χρώμα, αρκετές ταννίνες και έντονα χαρακτηριστικά. Είναι μία ενδιαφέρουσα ελληνική ποικιλία και λόγω αυτού είναι μία από τις τρεις ποικιλίες που μελετούνται στην παρούσα εργασία.

Την ονομασία προέλευσης «Νεμέα» ανώτερης ποιότητας, δικαιούνται τα κόκκινα ξηρά και γλυκά κρασιά, που προέρχονται από σταφύλια της ποικιλίας Αγιωργίτικο, όταν αυτά καλλιεργούνται στον αμπελώνα της Νεμέας. Ο αμπελώνας αυτός εκτείνεται σε 15 κοινότητες του νομού Κορινθίας και 2 του νομού Αργολίδας και υποβάλλεται στον περιορισμό της στρεμματικής απόδοσης, η οποία δεν πρέπει να ξεπερνά τα 800 kg σταφυλιών. Το σταφύλι είναι μέτριου μεγέθους, κυλινδροκωνικό και πυκνό. Η ράγα είναι μέτρια, σφαιρική, καλυμμένη με άφθονη άχνη, χρώματος βαθύ μπλε. Η φυσική περιεκτικότητα του γλεύκους σε σάκχαρα πρέπει να ανέρχεται τουλάχιστον σε 188 g/L για το ξηρό κρασί και 221 g/L για το γλυκό. Για την απόκτηση λεπτών οργανοληπτικών χαρακτηριστικών επιβάλλεται η παλαίωση του κρασιού σε δρύινα βαρέλια τουλάχιστον για ένα χρόνο.



Εικόνα 1: Αγιωργίτικο

Το γεγονός ότι διακρίνονται δύο τύποι κρασιού, ξηρό και γλυκό, οφείλεται στο διαφορετικό υψόμετρο των αμπελώνων, που κυμαίνεται από τα 250 μέχρι τα 800 m. Τα σταφύλια που καλλιεργούνται σε υψόμετρο 250 m περίπου, δίνουν γλυκά κρασιά με αλκοολικό βαθμό γύρω στο 15% , ενώ αυτά στα 650 m περίπου, δίνουν κόκκινα κρασιά με έντονο χρώμα και εξαιρετικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Τα χαρακτηριστικά των κρασιών που προέρχονται από αμπελώνες, που βρίσκονται σε υψόμετρο μεταξύ 700 και 800 m, δείχνουν ότι θα μπορούσε να παρασκευαστεί ένα από τα πιο εκλεκτά ροζέ ημιαφρώδη κρασιά της χώρας μας, που θα αποτελούσε έναν τρίτο τύπο κρασιού με το τοπωνύμιο Νεμέα (Σουφλερός 2000, Τσέτουρας 2008, Συμεού 2010).

Αηδάνι: Αιγαιοπελαγίτικη ποικιλία η οποία καλλιεργείται στις Κυκλάδες, ιδιαίτερα στη Νάξο, τη Σαντορίνη και την Πάρο. Υπάρχει λευκό και μαύρο αηδάνι. Είναι πολύ παλιά ποικιλία. Αναμειγνύεται με άλλες ποικιλίες για να τις εμπλουτίσει σε άρωμα, όπως το Ασύρτικο. Το Αηδάνι δίνει αρωματικό κρασί με μέτριο αλκοολικό βαθμό και μέτρια οξύτητα.

Αθήρι: Αιγαιοπελαγίτικη λευκή ποικιλία που καλλιεργείται στις Κυκλάδες, στα Δωδεκάνησα και στην Κρήτη. Το κρασί της έχει μέτριο αλκοολικό βαθμό, μικρή οξύτητα και ελαφρά αρώματα. Χρησιμοποιείται μόνη της ή μαζί με άλλες λευκές ποικιλίες, κυρίως με το Ασύρτικο της Σαντορίνης.

Ασύρτικο: Η πιο γνωστή πολυδύναμη ποικιλία του μεσογειακού χώρου. Καλλιεργείται κυρίως στη Σαντορίνη. Η καλλιέργειά της, όμως, επεκτάθηκε σε όλες τις περιοχές της ηπειρωτικής Ελλάδας. Προσαρμόζεται εύκολα σε διαφορετικές εδαφοκλιματικές απαιτήσεις. Δίνει κρασιά εξαιρετικής ποιότητας με υψηλή οξύτητα, υψηλό αλκοολικό βαθμό και χαρακτηριστικό άρωμα.

Βηλάνα: Σπουδαία λευκή ποικιλία της Κρήτης. Δίνει κρασιά της ονομασίας προέλευσης της περιοχής Πεζών με αρωματική ένταση, όγκο και οξύτητα. Όταν το φορτίο ανά πρέμνο είναι μικρό, δίνει μέτριο έως υψηλό αλκοολικό βαθμό και οξύτητα.

Κοτσιφάλι: Ερυθρή ποικιλία της Κρήτης. Καλλιεργείται στις Αρχάνες, τα Πεζά και το Ηράκλειο. Δίνει κρασιά με υψηλό αλκοολικό βαθμό, χαμηλή οξύτητα, ευχάριστη γεύση και άρωμα, αλλά μειονεκτεί στο χρώμα. Συνδυάζεται κατά την οινοποίηση με τη Μανδηλαριά για καλύτερο χρώμα.

Μαλαγουζιά: Λευκή ποικιλία με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά. Καλλιεργείται στη Μακεδονία, στη Στερεά Ελλάδα και στην Πελοπόννησο. Δίνει κρασιά με υψηλό αλκοολικό βαθμό, μέτρια οξύτητα και πλούσιο άρωμα.

Μανδηλαριά: Αιγαιοπελαγίτικη πολυδύναμη ερυθρή ποικιλία. Καλλιεργείται στις Κυκλάδες, στην Κρήτη και στα Δωδεκάνησα. Η καλλιέργειά της επεκτάθηκε στη Μακεδονία, στη Θεσσαλία και στην Πελοπόννησο. Είναι μία από τις πιο πλούσιες ποικιλίες σε χρώμα, γι' αυτό χρησιμοποιείται κατά την οινοποίηση σε συνδυασμό με άλλες ποικιλίες. Δίνει κρασιά μέτριου αλκοολικού βαθμού, μέτριας οξύτητας και πλούσια σε χρώμα.

Μαυρούδι Θράκης: Είναι ερυθρή ποικιλία και έχει γενετική συγγένεια με την ποικιλία Χονδρομαυρούδι της Αχαΐας και το Λιανομαυρούδι των Καλαβρύτων. Παράγει κρασί ερυθρομελανού χρώματος, με έντονα χαρακτηριστικά και πολλά οξέα. Χαρακτηρίζεται από τις πλούσιες γευστικές εντυπώσεις που αφήνει. Πρόκειται για ξεχασμένη ποικιλία, επειδή οινοποιείται μαζί με άλλες τοπικές ποικιλίες. Έχει μεγάλη αντοχή στον περονόσπορο.

Μαυροδάφνη: Πελοποννησιακή ερυθρή ποικιλία που καλλιεργείται πολύ στο νομό Αχαΐας. Διακρίνεται για το ξεχωριστό της άρωμα. Προσφέρει ένα τύπο κρασιού που με το πέρασμα του χρόνου εμφανίζει τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του. Δίνει κρασιά με υψηλό αλκοολικό βαθμό, μέτρια οξύτητα και χαρακτηριστικό άρωμα.

Ξυνόμαυρο: Ερυθρή πολυδύναμη μακεδονική ποικιλία. Πρόκειται για την ευγενέστερη ερυθρή ποικιλία της Βόρειας Ελλάδας, που δίνει κρασιά με υψηλό αλκοολικό βαθμό, πλούσια σε άρωμα, με έντονο χρώμα και υψηλή οξύτητα.

Ροδίτης: Ποικιλία με πολλές παραλλαγές και με χρώμα από λευκό μέχρι ρόδινο. Είναι πολύ παλιά γηγενής ποικιλία, διαδεδομένη σε ολόκληρη την Ελλάδα. Δίνει ισορροπημένα κρασιά σε αλκοόλη και οξύτητα και ξεχωριστό άρωμα.

Ρομπόλα: Λευκή εκλεκτή ποικιλία των Ιόνιων Νησιών. Καλλιεργείται κυρίως στην Κεφαλλονιά. Δίνει κρασιά με υψηλό αλκοολικό βαθμό, καλή οξύτητα και χαρακτηριστικό άρωμα.

Σαββατιανό: Η μεγαλύτερη σε καλλιέργεια ελληνική λευκή ποικιλία. Καλλιεργείται στην Αττική, την Εύβοια και την Βοιωτία. Δίνει κρασιά ισορροπημένα σε αλκοόλη και οξύτητα, εάν γίνει σωστός προσδιορισμός του τρύγου. Χρησιμοποιείται σε μεγάλο βαθμό για την παραγωγή ρετσίνας.

Φιλέρι: Πολυδύναμη ποικιλία της Πελοποννήσου. Παρουσιάζεται σε μαύρα, άσπρα και ερυθρωπά σταφύλια και ονομάζεται Μαυροφίλερο, Ξανθοφίλερο και Μοσχοφίλερο αντίστοιχα. Δίνει κρασιά με υψηλό αλκοολικό τίτλο, καλή οξύτητα και χαρακτηριστικό άρωμα. Το χαρακτηριστικό άρωμα των κρασιών της ποικιλίας του Μοσχοφίλερου είναι ο λόγος που είναι η μία από τις τρεις μελετούμενες ποικιλίες της παρούσας εργασίας.

Η ευγενής ερυθρωπή και ημιαρωματική ποικιλία Μοσχοφίλερο, καλλιεργείται στην καρδιά της Πελοποννήσου και σε υψόμετρο 650 m, όπου εκτείνεται το οροπέδιο της Τρίπολης, και παράγει το λευκό ξηρό κρασί ονομασίας προέλευσης «Μαντινεία» ανώτερης ποιότητας. Το κρασί αυτό χαρακτηρίζεται για τη φρεσκάδα του, το ελαφρύ άρωμά του και είναι ισορροπημένο, αποτελώντας ταυτόχρονα ένα εξαιρετικό κρασί βάσης για την παρασκευή αφρώδους κρασιού.



Εικόνα 2: Μοσχοφίλερο

Η υψηλή περιεκτικότητα σε οξέα (κυρίως το χαμηλό pH) και τ' άλλα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά κάνουν το κρασί της ποικιλίας αυτής να μοιάζει με τα λευκά ξηρά κρασιά της Αλσατίας (Γαλλία) και της Γερμανίας, που προέρχονται από την ποικιλία Riesling. Για την παραγωγή αυτών των κρασιών, η στρεμματική απόδοση των αμπελώνων δεν πρέπει να ξεπερνά τα 900 kg σταφυλιών, η δε περιεκτικότητα του γλεύκους σε σάκχαρα να μην είναι κατώτερη από 188 g/L (Σουφλερός 2000, Τσέτουρας 2008).

Φωκιανό: Ερυθρή ποικιλία με προέλευση τη Μικρά Ασία. Καλλιεργείται σε όλες της περιοχές της ηπειρωτικής και Νησιώτικης Ελλάδας. Δίνει κρασιά με μέτριο αλκοολικό βαθμό, μέτρια οξύτητα, φτωχά σε χρώμα (Τσέτουρας 2008).

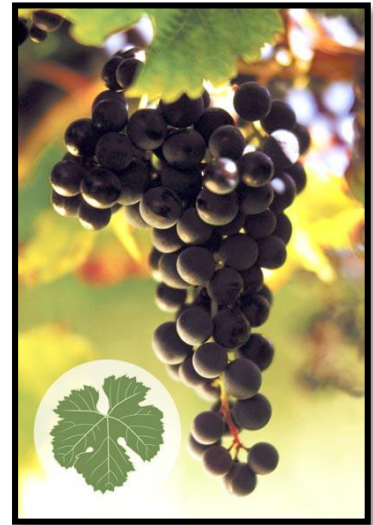
1.7.2. Ξένες ποικιλίες

Grenache: Ερυθρή μεσογειακή ποικιλία, ισπανικής καταγωγής. Καλλιεργείται σε ξηροθερμικές περιοχές. Είναι μία από τις καλύτερες ποικιλίες για κόκκινα κρασιά. Με μικρή στρεμματική απόδοση και στο κατάλληλο γι' αυτήν έδαφος, δίνει κρασί με φρουτώδη αρώματα, υψηλού αλκοολικού βαθμού και εξαιρετικής ποιότητας.

Cabernet sauvignon: Ερυθρή ποικιλία, από τις σημαντικότερες, η οποία συναντάται σ' όλες σχεδόν τις χώρες που παράγουν κρασί. Ωριμάζει σε θερμές σχετικά περιοχές και δίνει κρασί ταννικό, στυφό, με έντονο χρώμα, με μικρό αλκοολικό βαθμό και πολύπλοκο άρωμα. Η υπερωρίμανση των σταφυλιών έχει αρνητικές επιπτώσεις στην οξύτητα και το αρωματικό της δυναμικό. Το κρασί της απαιτεί μακρόχρονη παλαίωση. Το άρωμά του γίνεται όλο και πιο σύνθετο με την πάροδο του χρόνου.

Merlot: Ερυθρή ποικιλία με επιτυχία σε πολλές αμπελουργικές περιοχές του κόσμου. Είναι μία από τις πιο σημαντικές ποικιλίες, η οποία παράγει κρασί με υψηλό αλκοολικό βαθμό, με καλή οξύτητα, σώμα και έντονο άρωμα. Είναι κατάλληλο για παλαίωση. Ως βελτιωτική ποικιλία σε ανάμειξη με άλλα κρασιά, βελτιώνει το χρώμα τους, το άρωμά τους και επιταχύνει το χρόνο παλαίωσης. Είναι μία από τις τρεις ποικιλίες που μελετούνται στην παρούσα εργασία.

Είναι έγχρωμη γαλλική ποικιλία. Στην Ελλάδα συνιστάται για τις αμπελουργικές ζώνες καλλιέργειας των Νομών Κοζάνης, Φλώρινας, Γρεβενών, Λευκάδας, Αχαΐας, Μεσσηνίας και Αρκαδίας. Το σταφύλι είναι μέτριο και κυλινδροκωνικό. Η ράγα είναι σφαιρική, μικρή, με παχύ φλοιό χρώματος κυανού-μαύρου. Πρόκειται για ποικιλία ζωνρή, παραγωγική, σχετικά πρόιμη. Είναι ευαίσθητη στον περονόσπορο, την ανθόρροια και στον παγετό της άνοιξης. Από το γλεύκος της ποικιλίας αυτής παρασκευάζονται κόκκινα κρασιά (τύπου Bordeaux, στην περιφέρεια του οποίου άλλωστε καλλιεργείται) με χαρακτηριστικά γνωρίσματα το άρωμα και την απλότητά τους (Συμεού 2010, Τσέτουρας 2008).



Εικόνα 3: Merlot

Pinot noir: Πολυδύναμη πρόιμη ερυθρή ποικιλία που μπορεί να καλλιεργηθεί παντού με επιτυχία, δίνοντας κρασί πιο όξινο από το Cabernet, αλλά λιγότερο ταννικό. Το παραγόμενο κρασί μετά την παλαίωσή του έχει αρμονική σύνθεση, ευχάριστη γεύση και πλούσιο άρωμα.

Chardonnay: Πολυδύναμη πρόιμη λευκή ποικιλία, καλλιεργείται σε όλα τα γεωγραφικά διαμερίσματα της χώρας. Είναι η εκλεκτότερη και η γνωστότερη ποικιλία στον κόσμο για την παραγωγή λευκών ξηρών κρασιών. Το παραγόμενο λευκό κρασί είναι το πιο κατάλληλο για να ωριμάσει σε δρύινα βαρέλια. Παρουσιάζει ισορροπία μεταξύ της αλκοόλης και της οξύτητας, είναι

πλούσιο σε σώμα, λιπαρό και ο αρωματικός του πλούτος είναι αντιστρόφως ανάλογος με την στρεμματική του απόδοση.

Sinsaut (Σενζώ): Ερυθρή μεσογειακή ποικιλία, καλλιεργείται κυρίως στη Μακεδονία και τη Θράκη. Ποικιλία με μεγάλη αντοχή στη ξηρασία, κατάλληλη για οινοποίηση και παρασκευή κρασιών εξαιρετικής ποιότητας. Η ποιότητα του κρασιού είναι καλή σε μικρές στρεμματικές αποδόσεις. Είναι πλούσια σε σάκχαρα, έχει μέτρια οξύτητα, καλό χρώμα, σώμα και ταννίνες.

Syrah: Ερυθρή ποικιλία εκλεκτής ποιότητας, αρκεί να είναι μικρή η παραγωγή σταφυλιών. Δίνει κρασί με υψηλό βαθμό, ταννικό, με πλούσιο άρωμα. Όταν χρησιμοποιείται μόνη της μπορεί να δώσει σπουδαία κρασιά, επιδεχόμενα παλαίωση.

Sauvignon blanc: Θεωρείται ότι είναι μία από τις πιο εκλεκτές λευκές ποικιλίες. Το παραγόμενο κρασί είναι αρωματικό, με λεπτή γεύση. Έχει χαμηλή οξύτητα και δεν συνδυάζεται στην οινοποίηση με ποικιλίες που έχουν λίγα οξέα. Δίνει ξηρά κρασιά που δέχονται αργή ωρίμανση.

Traminer: Λευκορόδινη ποικιλία ιταλικής προέλευσης. Στην Ελλάδα καλλιεργείται σε μικρή έκταση. Δίνει κρασιά με υψηλό αλκοολικό βαθμό, μέτρια οξύτητα και έντονο άρωμα, όταν είναι μικρή η απόδοση και σωστός ο βαθμός ωριμότητας (Τσέτουρας 2008).

2. Λευκή και ερυθρή οινοποίηση

2.1. Λευκή οινοποίηση

Τα λευκά κρασιά, κατά γενικό κανόνα, παράγονται με τη ζύμωση του γλεύκους που προκύπτει από λευκά σταφύλια και η οποία συμβαίνει αποκλειστικά στο χυμό, χωρίς την παρουσία των στερεών συστατικών του σταφυλιού. Υπάρχουν, βέβαια, περιπτώσεις που το λευκό κρασί παράγεται από ερυθρά σταφύλια και περιπτώσεις όπου η ζύμωση μπορεί να γίνει παρουσία στεμφύλων λευκών ποικιλιών (Σουφλερός 2000).

2.1.1. Κλασική λευκή οινοποίηση

Αρχικά γίνεται ο σωστός προσδιορισμός του τρύγου, όταν η περιεκτικότητα σε σάκχαρα και η ολική οξύτητα είναι στα επιθυμητά επίπεδα. Όταν η ολική οξύτητα βρίσκεται στα 6.5-7.5 g/L σε τρυγικό οξύ, η ζύμωση ευνοείται, καθώς ένα μεγάλος αριθμός παθογόνων και διαφόρων μικροοργανισμών που προκαλούν ασθένειες στα κρασιά δεν δρα σε αυτή την οξύτητα. Σημαντική παράμετρος για την έναρξη του τρύγου είναι, επίσης, η τιμή της ενεργής οξύτητας (pH). Στα γλεύκη που προέρχονται από σταφύλια επιθυμητής ωριμότητας, το pH κυμαίνεται μεταξύ 3.2 - 3.5. Στις τιμές αυτές είναι δύσκολο να δράσουν βακτήρια ή άλλοι παθογόνοι μικροοργανισμοί. Οι διαφορές στις τιμές του pH παίζουν ρόλο στη γευστική ισορροπία των κρασιών και στην ποιότητά τους. Δύο κρασιά με την ίδια ολική οξύτητα μπορεί να έχουν διαφορετικό pH.

Στη λευκή οινοποίηση δεν αποχωρίζονται οι ράγες από τους βόστρυχους. Το κρασί από τα λευκά σταφύλια χωρίς απορραγισμό δεν παρουσιάζει θόλωμα. Όταν γίνεται απορραγισμός παρατηρείται οξειδωτικό θόλωμα στο λευκό κρασί, επειδή δεν προστατεύεται από τις ταννίνες. Το γλεύκος που προέρχεται από λευκά σταφύλια περιέχει δέκα φορές λιγότερες ταννίνες από το γλεύκος των ερυθρών σταφυλιών. Οι ταννίνες που περιέχονται στους βοστρύχους σε ποσοστά 2.5-3.5% έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Σε πολλά οινοποιεία, όμως, συνηθίζεται να γίνεται αποβοστρύχωση και στη λευκή και στην ερυθρή οινοποίηση (Τσέτουρας 2008).

Τα σταφύλια μετά την έκθλιψη τους, οδηγούνται στα στραγγιστήρια, όπου διαχωρίζονται τα στέμφυλα και οι βόστρυχοι από το γλεύκος. Το γλεύκος αυτό, του εκραγισμού χωρίς πίεση, αποτελεί τον πρόρρωγο, από το οποίο παρασκευάζονται τα κρασιά ποιότητας. Είναι το 50-60% του συνολικού γλεύκους. Βρίσκεται ακριβώς κάτω από το φλοιό, στη χυμώδη ζώνη της σάρκας. Τα στέμφυλα και οι βόστρυχοι, καθώς εξέρχονται από τα στραγγιστήρια, περιέχουν επί πλέον ποσότητα γλεύκους, το οποίο λαμβάνεται με συμπίεση στα ασυνεχή πνευματικά πιεστήρια (Εικόνα 4). Τα ασυνεχή πιεστήρια θεωρούνται τα καλύτερα, επειδή η τροφοδότηση δεν είναι συνεχής, η συμπίεση γίνεται σε χαμηλές πιέσεις και σε χρονικά διαστήματα που καθορίζονται ανάλογα με την ποικιλία και την ωριμότητα των σταφυλιών. Από τις πρώτες πιέσεις, λαμβάνεται



Εικόνα 4: Ασυνεχές πνευματικό πιεστήριο

το γλεύκος που βρίσκεται στη μεσαία ζώνη της σάρκας. Περιέχει περισσότερα σάκχαρα και οξέα σε σχέση με τον πρόρρωγο και λιγότερους ευγενείς οργανοληπτικούς χαρακτήρες. Η παραλαβή του γίνεται με μικρές πιέσεις. Με κατάλληλη επεξεργασία δίνει αξιόλογο κρασί. Από τις δεύτερες πιέσεις, λαμβάνεται το γλεύκος από τη κεντρική ζώνη της σάρκας, που περιέχει λιγότερα σάκχαρα, τα περισσότερα οξέα, έχει τραχύτητα και λίγους ευγενείς οργανοληπτικούς χαρακτήρες. Από το γλεύκος αυτό παρασκευάζονται κρασιά κοινής κατανάλωσης. Από τις τελευταίες πιέσεις, λαμβάνεται γλεύκος κατώτερης ποιότητας που δεν χρησιμοποιείται για την παραγωγή κρασιών.

Τα μέρη του γλεύκους που παραλήφθησαν με τις διαδοχικές πιέσεις διαχωρίζονται σε διαφορετικές δεξαμενές (Εικόνα 5), και προστίθεται θειώδης ανυδρίτης που είναι απαραίτητος για την αναστολή της δράσης ανεπιθύμητων μικροοργανισμών, αλλά και για την προστασία από οξειδώσεις, αφού η περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις, που προστατεύουν το γλεύκος από τα οξειδωτικά φαινόμενα, είναι πολύ μικρή. Οι δόσεις κυμαίνονται από 5 έως 20 g/hL, με τις μεγαλύτερες να προστίθενται στα γλεύκη των σταφυλιών που έχουν προσβληθεί από διάφορες ασθένειες και σε περιπτώσεις που η ζύμωση γίνεται σε υψηλές θερμοκρασίες. Η προσθήκη θειώδη ανυδρίτη διευκολύνει και την απολάσπωση που ακολουθεί μετά από 12 μέχρι 24 ώρες, αφού καθυστερεί την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης.

Η απολάσπωση, η διεργασία δηλαδή κατά την οποία απομακρύνεται η οινολάσπη, κρίνεται απαραίτητη στη λευκή οينوποίηση για την ποιοτική βελτίωση των κρασιών. Η οινολάσπη αποτελείται από διάφορα κομματάκια των στερεών συστατικών του σταφυλιού, από χώματα, σκόνες, σάπιες ράγες που έχουν προσβληθεί από βοτρυτή, από πηκτινικές, πρωτεϊνικές και βλενωδείς ουσίες που καταβυθίζονται μαζί με τα άλατα και τις ταννίνες. Η απολάσπωση έχει μεγάλη επιτυχία όταν το γλεύκος εκτεθεί σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των 10 °C. Σε αυτές τις θερμοκρασίες η αλκοολική ζύμωση αργεί να ξεκινήσει και το γλεύκος έχει το χρόνο να ηρεμήσει και να καταβυθιστεί η οινολάσπη στον πυθμένα. Η απολάσπωση μπορεί να γίνει είτε με στατική απολάσπωση είτε με φυγοκέντριση είτε με επίπλευση.



Εικόνα 5: Δεξαμενές με μανδύα ψύξης για τη ρύθμιση της θερμοκρασίας της αλκοολικής ζύμωσης

Κατά την στατική απολάσπωση γίνεται μετάγγιση του καθαρού γλεύκους. Έχει το μειονέκτημα ότι χάνεται ποσότητα από το γλεύκος αλλά δεν απομακρύνονται οι ζύμες, και έτσι η αλκοολική ζύμωση αργότερα εξελίσσεται ικανοποιητικά. Η χρήση πηκτινολυτικών ενζύμων ευνοεί την στατική απολάσπωση, απομακρύνοντας τις πηκτινικές ουσίες που ενεργούν ως προστατευτικά κολλοειδή και εμποδίζουν την καταβύθιση των στερεών συστατικών. Ο όγκος της οινολάσπης αποτελεί το 5-10% του γλεύκους ή και περισσότερο. Η απολάσπωση με φυγοκέντριση γίνεται με φυγόκεντρους αμέσως μετά την εξαγωγή του γλεύκους ή την παραλαβή του μετά από μερική απολάσπωση με τη στατική μέθοδο. Είναι γρήγορη μέθοδος, αλλά απαιτεί ακριβό εξοπλισμό. Δίνει καλά αποτελέσματα, αλλά δεν λαμβάνεται τόσο διαυγές γλεύκος, όπως από μία επιτυχημένη στατική απολάσπωση. Έχει το μειονέκτημα ότι αφαιρεί τις ζύμες. Κατά την απολάσπωση με επίπλευση διοχετεύεται αέριο άζωτο μέσα στη δεξαμενή με το γλεύκος, και δημιουργούνται σύνολα «σωματιδίων-αερίου», που ανέρχονται στην επιφάνεια. Έτσι, η οινολάσπη απομακρύνεται από το πάνω μέρος της δεξαμενής και όχι από τον πυθμένα. Έχει το πλεονέκτημα της προστασίας του γλεύκους από την οξείδωση, λόγω του αδρανούς αερίου.

Μετά την απολάσπωση ακολουθεί ο εμβολιασμός με καθαρή ζύμη 10 έως 20 g/hL. Οι κατάλληλες θερμοκρασίες ζύμωσης για την λευκή οينوποίηση είναι μεταξύ 16 και 20 °C. Δεν πρέπει η ζύμωση να πραγματοποιείται σε υψηλότερες θερμοκρασίες γιατί χάνονται τα φυσικά αρώματα του γλεύκους, τα οποία είναι πτητικά και το κρασί γίνεται ουδέτερο χωρίς άρωμα. Η αργή αλκοολική ζύμωση δίνει πιο αρωματικά κρασιά.

Μετά την αποζύμωση όλων των σακχάρων προσδιορίζεται η λήξη της αλκοολικής ζύμωσης με τη μέτρηση του ειδικού βάρους, με κατάλληλα διαβαθμισμένα αραιόμετρα. Για παράδειγμα,

κρασιά με περιεκτικότητα σε αιθανόλη 11% v/v πρέπει να έχουν ειδικό βάρος 0.995, και με 12% v/v πρέπει να έχουν 0.994. Η λήξη της αλκοολικής ζύμωσης επιβεβαιώνεται με την μέτρηση των αναγόντων σακχάρων, των σακχάρων δηλαδή που δεν ζυμώνονται (κυρίως αποτελούνται από βινόζη και ξυλόζη), τα οποία έχουν περιεκτικότητα μικρότερη των 1.5 g/L στα λευκά κρασιά.

Στη συνέχεια, γίνεται μετάγγιση του κρασιού και προστίθεται θειώδης ανυδρίτης 8-10 g/hL με σκοπό να επιτευχθεί ελεύθερο θειώδες 30-40 mg/L. Με τη γρήγορη απομάκρυνση της οινολάσπης μετά την αλκοολική ζύμωση, αποφεύγεται η δημιουργία οσμών υδρόθειου. Ακολουθεί το απογέμισμα των δεξαμενών για την προστασία του κρασιού από το οξυγόνο του αέρα. Ύστερα από 15-20 ημέρες γίνεται μία δεύτερη μετάγγιση και διορθώνεται η ποσότητα του θειώδη ανυδρίτη. Ακολουθεί η διαύγαση, η σταθεροποίηση, η ήπια χρήση του δρύινου βαρελιού για την ωρίμανση, και η εμφιάλωση, όπως αναπτύσσονται στο υποκεφάλαιο 2.3. (Τσέτουρας 2008, Σουφλερός 2000).

2.1.2. Λευκή οινοποίηση με προζυμωτική εκχύλιση

Στην τεχνική της προζυμωτικής εκχύλισης γίνεται εκχύλιση των υδατοδιαλυτών συστατικών του φλοιού των σταφυλιών, πριν την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης. Τα συστατικά αυτά περνούν στο γλεύκος, το οποίο στη συνέχεια ζυμώνεται. Τα στέμφυλα έρχονται σε επαφή με το γλεύκος και αυτό εμπλουτίζεται με συστατικά που βελτιώνουν το άρωμα, τη γεύση και το σώμα του κρασιού. Πάνω από 30 χρόνια διεξάγονται έρευνες πάνω στην προζυμωτική εκχύλιση για την βελτίωση της ποιότητας των λευκών κρασιών. Έχει γίνει μία αναπόσπαστη διεργασία στις λευκές οινοποιήσεις στα περισσότερα οινοποιεία (Hernanz et al. 2007). Η προζυμωτική εκχύλιση εφαρμόζεται σε σταφύλια που προέρχονται από εκλεκτές λευκές ποικιλίες, ώριμα και απόλυτα υγιή, χωρίς παρασιτικές προσβολές. Τα σταφύλια πρέπει να έχουν ωριμάσει κατάλληλα γιατί οι φλοιοί των μη σωστά ωριμασμένων σταφυλιών προσδίδουν στο κρασί ένα χορτώδη χαρακτήρα, λόγω του μεγάλου ποσού C-6 συστατικών που περιέχουν (Gómez-Míguez et al. 2007). Σημαντική είναι, επίσης, η επίδραση στο αποτέλεσμα της εκχύλισης και δύο εξωτερικών παραγόντων, της διάρκειας και της θερμοκρασίας της προζυμωτικής εκχύλισης. Για την επιτυχία της, το οινοποιείο πρέπει να διαθέτει ειδικά κατασκευασμένα πνευματικά πιεστήρια κλειστού τύπου ή κατάλληλες μεταλλικές δεξαμενές. Επίσης, οι σωληνώσεις μεταφοράς του σταφυλοπολτού πρέπει να βρίσκονται σε περιβάλλον αδρανούς αερίου, κατά προτίμηση διοξειδίου του άνθρακα (Τσέτουρας 2008).

Τα σταφύλια υπόκεινται σε αποβοστρύχωση και ελαφρό σπάσιμο των ραγών, χωρίς πίεση. Ο σταφυλοπολτός μεταφέρεται στο χώρο εκχύλισης και προστίθεται θειώδης ανυδρίτης 5-10 g/hL. Κατά τη διάρκεια της εκχύλισης η θερμοκρασία του σταφυλοπολτού πρέπει να είναι μικρότερη από 20 °C, ώστε να επιβραδυνθεί η έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης. Ο χρόνος παραμονής του γλεύκους ποικίλει και φτάνει μέχρι και τις 24 ώρες, ανάλογα με την ποικιλία, την ωριμότητα και την υγιεινή κατάσταση των σταφυλιών. Καλή υγιεινή κατάσταση και καλή ωριμότητα επιτρέπουν μεγαλύτερη διάρκεια εκχύλισης. Το Ασύρτικο δίνει καλύτερα αποτελέσματα σε διάρκεια

εκχύλισης 10 ωρών, η Μαλαγουζιά στις 16, το Chardonnay στις 12-16 και το Sauvignon blanc στις 18.

Μετά το διαχωρισμό του γλεύκους από τα στέμφυλα, ο οποίος γίνεται με το λιγότερο δυνατό αερισμό, τα στέμφυλα μεταφέρονται στο πιεστήριο για την παραλαβή και του υπόλοιπου γλεύκους. Ο πρόρρωγος που αποτελεί το 70% και η πρώτη πίεση συγκεντρώνονται μαζί. Ακολουθεί η στατική απολάσπωση του γλεύκους σε δύο φάσεις, η πρώτη γίνεται 4 ώρες μετά την παραλαβή του γλεύκους σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και η δεύτερη 18 ώρες μετά την παραλαβή του στους 5 °C. Στη συνέχεια, το γλεύκος εμβολιάζεται και ρυθμίζεται η θερμοκρασία ζύμωσης ώστε να μην ξεπερνά τους 18 °C. Μετά το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης, προστίθεται θειώδης ανυδρίτης 5 g/hL και το κρασί παραμένει λίγες ημέρες με την οινολάσπη. Ακολουθεί η μετάγγιση του κρασιού και η διατήρησή του με τις υπόλοιπες οινολάσπες για χρονικό διάστημα περίπου δύο μηνών. Η διαδικασία συνεχίζεται με τη διαύγαση του κρασιού προσθέτοντας μπεντονίτη, τη σταθεροποίηση με ψύξη και την εμφιάλωση (Τσέτουρας 2008, Σουφλερός 2000).

Το γλεύκος και το κρασί που προκύπτουν από την προζυμωτική εκχύλιση, σε σχέση με αυτά από την κλασική λευκή οινοποίηση, έχουν αρκετές διαφορές. Η ολική οξύτητα του γλεύκους της προζυμωτικής εκχύλισης είναι μικρότερη και το pH μεγαλύτερο. Επίσης, αυξάνεται η συγκέντρωση του καλίου, ιδιαίτερα στις ποικιλίες με χαμηλή οξύτητα (Darias-Martín et al. 2000). Υπάρχει αύξηση των αζωτούχων ενώσεων (αμινοξέα, πρωτεΐνες) και των ουδέτερων πολυσακχαριτών (Gómez-Míguez et al. 2007, Σουφλερός 2000).

Το χρώμα του γλεύκους που προκύπτει μετά από προζυμωτική εκχύλιση είναι στενά συνδεδεμένο με τις συνθήκες πραγματοποίησης της εκχύλισης. Γενικά, παρατηρείται μία αύξηση στην παράμετρο L^* (φωτεινότητα) και στην απόχρωση (hue), γεγονός που σημαίνει ότι το γλεύκος είναι πιο ανοιχτό σε χρώμα και λιγότερο καφέ. Επιπλέον, οι τιμές της παραμέτρου a^* μειώνονται, το οποίο σημαίνει ότι το γλεύκος χάνει το καφέ του χρώμα. Αυτή η απώλεια του καφέ χρώματος που παρατηρείται στα γλεύκη μετά την προζυμωτική εκχύλιση, μπορεί να οφείλεται στην καθίζηση, λόγω πολυμερισμού, των χρωστικών ουσιών που είναι υπεύθυνες για το χρώμα αυτό. Αντίθετα, για μεγάλης διάρκειας εκχύλιση (πάνω από 12 ώρες) και χαμηλές θερμοκρασίες (έως 10 °C) έχει παρατηρηθεί ότι το καφέτισμα και η ένταση του χρώματος αυξάνονται, αν και το χρώμα του κρασιού παραμένει στα αποδεκτά όρια για τα λευκά κρασιά (Gómez-Míguez et al. 2007).

Επίσης, παρατηρείται αύξηση και στην συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων του γλεύκους (Hernanz et al. 2007, Gómez-Míguez et al. 2007). Σημαντική αύξηση παρουσιάζουν κυρίως το καφεϊκό οξύ, αλλά και η κατεχίνη, το *π*-υδροξυβενζοϊκό οξύ, κάποιες υποκατεστημένες μορφές της κερκετίνης, το καφταρικό, το *π*-κουταρικό και το γαλλικό οξύ. Το φερουλικό οξύ έχει χαμηλή διάχυση στο γλεύκος. Το καφεϊκό οξύ θεωρείται ότι είναι ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό, το οποίο έχει ευεργετικές ιδιότητες για την υγεία του ανθρώπου (Makris et al. 2003). Η συνολική περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή είναι 7 φορές υψηλότερη στο γλεύκος με προζυμωτική εκχύλιση μεγάλης διάρκειας και χαμηλής θερμοκρασίας, σε σχέση με το γλεύκος χωρίς εκχύλιση. Η

σημαντική αυτή διαφορά οφείλεται στο ότι αυτά τα συστατικά βρίσκονται κυρίως στους φλοιούς των σταφυλιών, και επομένως η εκχύλισή τους είναι εύκολη. Παρόλα αυτά, έχει βρεθεί ότι το φαινολικό φορτίο του τελικού κρασιού μειώνεται κατά τη διάρκεια της μετέπειτα οινοποίησης. Η μείωση αυτή είναι εμφανής στα κρασιά μεγάλης διάρκειας εκχύλισης (πάνω από 12 ώρες) και παρατηρείται κυρίως στις φλαβονοειδής φαινόλες. Το ποσοστό της μείωσης αυτής μπορεί να φτάσει το 26% (Gómez-Míguez et al. 2007). Σε άλλη έρευνα που διεξήχθη, αποδείχτηκε ότι η προζυμωτική εκχύλιση σε λευκές ποικιλίες σταφυλιών της Ισπανίας, αποδίδει το υψηλότερο ποσό φαινολικών σε 6 ώρες εκχύλισης στους 10 °C, και μάλιστα το ποσό των φλαβονοειδών του κρασιού με αυτή τη προζυμωτική εκχύλιση ήταν 2.6 φορές μεγαλύτερο από αυτό του κρασιού που οινοποιήθηκε με τη κλασική μέθοδο (Hernanz et al. 2007).

Η επαφή των φλοιών με το γλεύκος ευνοεί την εκχύλιση προάγγελων αρωμάτων, που μετατρέπονται σε άρωμα κατά την αλκοολική ζύμωση και τη διατήρηση του κρασιού (Selli et al. 2006). Η εκχύλιση των αρωματικών ενώσεων είναι βραδύτερη από εκείνη ορισμένων άλλων συστατικών των φλοιών (κάλιο, φαινολικές ενώσεις), γεγονός που εξηγεί ότι οι πιο μακροχρόνιες εκχυλίσεις δίνουν καλύτερα αποτελέσματα. Το κρασί που έχει παρασκευασθεί με προζυμωτική εκχύλιση είναι πιο «μεστό» και δίνει δομή πιο πλούσια, σε σχέση με αυτά που προκύπτουν από την κλασική λευκή οινοποίηση. Τέλος, ευνοείται αισθητά η μηλογαλακτική ζύμωση. Συμπερασματικά, η διατήρηση του κρασιού αυτού σε φιάλες είναι συγκριτικά καλύτερη, διότι σημειώνεται βελτίωση της ποιότητας (Σουφλερός 2000).

2.1.3. Λευκή οινοποίηση με κρυοεκχύλιση

Η κρυοεκχύλιση είναι μία φυσική μέθοδος εμπλουτισμού του γλεύκους σε αρωματικές ενώσεις και σάκχαρα, με επιλεκτική εκχύλιση υπό ψύξη. Η τεχνική συνίσταται στη ψύξη του σταφυλοπολτού μέχρι να εμφανισθεί πάγος. Η θερμοκρασία πήξης του γλεύκους εξαρτάται από την περιεκτικότητα σε σάκχαρα. Διατηρούνται θερμοκρασίες από -3 έως -7 °C, για ορισμένο χρονικό διάστημα. Στη συνέχεια, ο σταφυλοπολτός μεταφέρεται στο πιεστήριο. Η παραλαβή του γλεύκους απαιτεί την τήξη του πάγου. Με τη μέθοδο αυτή ευνοείται η εκχύλιση των τερπενικών ενώσεων (αρωματικών ουσιών). Επιπλέον, το λευκό κρασί που παράγεται έχει μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε αιθανόλη, μηλικό οξύ, ξηρό εκχύλισμα και υψηλότερο pH. Τα αποτελέσματα είναι καλύτερα όταν τα σταφύλια είναι υγιή και αρκετά ώριμα (Τσέτουρας 2008).

2.2. Ερυθρή οινοποίηση

Τα κόκκινα κρασιά είναι κρασιά εκχύλισης. Η εκχύλιση είναι υπεύθυνη για τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά τους (χρώμα, άρωμα, γεύση), τα οποία τα διαφοροποιούν από τα λευκά κρασιά. Εμπλουτίζονται σε φαινολικά συστατικά (ανθοκυάνες και ταννίνες), τα οποία συμμετέχουν στο χρώμα και στη γενικότερη δομή των κόκκινων κρασιών, καθώς και σε αρωματικά συστατικά, αζωτούχες ενώσεις, πολυσακχαρίτες (κυρίως πηκτίνες), ανόργανα συστατικά και άλλα.

Ανάλογα με την ποιότητα των σταφυλιών και τον επιζητούμενο τύπο του κρασιού, η επαφή του γλεύκους με τα σταφύλια μπορεί να είναι μικρότερης ή μεγαλύτερης χρονικής διάρκειας. Έτσι,

τα πρώιμα κρασιά που καταναλώνονται νέα, πρέπει να διαθέτουν φρουτώδες άρωμα, χαρακτήρας που είναι αντιστρόφως ανάλογος με την περιεκτικότητά τους σε φαινολικά συστατικά. Αντίθετα, τα κρασιά παλαιώσης πρέπει να είναι πλούσια σε ταννίνες. Στη συμμετοχή, λοιπόν, των φλοιών στην ερυθρή οινοποίηση παίζει σημαντικό ρόλο η ποιότητα των σταφυλιών. Πράγματι, για τις ερυθρές ποικιλίες, η ωριμότητα του φλοιού επηρεάζεται περισσότερο, σε σχέση με την ωριμότητα του χυμού, από την ποικιλία, τις συνθήκες ωρίμανσης και την υγιεινή κατάσταση των σταφυλιών. Έτσι εξηγείται η μεγάλη διαφοροποίηση που υπάρχει στα κόκκινα κρασιά σε σχέση με τα λευκά, όσον αφορά το έτος συγκομιδής και τους αμπελώνες.

Οι φλοιοί, τα γίγαρτα και οι βόστρυχοι εφοδιάζουν το γλεύκος με διαφορετικά συστατικά, τόσο από χημική όσο και από γευστική άποψη. Οι βόστρυχοι δίνουν χορτώδεις οσμές, ενώ τα γίγαρτα προσδίδουν τραχύτητα. Η επαφή με τους φλοιούς έχει σαν αποτέλεσμα ένα εύπλαστο, αλλά ατελές κρασί. Ο συνδυασμός φλοιών και γιγάρτων οδηγεί σε πιο ισορροπημένο αποτέλεσμα. Τα φαινολικά συστατικά κάθε οργάνου επίσης διαφέρουν ανάλογα με την ποικιλία, το βαθμό ωριμότητας και τις συνθήκες ωρίμανσης. Επιπλέον, στο ίδιο όργανο, για παράδειγμα στο φλοιό, υπάρχουν, μαζί με τα φαινολικά συστατικά που είναι θετικά για την ποιότητα, και άλλες ενώσεις με χορτώδη και πικρή γεύση, και άλλες με οσμή φύλλων και αγουράδας. Το γεγονός ότι οι ενώσεις που είναι θετικές για την ποιότητα των παραγόμενων κρασιών εκχυλίζονται πρώτες, είναι μια ευτυχής συγκυρία. Συνεπώς, η διαδικασία της εκχύλισης θα πρέπει να γίνει κατά τέτοιο τρόπο ώστε να παραληφθούν μόνο εκείνα τα συστατικά που συνεισφέρουν στην ποιότητα, και όχι στο σύνολό τους (Συμεού 2010).

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι ερυθρής οινοποίησης, όπως η κλασική μέθοδος, με ή χωρίς τη χρήση εμπορικών σκευασμάτων ενζύμων, η προζυμωτική εκχύλιση «εν ψυχρώ», η θερμοοινοποίηση και η μέθοδος της ανθρακικής αναερόβιωσης.

2.2.1. Κλασική ερυθρή οινοποίηση

Αρχικά, πρέπει να γίνει σωστός προσδιορισμός του τρύγου, αφού έχει μεγάλη σημασία για τη γευστική ισορροπία του κρασιού. Η ερυθρή οινοποίηση ξεκινά με τον απορραγισμό και την έκθλιψη των σταφυλιών. Απορραγισμός είναι ο διαχωρισμός των ραγών από τους βόστρυχους με ειδικά μηχανήματα, τους αποβοστρυχωτές (Εικόνα 6), οι οποίοι σπάζουν τις ράγες, ώστε να προκύψει ο σταφυλοπολτός, δηλαδή το γλεύκος μαζί με στέμφυλα (φλοιοί και γίγαρτα). Εάν δεν γίνει ο απορραγισμός και παραμείνουν οι βόστρυχοι μέσα στον σταφυλοπολτό, το κρασί αποκτά χορτώδη χαρακτήρα. Μετά από το διαχωρισμό των βόστρυχων και την έκθλιψη, ο σταφυλοπολτός μεταφέρεται με αντλία στις δεξαμενές της ερυθρής



Εικόνα 6: Θλιπτήριο - αποβοστρυχωτής σταφυλιών

οινοποίησης (Εικόνα 7), όπου προστίθεται θειώδης ανυδρίτης, πριν ακόμη αρχίσει η αλκοολική ζύμωση.

Η ποσότητα του θειώδη ανυδρίτη που προστίθεται είναι 5-15 g/hL, και εξαρτάται από την υγεία των σταφυλιών, το βαθμό ωρίμανσης, τη θερμοκρασία, το pH του γλεύκους, τον τύπο του κρασιού που θα παρασκευασθεί, τις ιδιαιτερότητες της περιοχής και την επερχόμενη ή όχι πραγματοποίηση της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Μόνο ο ελεύθερος θειώδης ανυδρίτης προστατεύει το κρασί. Ο δεσμευμένος δεν παρέχει προστασία. Όταν η προσθήκη γίνει πριν τη ζύμωση, δεσμεύεται από τα σάκχαρα, και κατά την μετατροπή τους σε αλκοόλη, ο θειώδης ανυδρίτης απελευθερώνεται προοδευτικά και έτσι προσφέρει προστασία καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης.

Η ζύμωση μπορεί να γίνει είτε φυσική, με τις ζύμες που ήδη βρίσκονται στα σταφύλια, είτε ελεγχόμενη, με διάφορα στελέχη που κυκλοφορούν στο εμπόριο, για τη προκαθορισμένη έναρξη, την ταχύτητα και την αποτελεσματικότητα της αλκοολικής ζύμωσης.

Ο χρόνος παραμονής του γλεύκους με τα στέμφυλα, δεν μπορεί να στηριχθεί σε ορισμένους κανόνες. Είναι πολλοί οι παράγοντες που παίζουν ρόλο. Η διάρκεια της εκχύλισης και άρα η χρονική στιγμή του διαχωρισμού των στεμφύλων από το γλεύκος μπορεί να διακριθεί σε τρεις περιπτώσεις. Πρώτον, το γλεύκος μπορεί να διαχωρισθεί πριν το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης. Η μέθοδος αυτή έχει σκοπό να



Εικόνα 7: Δεξαμενή ερυθρής οινοποίησης με ενσωματωμένο σύστημα ανακύκλωσης του γλεύκους

ελαχιστοποιήσει τους κινδύνους που εμφανίζονται προς το τέλος της ζύμωσης, απομακρύνοντας την μεγαλύτερη ποσότητα των βακτηρίων. Συνήθως γίνεται, όταν η πυκνότητα του γλεύκους είναι 2-3 °Baumè, δηλαδή ειδικό βάρος 1.051 - 1.020. Ο διαχωρισμός μπορεί να γίνει και πιο νωρίς, ανάλογα με τον τύπο του κρασιού που θα παραχθεί, όπως είναι τα κρασιά που δεν προορίζονται για παλαίωση. Η δεύτερη περίπτωση είναι αυτή του διαχωρισμού του γλεύκους αμέσως μετά τη λήξη της αλκοολικής ζύμωσης, όταν δηλαδή έχουν αποζυμωθεί όλα τα σάκχαρα του γλεύκους. Τέλος, ο διαχωρισμός μπορεί να γίνει λίγες ημέρες μετά το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης. Έτσι τα κόκκινα κρασιά είναι πλούσια σε ταννίνες και αντέχουν στο χρόνο. Υπάρχει, όμως, ο κίνδυνος της οξείδωσης των στεμφύλων από το οξυγόνο του αέρα. Γι' αυτό το λόγο, η οινοποίηση αυτή γίνεται μόνο σε κλειστές δεξαμενές.

Ο διαχωρισμός του ημιζυμωμένου γλεύκους ή του κρασιού από τα στέμφυλα, δίνει το γλεύκος ή το κρασί εκροής. Ακολουθεί η πίεση των στεμφύλων στα πιεστήρια, που δίνει το

γλεύκος ή το κρασί πίεσης και αποτελεί το 15% του συνολικού όγκου του κρασιού. Αν τα σταφύλια προέρχονται από εκλεκτές ποικιλίες, η πρώτη πίεση δίνει κρασιά πλούσια σε άρωμα και χρώμα, όχι πολύ στυφά και μπορούν να αναμειχθούν με τα κρασιά εκροής. Από τη δεύτερη και τρίτη πίεση, λαμβάνονται κρασιά χορτώδη, με πολύ στυφή γεύση και έχουν τόση κακή ποιότητα, όσο πιο κοινή η ποικιλία του σταφυλιού.

Μετά το διαχωρισμό το ημιζυμωμένο γλεύκος μεταφέρεται σε καθαρές δεξαμενές, όπου θα ολοκληρωθεί η ζύμωση. Η ζύμωση εξελίσσεται κανονικά, όταν η θερμοκρασία διατηρείται στα κατάλληλα επίπεδα για την ερυθρή οινοποίηση που είναι 25-30 °C. Οι δεξαμενές που χρησιμοποιούνται έχουν μανδύα ψύξης, όπου μέσα του ρέει ψυκτικό υγρό για την ρύθμιση της θερμοκρασίας στα επιθυμητά επίπεδα.

Όταν τελειώσει η αλκοολική ζύμωση τα ανάγοντα σάκχαρα είναι λιγότερα από 2 g/L. Διαφορετικά, το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης διαπιστώνεται με την μέτρηση του ειδικού βάρους. Υπάρχουν πίνακες που αντιστοιχίζουν τους αλκοολικούς βαθμούς του κρασιού και το ειδικό βάρος. Για παράδειγμα, κρασιά με περιεκτικότητα σε αιθανόλη 12% v/v πρέπει να έχουν ειδικό βάρος 0.994, και με 13% v/v πρέπει να έχουν 0.993. Στη συνέχεια, προστίθεται θειώδης ανυδρίτης και το κρασί προστατεύεται από τον αέρα, για την αποφυγή των οξειδωτικών φαινομένων.

Μετά την αλκοολική ζύμωση, και εφόσον δημιουργηθούν οι κατάλληλες συνθήκες (μικρές ποσότητες θείωσης, κατάλληλη θερμοκρασία κ.α.) πραγματοποιείται η μηλογαλακτική ζύμωση, η μετατροπή δηλαδή του μηλικού οξέος σε γαλακτικό οξύ, από τα γαλακτικά βακτήρια που βρίσκονται στις οινολάσπες. Είναι επιθυμητή στα κρασιά που έχουν μεγάλη οξύτητα, γιατί γίνονται πιο ευχάριστα και βελτιώνεται τη ποιότητά τους. Όταν η θερμοκρασία είναι ευνοϊκή 21-27 °C, η ζύμωση τελειώνει γρήγορα μέσα σε λίγες μέρες. Εάν οι θερμοκρασίες είναι χαμηλές, η ζύμωση γίνεται βραδεία ή διακόπτεται ή παρατείνεται για πολλούς μήνες.

Μετά το τέλος της μηλογαλακτικής ζύμωσης, το κρασί μεταγγίζεται αμέσως και προστίθενται 5 g/hL θειώδη ανυδρίτη, για την αναστολή της δράσης των γαλακτικών βακτηρίων. Ακολουθεί η διαύγαση και η σταθεροποίηση, όπως θα αναπτυχθούν στο κεφάλαιο 2.3., και στη συνέχεια η ωρίμανση σε δρύινα βαρέλια και η παλαίωση σε φιάλες (Τσέτουρας 2008, Σουφλερός 2000).

2.2.2. Χρήση εμπορικών σκευασμάτων ενζύμων

Τα ώριμα σταφύλια είναι πλούσια σε πηκτινολυτικά ένζυμα, όπως η πηκτινομεθυλεστεράση και οι πολυγαλακτουρονάσες, αλλά δεν περιέχουν πηκτινικές λυάσες. Η πηκτινομεθυλεστεράση του σταφυλιού είναι θερμοανθεκτική και έχει βέλτιστο pH 7-8. Η ευεργετική δράση των διάφορων πηκτινολυτικών ενζύμων του σταφυλιού συχνά περιορίζεται από το pH του γλεύκους ή από την ανεπαρκή δραστηριότητά τους που οφείλεται στην περιορισμένη διάρκεια των προζυμωτικών διεργασιών. Για το λόγο αυτό έχουν παρασκευαστεί ενζυμικά σκευάσματα με μεγάλη προσαρμοστικότητα, από συγκεκριμένα είδη μυκήτων (*Aspergillus*, *Rhizopus* και *Trichoderma*). Τα εμπορικά παρασκευάσματα περιέχουν διάφορα ένζυμα, τα οποία είναι ενεργά σε χαμηλά pH:

πηκτινομεθυλεστεράσες, πολυγαλακτουρονάσες, πηκτινικές λυάσες και ημικυτταρινάσες. Το ενζυμικό προφίλ των παρασκευασμάτων που είναι διαθέσιμα ήδη στην αγορά δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί πλήρως.

Η προσθήκη των ενζύμων γίνεται σε μικρό χρονικό διάστημα μετά το σπάσιμο των σταφυλιών προκειμένου είτε να διασφαλιστεί η αύξηση της απόδοσης σε γλεύκος, είτε να επιτευχθεί η βελτίωση της διαδικασίας του φιλτραρίσματος του κρασιού, σε ορισμένες ποικιλίες που είναι πολύ πλούσιες σε πηκτινικές ουσίες. Όταν προστεθούν σε συγκέντρωση 2-4 g/hL, είναι δυνατό να αυξήσουν την απόδοση του γλεύκους κατά 15%, μέσα σε 4-10 ώρες, αλλά ακόμα και σε μικρότερο χρονικό διάστημα (1-2 ώρες) αυξάνεται η αναλογία του γλεύκους εκροής. Η αποτελεσματικότητά τους εξαρτάται από τη φύση των σταφυλιών.

Με την προσθήκη κατάλληλων ενζύμων βελτιώνεται, επίσης, η εκχύλιση των χρωστικών και ενισχύεται η σταθεροποίησή τους. Η προσθήκη πηκτινολυτικών ενζύμων στην αρχή του σταδίου της εκχύλισης διευκολύνει την εξαγωγή των φαινολικών συστατικών από τα στερεά μέρη του σταφυλιού. Έτσι, το κρασί που προκύπτει είναι πλουσιότερο σε ταννίνες και ανθοκυάνες (η αύξηση των οποίων, σύμφωνα με έρευνες μπορεί να φτάσει και το 40%), με μεγαλύτερη ένταση χρώματος και πιο ερυθρή χροιά. Έρευνα που έχει γίνει στην ποικιλία Cabernet Sauvignon έδειξε ότι η χρήση ενζύμων ενισχύει την εκχύλιση ανθοκυανών από 8 έως και πάνω από 15%, ανάλογα με την προστιθέμενη ποσότητα, και μειώνει το χρόνο που απαιτείται για να φτάσει η συγκέντρωσή τους στο μέγιστο κατά 40 ώρες, σε σχέση με το γλεύκος χωρίς προσθήκη ενζύμων. Επίσης, αποδείχθηκε η μείωση της υποβάθμισης των ανθοκυανών μετά τις 72 ώρες εκχύλισης (Segade et al. 2015). Η επεξεργασία αυτή, επίσης, βελτιώνει τους οργανοληπτικούς χαρακτήρες, κυρίως τη δομή του κρασιού, αλλά και τη σταθερότητα του χρώματος, μέσω του σχηματισμού πολυμερών χρωστικών. Τα παρασκευάσματα αυτά επίσης περιέχουν β-γλυκοζιδάση, η οποία είναι πιθανόν να υδρολύει τους ανθοκυανικούς γλυκοζίτες, κάτι που είναι ανεπιθύμητο, αφού έτσι αποσταθεροποιούνται οι ανθοκυάνες, γι' αυτό πρέπει να περιλαμβάνουν ελάχιστα ή ακόμα καλύτερα καθόλου τέτοια ένζυμα (Συμεού 2010).

Η δράση των πηκτινολυτικών ενζύμων που προστίθενται κατά την οινοποίηση προκειμένου να βελτιώσουν το χρώμα των παραγόμενων κρασιών σχετίζεται με την καταστροφή των κυττάρων και των ιστών, η οποία διευκολύνει την απελευθέρωση των φαινολικών συστατικών. Το αποτέλεσμα εξαρτάται από την ποικιλία και περιορίζεται συνήθως στα ελαφρά χρωματισμένα κόκκινα κρασιά, όπου κυρίως ελευθερώνουν περισσότερες ταννίνες, οι οποίες δρουν σταθεροποιώντας το χρώμα. Η χρήση ενζύμων αυξάνει την συγκέντρωση των προκυανιδινών, καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης, όχι μόνο αυτών που προέρχονται από τους φλοιούς, αλλά και αυτών από τα γίγαρτα. Τα κυτταρικά τοιχώματα των γιγάρτων περιέχουν κυτταρίνη, ημικυτταρίνη, πηκτίνες, πρωτεΐνες, λιγνίνη, κολλώδεις ουσίες και κόμμεα. Τα ένζυμα, τα οποία έχουν διάφορες δράσεις, μπορούν να υποβαθμίσουν την κυτταρική και υποκυτταρική δομή των ιστών των γιγάρτων, αυξάνοντας έτσι την απελευθέρωση των ταννινών τους (Busse-Valverde et al. 2011).

Με την προσθήκη κατάλληλων ενζύμων βελτιώνονται και κάποια ποιοτικά χαρακτηριστικά του κρασιού, όπως η ένταση του αρώματος. Οι γλυκοζιδάσες που περιέχονται στα εμπορικά πηκτινολυτικά παρασκευάσματα έχουν την ικανότητα να υδρολύουν, σε ένα βαθμό, τους τερπενικούς γλυκοζίτες. Η επεξεργασία με γλυκοζιδάσες ολοκληρώνει τις μετατροπές των τερπενικών συστατικών που πραγματοποιούνται από τις ζύμες κατά τη αλκοολική ζύμωση. Το αποτέλεσμα είναι η πολύ γρήγορη απελευθέρωση των τερπενικών συστατικών. Η ευχάριστη οσμή των μονοτερπενίων, όπως η λιναλοόλη, η νερόλη και η γερανιόλη μπορεί να μετατραπούν σε πιο σταθερές μορφές κατά τη διάρκεια της παλαίωσης, περιλαμβανομένης της τερπινεόλης, η οποία δεν έχει ιδιαίτερα ευχάριστη οσμή. Σε οποιαδήποτε περίπτωση είναι καλό να αποφεύγονται ενζυμικά παρασκευάσματα που περιέχουν κινναμωμική αποκαρβοξυλάση, η οποία μπορεί να προκαλέσει τη δημιουργία αιθυλοφαινολών, που έχουν χαρακτηριστική δυσάρεστη οσμή ζώου (Συμεού 2010).

2.2.3. Προζυμωτική εκχύλιση «εν ψυχρώ»

Για την προζυμωτική εκχύλιση, μετά την αποβοστρύχωση και την έκθλιψη των σταφυλιών, ο σταφυλοπολτός μεταφέρεται σε δεξαμενές στους 3-4 °C. Παραμένει εκεί αρκετές ώρες, έτσι ώστε να εκχυλιστούν από τους φλοιούς, όσο το δυνατόν περισσότερα φαινολικά, τα οποία θα ενδυναμώσουν τον χαρακτήρα των κρασιών. Εκχυλίζονται οι υδατοδιαλυτές, μαλακές ταννίνες, που προτιμούν τις χαμηλές θερμοκρασίες, και όχι οι αλκοολοδιαλυτές ταννίνες, που μουδιάζουν το στόμα, αφού προτιμούν τις υψηλότερες θερμοκρασίες. Έχει αποδειχθεί ότι η εκχύλιση με ξηρό πάγο μπορεί να εμπλουτίσει το γλεύκος με προκυανιδίνες των φλοιών υψηλού μοριακού βάρους (Busse-Valverde et al. 2011). Τη δεύτερη μέρα σταματά η ψύξη του σταφυλοπολτού και την τρίτη μέρα, όπου η θερμοκρασία πρακτικά ανεβαίνει, γίνεται ο εμβολιασμός με ζύμες. Μετά τον εμβολιασμό, η θερμοκρασία πρακτικά ανεβαίνει περισσότερο, λόγω της αλκοολικής ζύμωσης, η οποία ξεκινά αργά και στη συνέχεια επιταχύνεται. Η μέθοδος αυτή δίνει κρασιά με περισσότερο χρώμα, άρωμα, γευστικό χαρακτήρα και μαλακότητα των ταννινών (Τσέτουρας 2008). Φαίνεται ότι η μέθοδος της προζυμωτικής εκχύλισης «εν ψυχρώ» βελτιώνει την εκχύλιση των ανθοκυανών από τους φλοιούς, πιθανώς λόγω του ότι η ψύξη αυξάνει τον όγκο των ενδοκυτταρικών υγρών, και έτσι διαρρηγνύονται οι κυτταρικές μεμβράνες, απελευθερώνοντας τα φαινολικά συστατικά του κυττάρου (Busse-Valverde et al. 2011).

2.2.4. Θερμοοινοποίηση

Η οινοποίηση με θέρμανση του σταφυλοπολτού είναι ένας τρόπος παρασκευής κόκκινων κρασιών με σκοπό τη γρήγορη διάχυση των χρωστικών και των φαινολικών ενώσεων του σταφυλιού, πριν ακόμα αρχίσει η αλκοολική ζύμωση. Τα σταφύλια μετά την αποβοστρύχωση και την έκθλιψη, θερμαίνονται με ειδικούς εναλλάκτες θερμότητας ταχείας θέρμανσης, σε θερμοκρασίες 70-80 °C για λίγα λεπτά της ώρας. Έτσι, καταστρέφονται οι κυτταρικές μεμβράνες με αποτέλεσμα τη διάχυση των φαινολικών συστατικών στο γλεύκος. Το μέγιστο της διάχυσης επιτυγχάνεται στους 70 °C μέσα σε πέντε λεπτά και στους 80 °C μέσα σε δύο λεπτά. Κατά την θερμοοινοποίηση, με την ταχεία θέρμανση, αποφεύγονται οι θερμοκρασίες των 40-50 °C, όπου

τα οξειδωτικά ένζυμα έχουν την εντονότερη δράση. Εάν η θέρμανση γίνει αργά, τα οξειδωτικά ένζυμα μπορούν να δράσουν εύκολα. Για την παρεμπόδιση της λακκάσης, του οξειδωτικού ενζύμου του *Botrytis cinerea*, απαιτείται θερμοκρασία 75 °C. Για την παρεμπόδιση της τυροσινάσης, του ενζύμου των σταφυλιών που μπορεί να προκαλέσει οξείδωση των φαινολικών ενώσεων, αρκεί η προσθήκη θειώδη ανυδρίτη. Στη λακκάση, αντίθετα, η προσθήκη θειώδη ανυδρίτη ακόμη και σε μεγάλες ποσότητες της τάξης των 20 g/hL, επιφέρει μόνο περιορισμένη αναστολή στη δράση της. Με τη βοήθεια της αλκοόλης, όμως, προκαλείται η απενεργοποίηση του ενζύμου μέσα σε λίγες μέρες.

Η αλκοολική ζύμωση γίνεται μετά το διαχωρισμό του γλεύκους από τα στέμφυλα. Αρχικά, διαχωρίζεται το γλεύκος εκροής και τα στέμφυλα πιέζονται στο πιεστήριο και λαμβάνεται το γλεύκος πίεσης. Και τα δύο αυτά γλεύκη είναι έντονα κόκκινα, αλλά το γλεύκος εκροής παρουσιάζει υψηλότερη ποιότητα. Εφόσον τα στέμφυλα έχουν διαχωριστεί, και δεν θα γίνει περαιτέρω εκχύλιση, η αλκοολική ζύμωση πραγματοποιείται σε χαμηλές θερμοκρασίες 18-20 °C, με σκοπό να ελαττωθεί η απώλεια των πτητικών συστατικών που σχηματίζονται και δίνουν τα δευτερεύοντα αρώματα του κρασιού. Αμέσως μετά τη ψύξη το γλεύκος εμβολιάζεται με καθαρή καλλιέργεια ζυμομυκήτων. Εάν καθυστερήσει η έναρξη της ζύμωσης, υπάρχει κίνδυνος εμφάνισης της γαλακτικής ασθένειας. Αφού ζυμωθούν όλα τα σάκχαρα, η μηλογαλακτική ζύμωση τελειώνει γρήγορα (Τσέτουρας 2008).

Επίσης, μπορεί να γίνει ολικός ή μερικός αποχωρισμός του παραγόμενου κατά την έκθλιψη γλεύκους, ο οποίος χωρίς να υποστεί τη θερμική επεξεργασία, οδηγείται στη δεξαμενή ζύμωσης. Εκεί αναμιγνύεται με το γλεύκος που προκύπτει από την πίεση του σταφυλοπολτού, ο οποίος έχει ήδη περάσει από τον εναλλάκτη θερμότητας. Ο ολικός ή μερικός διαχωρισμός του γλεύκους, πριν την θέρμανση του σταφυλοπολτού, έχει ως πλεονέκτημα την πραγματοποίηση της φυσικής διαύγασης του κρασιού. Πράγματι, τα φυσικά πηκτινοληπτικά ένζυμα του γλεύκους, τα οποία διαφεύγουν την αδρανοποίηση, συμβάλλουν στη διαύγαση του κρασιού.

Μία άλλη εναλλακτική διαδικασία είναι η θέρμανση ολόκληρων των σταφυλιών, χωρίς να υποστούν καμία μηχανική επεξεργασία, συνίσταται στην εκπομπή υδρατμών 100 °C πάνω σε ολόκληρα σταφύλια για 3 λεπτά. Στη συνέχεια ακολουθεί η έκθλιψη και η αποβοστρύχωσή τους. Η επερχόμενη αλκοολική ζύμωση εφαρμόζεται συνήθως κατά το πρότυπο της κλασικής ερυθρής οινοποίησης. Αν η ζύμωση γίνει όπως στη λευκή οινοποίηση, δηλαδή μετά την πίεση του σταφυλοπολτού, οι οργανοληπτικοί χαρακτήρες του παραγόμενου κρασιού μοιάζουν με εκείνους των ροζέ. Η τεχνική αυτή παρουσιάζει το πλεονέκτημα ότι η θερμοκρασία στο εσωτερικό της σάρκας διατηρείται χαμηλή (32 °C), με αποτέλεσμα να μην αδρανοποιηθούν τα πηκτινολυτικά ένζυμα που προκαλούν τη διαύγαση των κρασιών. Η θέρμανση ολόκληρων σταφυλιών ενδείκνυται, επίσης, για τις περιπτώσεις εκείνες που τα σταφύλια έχουν προσβληθεί από σήψη.

Η θερμοοινοποίηση προσφέρει ταχεία εκχύλιση των χρωστικών ουσιών, αδρανοποίηση των οξειδωτικών ενζύμων του *Botrytis cinerea*, επιτάχυνση και υποβοήθηση των ζυμώσεων και βελτίωση της σύστασης του κρασιού, ενώ αντίθετα μπορεί να υποβαθμίσει τα οργανοληπτικά

χαρακτηριστικά, να εμπλουτίσει το γλεύκος σε κάλιο, νάτριο, ασβέστιο, σίδηρο και άλλα στοιχεία και να αδρανοποιήσει τα πηκτινολητικά ένζυμα. Επίσης, οι χρωστικές ουσίες που εκχυλίζονται είναι ασταθείς και κατά τη διάρκεια της διατήρησης του κρασιού μειώνονται. Έτσι μετά την παλαίωση ενός έτους, ουσιαστικά δεν υπάρχει διαφορά ως προς το χρώμα ανάμεσα σε κρασιά που παράγονται με την κλασική οινοποίηση και τη θερμοοινοποίηση (Σουφλερός 2000).

2.2.5. Ανθρακική αναεροβίωση

Στη μέθοδο της ανθρακικής αναεροβίωσης ολόκληρα τα σταφύλια, με άθικτες τις ράγες και τους βοστρύχους, τοποθετούνται στις δεξαμενές ζύμωσης, οπότε ένα ποσοστό από τις ράγες θλίβεται και οι υπόλοιπες μένουν άθικτες. Η μέθοδος αυτή είναι μια διαφορετική τεχνική οινοποίησης και δεν είναι δυνατό να συγκριθεί με την κλασική ερυθρή οινοποίηση. Διαχειρίζεται διαφορετικά φαινόμενα και αξιοποιεί καλύτερα ερυθρές ποικιλίες που έχουν ακατάλληλο ποιοτικό δυναμικό για την ανάπτυξη αρωματικών χαρακτήρων με την κλασική ερυθρή οινοποίηση. Στην κλασική ερυθρή οινοποίηση το γλεύκος παίρνει από τους φλοιούς και από τα γίγαρτα διάφορα συστατικά, οπότε γίνεται εκχύλιση, ενώ σε αυτή την τεχνική, όπου οι άθικτες ράγες βρίσκονται σε ατμόσφαιρα διοξειδίου του άνθρακα, γίνεται διάχυση των διαφόρων συστατικών μέσα από τις κυτταρικές μεμβράνες. Το αποτέλεσμα είναι ο σχηματισμός χαρακτηριστικού αρώματος που οφείλεται στην ενδοκυτταρική ζύμωση.

Η μέθοδος της ανθρακικής αναεροβίωσης περιλαμβάνει τη χρήση φαρδιών και κοντών μεταλλικών δεξαμενών μικρής χωρητικότητας, οι οποίες αντέχουν στις πιέσεις του διοξειδίου του άνθρακα. Αφού τα σταφύλια μπουν στις δεξαμενές, απομακρύνεται ο αέρας και γεμίζονται με διοξείδιο του άνθρακα από μία φιάλη υπό πίεση ή από γειτονικές δεξαμενές που βρίσκονται σε έντονη ζύμωση ή ακόμα και από την ίδια τη δεξαμενή, στην οποία πριν τα σταφύλια προστέθηκε γλεύκος που ζυμώνει σε ποσότητα ίση με το 10% του όγκου της. Οι δεξαμενές γεμίζονται και κλείνονται ερμητικά. Η προσθήκη θειώδη ανυδρίτη δεν είναι απαραίτητη, αλλά συνήθως χρησιμοποιείται μία δόση των 3-8 g/hL.

Το διοξείδιο του άνθρακα διώχνει τον αέρα, και έτσι οι ράγες που δεν έχουν σπάσει βρίσκονται σε αναερόβιες συνθήκες, άλλες στον πυθμένα βυθισμένες μέσα στο γλεύκος και άλλες στο αναερόβιο περιβάλλον του διοξειδίου του άνθρακα. Οι ράγες εμποτίζονται με το διοξείδιο του άνθρακα και με την επίδραση ενζυμικών συστημάτων που υπάρχουν μέσα στη ράγα, γίνεται διάχυση διαφόρων συστατικών από το φλοιό προς τη σάρκα. Πραγματοποιείται, δηλαδή, μία ενδοκυτταρική ζύμωση (αλκοολική ζύμωση των σακχάρων και του μηλικού οξέος για την παραγωγή αιθανόλης), που γίνεται μόνο με την επίδραση των ενζύμων της ράγας, ενώ η αλκοολική ζύμωση των σακχάρων του γλεύκους γίνεται μέσα στα κύτταρα της ζύμης με τη βοήθεια των δικών τους ενζύμων.

Ο χρόνος παραμονής των σταφυλιών στο αναερόβιο περιβάλλον εξαρτάται κυρίως από τη θερμοκρασία. Όταν βρίσκονται στους 25-28 °C η διάρκεια παραμονής είναι περίπου 8 ημέρες, στους 20 °C περίπου 15 ημέρες, ενώ στους 30-32 °C ο χρόνος παραμονής μειώνεται στις 7 ημέρες. Για τον διαχωρισμό, το γλεύκος που συγκεντρώθηκε στον πυθμένα λαμβάνεται με εκροή. Το

γλεύκος αυτό συνήθως περιέχει λίγα γραμμάρια αζύμωτα σάκχαρα, οπότε μεταφέρεται σε δεξαμενές για την αποζύμωση. Το προϊόν της εκροής είναι το 40-60% του συνολικού όγκου. Στη συνέχεια, τα σταφύλια μεταφέρονται σε ασυνεχή πιεστήρια, απ' όπου λαμβάνεται το γλεύκος πίεσης, το οποίο ξεχωρίζει για τους χαρακτήρες της ενδοκυτταρικής ζύμωσης. Προστίθεται θειώδης ανυδρίτης στο γλεύκος πίεσης, εμβολιάζεται με ζυμομύκητες και ρυθμίζεται η θερμοκρασία στους 18-20 °C, ώστε να διατηρηθούν τα αρωματικά συστατικά. Η αλκοολική και η μηλογαλακτική ζύμωση εξελίσσονται ταχύτερα απ' ό,τι στην κλασική ερυθρή οινοποίηση.

Μετά το τέλος των ζυμώσεων αποφασίζεται σε ποια αναλογία θα αναμειχθεί το κρασί εκροής με το κρασί πίεσης, ώστε να προκύψει κρασί με τα χαρακτηριστικά της οινοποίησης με εκχύλιση σε ατμόσφαιρα διοξειδίου του άνθρακα. Τα κρασιά που παρασκευάζονται με αυτή τη μέθοδο είναι κυρίως κόκκινα, αλλά μπορούν να παραχθούν επίσης ροζέ και λευκά. Για ροζέ χρειάζονται 60 ώρες ενδοκυτταρικής ζύμωσης και για τα λευκά περίπου 48. Στα κόκκινα κρασιά που προκύπτουν έχουν εκχυλιστεί ανεπαρκείς χρωστικές και άλλα συστατικά, και δεν μπορούν να παλαιωθούν (Τσέτουρας 2008, Σουφλερός 2000).

2.3. Διεργασίες μετά την οινοποίηση

2.3.1. Μετάγγιση

Μετάγγιση είναι ο διαχωρισμός του κρασιού από τις οινολάσπες που καθιζάνουν στα δοχεία ζύμωσης. Οι οινολάσπες περιέχουν ζυμομύκητες, υπολείμματα ραγών, βακτηρίδια, λευκωματοειδής ουσίες, ταννοειδής ουσίες, πηκτινικές ύλες, πρωτεϊνικές, δεψικές και χρωστικές ύλες, κρυστάλλους όξινου τρυγικού καλίου και τρυγικού ασβεστίου κ.α.. Λόγω της σύνθεσης της οινολάσπης, αν δεν απομακρυνθεί έγκαιρα, μπορεί αργότερα να αναπτυχθούν ασθένειες και θολώματα στο κρασί, καθώς και δυσάρεστες οσμές.

Η πρώτη μετάγγιση γίνεται λίγες μέρες μετά το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης ή λίγο αργότερα. Γίνεται παρουσία αέρα, έτσι ώστε να εμπλουτισθεί το κρασί με οξυγόνο ($2-3 \text{ cm}^3/\text{L}$), το οποίο συντελεί στην οξειδωση ορισμένων αναγωγικών ουσιών του κρασιού και παίζει σπουδαίο ρόλο στην εξέλιξη και σταθεροποίησή του. Επίσης, διαφεύγει το διοξείδιο του άνθρακα και ταυτόχρονα το κρασί απαλλάσσεται από ορισμένα συστατικά του αρώματος των ζυμώσεων (δευτερεύον άρωμα). Μετά τη πρώτη μετάγγιση, οι δεξαμενές απογεμίζονται, για να αποφευχθεί η επαφή του κρασιού με τον αέρα που θα δημιουργούσε ξυνίσματα. Οι άλλες μεταγγίσεις που ακολουθούν γίνονται απουσία αέρα, επειδή το οξυγόνο του αέρα προκαλεί αλλοιώσεις που δε διορθώνονται. (Τσέτουρας 2008, Σουφλερός 2000).

2.3.2. Διαύγαση

Με τη μετάγγιση του κρασιού απομακρύνονται τα βαριά συστατικά που κατακάθονται στον πυθμένα της δεξαμενής και έχουν ειδικό βάρος μεγαλύτερο από το ειδικό βάρος του κρασιού. Με τη φυσική καταβύθιση όμως, η διαύγαση δεν είναι τέλεια, αφού απομακρύνεται μόνο ένα μέρος από τα βακτήρια και τις χρωστικές ύλες. Έτσι, γίνεται διαύγαση με τεχνητά μέσα. Η διαύγαση ή

το κολλάρισμα συνίσταται στην ενσωμάτωση σε ένα κρασί λιγότερο ή περισσότερο θολό ή ασταθές, μίας ουσίας ικανής να καταβυθίσει τα αιωρούμενα σωματίδια. Με τη διαύγαση του κρασιού επιτυγχάνεται η σταθεροποίησή του παρεμποδίζοντας ή ευνοώντας την καταβύθιση ορισμένων κολλοειδών ουσιών, που είναι υπεύθυνες για τη δημιουργία θολώματος, ύστερα από μερικούς μήνες ή ακόμα και ύστερα από δύο έως τρία χρόνια για τις χρωστικές. Επίσης, με τη διαύγαση βελτιώνεται ο οργανοληπτικός χαρακτήρας των κρασιών και διευκολύνονται οι μεταγενέστερες κατεργασίες (π.χ. διήθηση, ψύξη).

Το κολλάρισμα μπορεί να γίνει με οργανικά ή ανόργανα διαυγαστικά μέσα. Τα οργανικά διαυγαστικά μέσα είναι πρωτεϊνικής φύσης και δημιουργούν σύμπλοκα με τις ταννίνες του κρασιού. Σε αυτά ανήκουν η ζελατίνη (συγκριτικά με τα άλλα δεσμεύει το μεγαλύτερο ποσό ταννίνης και χρησιμοποιείται στα κόκκινα κρασιά), η ιχθυόκολλα (χρησιμοποιείται στα λευκά κρασιά που είναι φτωχά σε ταννίνες), η αλβουμίνη αυγού (σε λευκά και κόκκινα κρασιά) και αίματος (σε ταννικά κόκκινα κρασιά), η καζεΐνη και τα καζεϊνικά άλατα (στα λευκά κρασιά, τα οποία τα αποχρωματίζει κιόλας) και τα αλγινικά άλατα (αποκλειστικά στα αφρώδη κρασιά). Στα ανόργανα διαυγαστικά μέσα ανήκει ο ευρέως χρησιμοποιούμενος μπεντονίτης, ένα είδος κολλοειδούς αργίλου. Είναι κόλλα με αρνητικό φορτίο και έχει άριστα αποτελέσματα. Δε δημιουργεί καμία αλλοίωση στο κρασί. Απορροφά μόνο νερό και διογκώνεται κατά 8 με 10 φορές. Μπορεί να προστεθεί σε κρασί, αλλά και σε γλεύκη που ζυμώνουν.



Εικόνα 8: Φίλτρο γης διατόμων για χονδροειδή διήθηση

Στο εμπόριο υπάρχουν και πρόσθετα βοηθητικά διαύγασης. Χρησιμοποιείται οινολογική ταννίνη στα λευκά κρασιά για την απομάκρυνση της περίσσειας των πρωτεϊνών ή μαζί με τη ζελατίνη. Το σιδηροκυανούχο κάλιο απομακρύνει την περίσσεια σιδήρου σε ένα λευκό ή ροζέ κρασί. Η πολυβυνιλοπολυπυρολιδόνη (PVPP) χρησιμοποιείται για τη διαύγαση των ερυθρών κρασιών, αλλά και για την πρόληψη κιτρινίσματος στα λευκά.

Για την απομάκρυνση των σωματιδίων και της κόλλας, μετά το κολλάρισμα ακολουθεί διαύγαση με φυγοκέντρηση ή φιλτράρισμα. Ως υλικά για το φιλτράρισμα μπορούν να χρησιμοποιηθούν κυτταρίνη, γη διατόμων και περλίτης (πέτρωμα το οποίο αποτελείται από πυριτικό άργιλλο). Υπάρχουν φίλτρα γης διατόμων (Εικόνα 8), με πλάκες που χρησιμοποιούν φιλτρόχαρτα (Εικόνα 9), και φίλτρα με μεμβράνες (Τσέτουρας 2008).

Οι πηκτινικοί και άλλοι πολυσακχαρίτες μπορεί να προκαλέσουν δυσκολίες κατά τη διεξαγωγή του φιλτραρίσματος, αλλά και να δημιουργήσουν θόλωμα. Οι πολυσακχαρίτες δρουν σαν προστατευτικά κολλοειδή, καθώς συνδέονται με άλλα αιωρούμενα σωματίδια και επιβραδύνουν ή αποτρέπουν την καθίζησή τους.

Τα επίπεδα των πηκτινών μπορούν να μειωθούν με την προσθήκη πηκτινολυτικών ενζύμων. Πρόκειται για μίγμα ενζύμων που περιέχει και πηκτινική λυάση. Η δράση τους έγκειται στο διαχωρισμό των πηκτινικών πολυμερών σε πιο απλές, μη κολλοειδείς μονάδες γαλακτουρονικού οξέος. Με τον τρόπο αυτό οι θετικά φορτισμένες περιοχές των στερεών τμημάτων του σταφυλιού εκτίθενται και συνδέονται με τις αρνητικά φορτισμένες επιφάνειες άλλων κολλοειδών. Καθώς το μέγεθος των συσσωματωμάτων μεγαλώνει, αυτά καθιζάνουν, διευκολύνοντας τη διαύγαση του γλεύκους.



Εικόνα 9: Φίλτρο πλακών με φιλτρόχαρτα για διήθηση μετά την χονδροειδή διήθηση

Σε σταφύλια που έχουν προσβληθεί από *Botrytis cinerea*, οι πηκτινικές ουσίες, στο μεγαλύτερο μέρος τους έχουν καταστραφεί και έχουν αντικατασταθεί από τη γλυκάνη. Πολυμερείς γλυκάνες παράγονται από τον *Botrytis cinerea*, ελευθερώνονται στο γλεύκος και στη συνέχεια απαντώνται στο παραγόμενο κρασί. Εκτός από τον *Botrytis cinerea*, και ο *Saccharomyces cerevisiae*, αλλά και άλλοι μικροοργανισμοί, όπως ο *Pediococcus damnosus*, που είναι αλλοιογόνο βακτήριο, παράγουν γλυκάνες μικρότερου μοριακού βάρους. Η γλυκάνη δημιουργεί πολύ σοβαρά προβλήματα στη διαδικασία του φιλτραρίσματος, ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Η παρουσία της αποτελεί σημαντικό πρόβλημα, αυξάνοντας το ιξώδες του μέσου, ειδικά σε περιπτώσεις υψηλόβαθμων κρασιών, όπου η αλκοόλη προκαλεί την έντονη συσσωμάτωση των μορίων της.

Η χρήση εμπορικών σκευασμάτων που περιέχουν β-γλυκανάσες αποτελεί λύση στο πρόβλημα, αφού τα ένζυμα αυτά υδρολύουν τα πολυμερή, καταστρέφοντας τις προστατευτικές κολλοειδείς τους ιδιότητες, αλλά και την ικανότητά τους να προκαλούν συμφόρηση κατά το φιλτράρισμα. Σκευάσματα με γλυκανάση μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν προκειμένου να προάγουν την αυτόλυση των κυττάρων των ζυμών σε πρωιμότερο στάδιο, απελευθερώνοντας μαννοπρωτεΐνες και άλλα κυτταρικά συστατικά. Για το λόγο αυτό έχει παρασκευαστεί σε βιομηχανικό επίπεδο, από καλλιέργειες του μύκητα *Trichoderma*, μια γλυκανάση. Το ένζυμο αυτό προστίθεται κατά προτίμηση μετά από την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης, σε ποσά 1-3 g/hL. Η δράση του διαρκεί 7 έως 10 ημέρες και πρέπει να πραγματοποιείται σε θερμοκρασία ίση ή μεγαλύτερη των 10 °C. Σε περίπτωση ερυθρής οινοποίησης απαιτούνται μεγαλύτερες δόσεις, αφού τα φαινολικά συστατικά παρεμποδίζουν ως ένα βαθμό τη δράση της γλυκανάσης. Η βιομηχανική γλυκανάση επιπλέον επηρεάζει τα κυτταρικά τοιχώματα των ζυμών και βελτιώνει την κολλοειδή σταθερότητα του κρασιού (Συμεού 2010).



Εικόνα 10: Δεξαμενή σταθεροποίησης με διπλό τοίχωμα και ενδιάμεση μόνωση

2.3.3. Σταθεροποίηση

Η διατήρηση της διαύγειας του κρασιού επιτυγχάνεται με τη σταθεροποίησή του. Σταθεροποίηση στην οινολογία είναι η παρεμπόδιση της δημιουργίας θολώματος ή ιζήματος και η διατήρηση της διαύγειάς του μέχρι την κατανάλωση (Τσέτουρας 2008).

2.3.3.1. Σταθεροποίηση με ψύξη

Με την ψύξη του κρασιού διατηρείται η διαύγειά του. Η ακριβής θερμοκρασία στην οποία γίνεται η σταθεροποίηση με ψύξη είναι ίση με την αρνητική τιμή που προκύπτει από τη σχέση (αλκοολικός βαθμός - 1)/2. Ύστερα από μία βδομάδα ψύξης ακολουθεί το φιλτράρισμα του κρασιού στην ίδια θερμοκρασία. Με την ψύξη επιτυγχάνεται η καθίζηση των κρυστάλλων του όξινου τρυγικού καλίου και του τρυγικού ασβεστίου, των κολλοειδών, όπως είναι οι χρωστικές, οι πρωτεΐνες, οι ενώσεις σιδήρου και η επιβράδυνση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Επίσης, το κρασί που προκύπτει έχει βελτιωμένα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά.

Με την ψύξη, όταν η θερμοκρασία πέσει στους $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$, επιτυγχάνεται η αύξηση του αλκοολικού βαθμού, η οποία δεν επιτρέπεται να ξεπερνά τους 2 βαθμούς. Ένα μέρος του νερού παγώνει και μετά την αφαίρεση των κρυστάλλων, το κρασί συμπυκνώνεται.

Μετά τη ψύξη είναι δυνατή η εμφιάλωση ακόμα και σε νέα κρασιά, χωρίς τον κίνδυνο εμφάνισης ιζήματος στις φιάλες. Η ψύξη, εκτός από μέθοδο σταθεροποίησης του κρασιού, συντελεί στη βελτίωση της γεύσης στα φρέσκα κρασιά και στην επιτάχυνση της παλαίωσης (Τσέτουρας 2008, Σουφλερός 2000).

2.3.3.2. Σταθεροποίηση με θέρμανση

Με τη θέρμανση επιτυγχάνεται βιολογική και ενζυμική σταθεροποίηση, αντιμετώπιση του πρωτεϊνικού θολώματος και του θολώματος χαλκού, σχηματισμός προστατευτικών κολλοειδών, επιτάχυνση της παλαίωσης και διάλυση των πυρήνων κρυστάλλωσης.

Η βιολογική σταθεροποίηση επιτυγχάνεται με θέρμανση απουσία αέρα, και έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή των μικροοργανισμών που βρίσκονται στο κρασί (παστερίωση). Η καταστροφή εξαρτάται από τη θερμοκρασία και τη διάρκεια της θέρμανσης. Μεγάλος αλκοολικός βαθμός, χαμηλό pH, μεγάλη ποσότητα θειώδη ανυδρίτη και μικρότερη περιεκτικότητα σε σάκχαρα βοηθούν στην αποτελεσματικότητα της θέρμανσης. Μία επιτυχημένη μέθοδος βιολογικής σταθεροποίησης είναι η θέρμανση του κρασιού στους $45\text{-}48\text{ }^{\circ}\text{C}$ για τα ξηρά κρασιά και στους $55\text{-}60\text{ }^{\circ}\text{C}$ για τα κρασιά που έχουν αναγωγικά σάκχαρα. Το κρασί εμφιαλώνεται εν θερμώ και η φιάλη ξαναπαίρνει φυσιολογικά τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος. Η ενζυμική

σταθεροποίηση αφορά περισσότερο τα οξειδωτικά ένζυμα λακκάση και τυροσινάση. Η λακκάση καταστρέφεται σε θερμοκρασία μεγαλύτερη των 60 °C και η τυροσινάση πάνω από τους 75 °C.

Η αντιμετώπιση του πρωτεϊνικού θολώματος γίνεται με θέρμανση του κρασιού στους 80 °C για 10 λεπτά ή στους 60 °C για μισή ώρα. Ακολουθεί η διαύγαση του 24 ώρες μετά τη ψύξη του. Η διαύγεια παραμένει, αρκεί το κρασί να έχει εμφιαλωθεί. Με τη θέρμανση, επιτυγχάνεται επίσης ο σχηματισμός των προστατευτικών κολλοειδών. Τα κολλοειδή σωματίδια που βρίσκονται στο κρασί διογκώνονται με τη θέρμανση στους 80 °C και μετατρέπονται σε προστατευτικά κολλοειδή. Έτσι, δεν καθιζάνουν τα σωματίδια και προστατεύεται η διαύγεια του κρασιού.

Όταν η περιεκτικότητα του χαλκού είναι μεγαλύτερη από 0.5 mg/L εμφανίζεται θόλωμα, ενώ πάνω από 2-3 mg/L εμφανίζεται καστανέρυθρο ίζημα. Η απομάκρυνση της περίσσειας χαλκού γίνεται με κολλάρισμα μετά τη θέρμανση του κρασιού. Επίσης, με τη θέρμανση διαλύονται οι κρυσταλλικοί πυρήνες και έτσι εμποδίζεται ο σχηματισμός των τρυγικών ιζημάτων. Η επιτάχυνση της παλαίωσης επιτυγχάνεται με την παρατεταμένη θέρμανση του κρασιού σε αναγωγικό περιβάλλον (απουσία οξυγόνου) (Τσέτουρας 2008).

2.3.3.3. Σταθεροποίηση με άλλα μέσα

Η σταθεροποίηση του κρασιού μπορεί να γίνει και με άλλα μέσα όπως με τον μπεντονίτη, το αραβικό κόμμι, το μετατρυγικό οξύ και με ιοντοεναλλαγή. Ο μπεντονίτης, λόγω των χαρακτηριστικών ιδιοτήτων του, εκτός από διαυγαστικό, είναι πολύ αποτελεσματικός στην σταθεροποίηση των κρασιών. Χρησιμοποιείται ενάντια στα θολώματα χαλκού και τα πρωτεϊνικά θολώματα. Το αραβικό κόμμι εμποδίζει αποτελεσματικά το θόλωμα χαλκού, σιδήρου και το θόλωμα των χρωστικών στα κόκκινα κρασιά. Το μετατρυγικό οξύ χρησιμοποιείται για τη προφύλαξη από την καταβύθιση τρυγικών αλάτων. Το μειονέκτημά του είναι ότι παρέχει προστασία μόνο για μικρό χρονικό διάστημα. Στους 0 °C η δράση του διαρκεί για χρόνια, στους 20 °C όμως μόνο για δύο μήνες. Οι εναλλάκτες ιόντων είναι μέθοδος οικονομικότερη από την ψύξη και δεν απαιτεί χρόνο. Χρησιμοποιούνται ρητίνες ιοντοεναλλαγής για την αφαίρεση της περίσσειας καλίου και ασβεστίου, με σκοπό την αποφυγή σχηματισμού τρυγικών αλάτων, την αφαίρεση του σιδήρου και του χαλκού, που προκαλούν θολώματα, και την αύξηση ή μείωση της οξύτητας του γλεύκους και του κρασιού (Τσέτουρας 2008).

3. Πολυφαινόλες

3.1. Τα φαινολικά παράγωγα στο σταφύλι και στο κρασί

Οι φαινόλες είναι μία μεγάλη και περίπλοκη ομάδα από συστατικά πρωταρχικής σημασίας στα χαρακτηριστικά και στην ποιότητα των κόκκινων κρασιών. Είναι, επίσης, σημαντικές και στα λευκά κρασιά, αλλά περιέχονται σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις. Οι φαινόλες είναι εξίσου σπουδαίες με τα οξέα, τα σάκχαρα και τις αλκοόλες, και παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον τόσο στη θεωρητική όσο και στην πρακτική οινολογία. Τα συστατικά αυτά είναι υπεύθυνα για το χρώμα

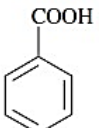
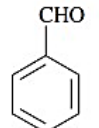
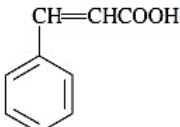
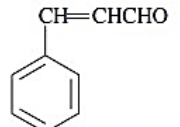
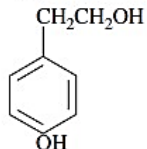
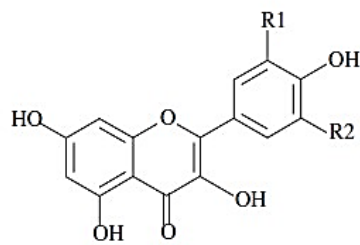
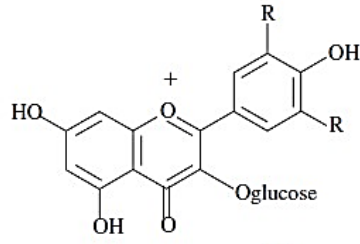
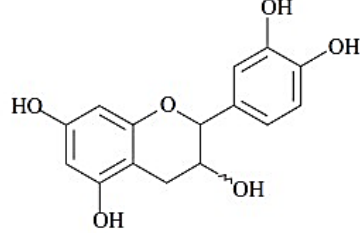
των κρασιών, συμμετέχουν στη διαμόρφωση ορισμένων γευστικών χαρακτηριστικών αυτών (στυφάδα, τραχύτητα), προσφέρουν στο κρασί αντιοξειδωτική και αντιβακτηριδιακή προστασία και παίζουν αποφασιστικό ρόλο στην παλαιώση και στις διάφορες τεχνολογικές επεξεργασίες τους (π.χ. κολλάρισμα).

Η κύρια προέλευση των φαινολικών είναι τα στερεά μέρη των σταφυλιών. Επομένως, είναι αυτά που κάνουν τη διαφορά ανάμεσα στα λευκά και κόκκινα κρασιά. Μικρές ποσότητες μπορούν επίσης να εκχυλιστούν από τα ξύλινα βαρέλια. Κατά τη ζύμωση, μόνο ίχνη φαινολών μπορούν να παραχθούν από τον μεταβολισμό των ζυμών (Jackson 2008, Σουφλερός 2000).

Φαινόλες ονομάζονται τα υδροξυλιωμένα παράγωγα των αρωματικών υδρογονανθράκων που περιέχουν ένα ή περισσότερα υδροξύλια σε αντικατάσταση ισάριθμων υδρογόνων συνδεδεμένων με τα άτομα άνθρακα του δακτυλίου. Τα βενζολικά παράγωγα με υδροξύλιο σε αντικατάσταση υδρογόνου της πλευρικής αλυσίδας ονομάζονται αρωματικές αλκοόλες και όχι φαινόλες. Η ευκινησία των ηλεκτρονίων του δακτυλίου του βενζολίου δημιουργεί το φαινόμενο του συντονισμού (μεσομέρεια). Πρόκειται για τη μετατόπιση των ηλεκτρονίων των τριών διπλών δεσμών του βενζολικού πυρήνα και των δύο ζευγών ηλεκτρονίων του οξυγόνου. Η μετατόπιση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση θετικού φορτίου επί του οξυγόνου (άρα ευκολότερη μετακίνηση του υδρογόνου ως πρωτονίου) και ενός αρνητικού φορτίου σε κάποια κορυφή του δακτυλίου, σε *ορθο* ή *παρα* θέση. Στο φαινόμενο του συντονισμού οφείλεται η σταθερότητα του βενζολικού δακτυλίου, με συνέπεια να σπάει πολύ δύσκολα, ενώ δίνει αντιδράσεις αντικατάστασης και σπάνια προσθήκης. Στις φαινόλες δημιουργούνται διαμοριακές συζεύξεις με δεσμό υδρογόνου. Το υδρογόνο τείνει να ενωθεί με οξυγόνο, είτε του ίδιου, είτε άλλου μορίου. Έτσι, οι ενδομοριακές συζεύξεις είναι συνηθισμένες στα φαινολικά παράγωγα. Επίσης, η παρουσία δεσμού υδρογόνου μειώνει τη δραστηριότητα των φαινολικών ομάδων, όπως τη διαλυτότητα σε αλκαλικό διάλυμα και την ικανότητα σχηματισμού εστέρων και αιθέρων.

Οι φαινόλες δεν εστεροποιούνται εύκολα στη φύση, αντίθετα με τις αλκοόλες, και οι λίγοι εστέρες που απαντούν στα φαινολικά παράγωγα αποτελούν ένωση μεταξύ της όξινης ομάδας ενός φαινολικού οξέος και του αλκοολικού υδροξυλίου ενός άλλου μορίου, δηλαδή είναι εστέρες οξέων-αλκοολών και όχι οξέων-φαινολών. Αντίθετα, ο σχηματισμός αιθέρων είναι πολύ πιο συνηθισμένος, κυρίως με φαινολική ομάδα και με μεθυλική αλκοόλη. Οι φαινολαιθέρες (γουαϊακόλη, ευγενόλη) έχουν ευχάριστη συνήθως οσμή και είναι αρωματικά συστατικά των κρασιών (Συμεού 2010).

Οι κυριότερες φαινόλες που έχουν βρεθεί στο κρασί ανήκουν είτε στα διφαινολοπροπανοειδή ή αλλιώς φλαβονοειδή (φλαβονόλες, φλαβαν-3-όλες, ανθοκυάνες) είτε στα φαινολοπροπανοειδή ή αλλιώς μη φλαβονοειδή (κυρίως φαινολικά οξέα). Στην Εικόνα 11 παρουσιάζονται οι επικρατέστερες ομάδες καθώς και η προέλευσή τους (Jackson 2008).

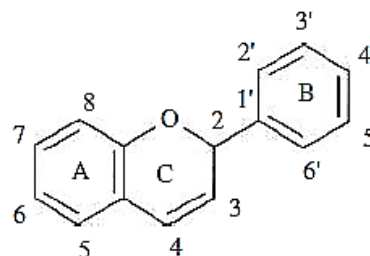
General type	General structure	Examples	Major source ^a
Nonflavonoids			
Benzoic acid		Benzoic acid Vanillic acid Gallic acid Protocatechuic acid	G, O O G, O G, O
Benzaldehyde		Hydrolyzable tannins Benzaldehyde Vanillin Syringaldehyde	G G, O, Y O O
Cinnamic acid		<i>p</i> -Coumaric acid Ferulic acid Chlorogenic acid Caffeic acid	G, O G, O G G
Cinnamaldehyde		Coniferaldehyde Sinapaldehyde	O O
Tyrosol		Tyrosol	Y
Flavonoids			
Flavonols		Quercetin Kaempferol Myricetin	G G G
Anthocyanins		Cyanin Delphinin Petunin Peonin Malvin	G G G G G
Flavan-3-ols		Catechin Epicatechin Gallocatechin Procyanidins Condensed tannins	G G G G G

^a G = grape; O = oak; Y = yeast.

Εικόνα 11: Οι φλαβονοειδείς και οι μη φλαβονοειδείς φαινόλες, και η προέλευσή τους

3.2. Φλαβονοειδείς φαινόλες

Τα φλαβονοειδή χαρακτηρίζονται από έναν σκελετό C₆-C₃-C₆, που αποτελείται από δύο φαινολικούς δακτυλίους (Α και Β) συνδεδεμένους με έναν κεντρικό δακτύλιο πυρανίου (C) που περιέχει οξυγόνο (Εικόνα 12). Τα κυριότερα φλαβονοειδή στο κρασί είναι οι φλαβονόλες, οι κατεχίνες (φλαβαν-3-όλες) και οι ανθοκυάνες στα κόκκινα κρασιά. Επίσης, σε μικρές ποσότητες περιέχονται οι φλαβαν-3,4-διόλες (λευκοανθοκυάνες). Τα φλαβονοειδή μπορούν να βρίσκονται σε ελεύθερη μορφή ή πολυμερισμένα μαζί με άλλα φλαβονοειδή, σάκχαρα, μη φλαβονοειδή ή συνδυασμό όλων αυτών. Αυτά που είναι εστεροποιημένα με σάκχαρα και με μη φλαβονοειδή, ονομάζονται γλυκοζίτες και ακυλιωμένα παράγωγα, αντίστοιχα. Τα φλαβονοειδή στα σταφύλια, αλλά και σε άλλα φυτά, θεωρείται ότι διαδραματίζουν την πρώτη γραμμή άμυνας ενάντια σε παθογόνους μικροοργανισμούς, παράσιτα έντομα και τα φυτοφάγα.

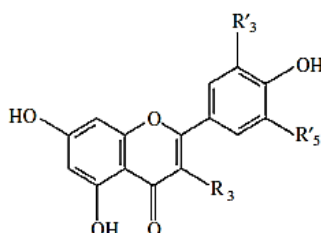


Εικόνα 12: Βασικός σκελετός των φλαβονοειδών

Τα φλαβονοειδή είναι χαρακτηριστικά στα κόκκινα κρασιά, πολύ περισσότερο απ' ό τι είναι στα λευκά. Στα κόκκινα αποτελούν πάνω από το 85% των ολικών φαινολικών, ενώ στα λευκά λιγότερο από το 20%. Το υπόλοιπο αποτελείται κυρίως από το μη φλαβονοειδές, καφεϊκό οξύ (Jackson 2008).

3.2.1. Φλαβονόλες

Στους φλοιούς, οι φλαβονόλες συσσωρεύονται στα κυτταρικά κενοτόπια της επιδερμίδας και της εξωτερικής υποδερμίδας. Από αυτή τη θέση (μαζί με τις ανθοκυάνες των ερυθρών ποικιλιών), απορροφούν την υπεριώδη ακτινοβολία, προστατεύοντας τους εσωτερικούς ιστούς από τις βλαβερές συνέπειες της ηλιακής ακτινοβολίας UV. Οι φλαβονόλες έχουν κίτρινο χρώμα και βρίσκονται στους φλοιούς τόσο των ερυθρών όσο και των λευκών ποικιλιών σταφυλιού. Οι σημαντικότερες είναι η καιμπφερόλη, η κερκετίνη και η μυρισετίνη (Εικόνα 13). Και οι τρεις αυτές φλαβονόλες υπάρχουν στα σταφύλια των κόκκινων κρασιών, ενώ μόνο οι δύο πρώτες στα σταφύλια που παράγουν τα λευκά κρασιά (Jackson 2008, Ribèreau - Gayon et al. 2006).



a) R ₃ = OH		
R' ₃	R' ₅	Name of aglycone
H	H	Kaempferol
OH	H	Quercetin
OH	OH	Myricetin

Εικόνα 13: Φλαβονόλες

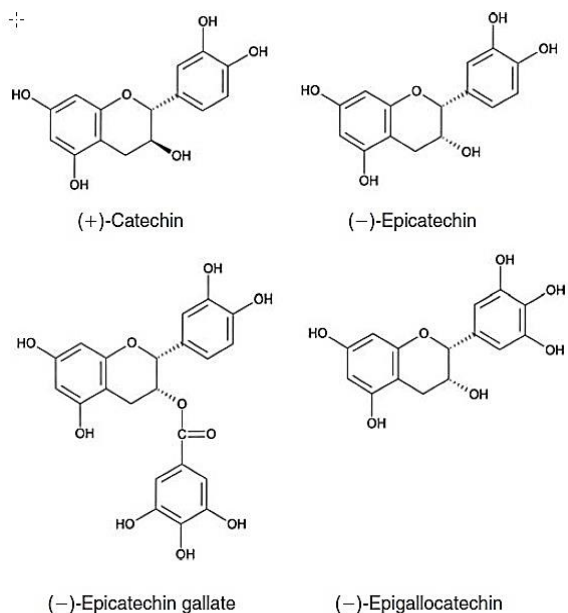
Οι φλαβονόλες δεν εμφανίζονται συχνά στους βοστρύχους. Στα κρασιά, μπορούν να υπάρξουν ως έγχρωμα σύμπλοκα μαζί με τις ανθοκυάνες. Από τα φλαβονοειδή των σταφυλιών, οι φλαβονόλες καταλαμβάνουν το μικρότερο ποσοστό 1-10% του ολικού φαινολικού φορτίου,

ανάλογα με την ποικιλία και τον τρόπο καλλιέργειας. Συντίθενται κατά το στάδιο της ωρίμανσης των σταφυλιών (Jackson 2008).

Οι φλαβονόλες περιέχονται στα κόκκινα κρασιά σε άγλυκη μορφή, καθώς οι ετεροζίτες υδρολύονται εύκολα κατά την αλκοολική ζύμωση και βρίσκονται στα κόκκινα κρασιά σε συνολική ποσότητα μερικών δεκάδων mg/L, ενώ στα λευκά, λόγω της απουσίας των φλοιών κατά την οινοποίηση, βρίσκονται μόνο σε ίχνη (Κουράκου - Δραγώνα 1998).

3.2.2. Κατεχίνες (φλαβαν-3-όλες)

Το παράγωγο της φλαβονόλης, που έχει τον κεντρικό ετεροκυκλικό δακτύλιο υδρογονωμένο, λέγεται φλαβαν-3-όλη. Στη φύση απαντούν διάφορα υδροξυλιωμένα παράγωγα της φλαβαν-3-όλης, γνωστά με το όνομα κατεχίνη, από τα οποία την μεγαλύτερη διάδοση την έχει η κατεχίνη, το όνομα της οποίας επεκτάθηκε σε όλη την οικογένεια των φλαβανοειδών φαινολών. Οι συνηθισμένες ενώσεις των κατεχινών στα σταφύλια είναι η (+)-κατεχίνη, η (-)-επικατεχίνη, ο (-)-γαλλικός εστέρας της επικατεχίνης, και λιγότερο συχνά η (-)-επιγαλλοκατεχίνη, που παρουσιάζονται στην Εικόνα 14 (Κουράκου - Δραγώνα 1998, Jackson 2008).



Εικόνα 14: Τα μόρια των φλαβαν-3-ολών στα σταφύλια

Η κατεχίνη είναι ουσία ευοξειδωτή, λόγω των δυο πλευρικών υδροξυλίων σε *ορθο*- θέση στον πλευρικό βενζολικό δακτύλιο, που όταν θερμανθεί σε όξινο περιβάλλον, πολυμερίζεται προς ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους, τα φλοιοβαφένεια. Το χρώμα των διαλυμάτων αυτών, που είναι αρχικά κίτρινα, σιγά σιγά σκουραίνει, ανάλογα με το βαθμό πολυμερισμού και μπορεί να φτάσει μέχρι καστανόμαυρο. Σε τέτοιες φύσεως οξειδώσεις και συνενώσεις, οφείλεται το καφέτισμα των κρασιών, και γι' αυτό η παρουσία κατεχινών στα λευκά κρασιά είναι ανεπιθύμητη (Κουράκου - Δραγώνα 1998).

Στα σταφύλια, ο πολυμερισμός των κατεχινών παράγει τις προκυανιδίνες (πρόδρομοι των ταννινών). Οι προκυανιδίνες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με βάση τη φύση του φλαβονοειδούς μονομερούς, το είδος των δεσμών, την εστεροποίηση με άλλα συστατικά, ή τις λειτουργικές ιδιότητες. Για παράδειγμα, χωρίζονται σε προανθοκυανιδίνες ή προδελφινιδίνες, με βάση τη διάσπασή τους υπό όξινες συνθήκες, απελευθερώνοντας είτε κυανιδίνη είτε δελφινιδίνη, αντίστοιχα. Η πιο κοινή δομή των προκυανιδινών περιέχει μόνο έναν απλό ομοιοπολικό δεσμό άνθρακα μεταξύ γειτονικών φλαβονοειδών μορίων. Επειδή το μόριο, λόγω της έλλειψης διπλού δεσμού στον ετεροκυκλικό δακτύλιο, δεν είναι επίπεδο, ένα μέρος του μορίου της προκυανιδίνης

βρίσκεται προς τα εμπρός (ανώτερο μέρος) και ένα προς τα πίσω (κατώτερο μέρος). Η πιο συνηθισμένη σύνδεση των διμερών προκυανιδινών είναι ο ομοιοπολικός δεσμός μεταξύ του C₄ του ετεροκυκλικού δακτυλίου του ανώτερου μορίου κατεχίνης με τον C₈ του A δακτυλίου του κατώτερου μορίου. Η σύνδεση αυτή σχηματίζει προκυανιδίνες τύπου B (B₁ έως B₄), χαρακτηριστικές των σταφυλιών και του κρασιού. Μία πιο σπάνια σύνδεση είναι αυτή μεταξύ των C₄ και C₆, καθώς και αυτή μεταξύ των C₂ και του υδροξυλίου του C₇, που παράγει προκυανιδίνες τύπου A, οι οποίες όμως δεν έχουν βρεθεί στα σταφύλια ή τα κρασιά. Ο πολυμερισμός μπορεί επίσης να συμβεί και σε άλλες θέσεις, ανάλογα με το εάν η σύνδεση γίνεται σε συνδυασμό με οξειδωση, με ακεταλδεϋδη ή γλυοξυλικό οξύ.

Οι φυσικές προκυανιδίνες είναι αφυδρογονωμένες κατεχίνες. Οι αφυδρογονώσεις μπορούν να συνεχιστούν με συνενώσεις περισσότερων μορίων προς σχηματισμό συμπυκνωμένων προκυανιδινών. Στα σταφύλια έχουν βρεθεί μέχρι και τετραμερείς προκυανιδίνες, ενώ στα φρέσκα κρασιά έχουν μικρό μοριακό βάρος μέχρι τα 600 και σπάνια μέχρι τα 900. Πρόκειται, επομένως, για διμερή και σπανιότερα για τριμερή παράγωγα, γεγονός που σημαίνει ότι οι προκυανιδίνες μεγαλύτερου βαθμού συμπύκνωσης εκχυλίζονται δύσκολα. Κατά την ωρίμανση και παλαίωση των κρασιών, οι προκυανιδίνες ενώνονται μεταξύ τους, καθώς και με άλλα μόρια με αργό ρυθμό, προς σχηματισμό πολυμερών με μήκος από 8 έως 14 μονάδες και μοριακού βάρους 2000 έως 5000, που αντιστοιχούν στις συμπυκνωμένες ταννίνες (Jackson 2008, Κουράκου - Δραγώνα 1998).

Οι ταννίνες είναι, εξ' ορισμού, ουσίες ικανές να παράγουν σταθερές αδιάλυτες ενώσεις με τις πρωτεΐνες και άλλα πολυμερή, όπως πολυσακχαρίτες. Λόγω της ιδιότητάς τους αυτής, χρησιμοποιούνται στην κατεργασία του δέρματος, όπου συνενώνονται με το κολλαγόνο και καθιστούν το δέρμα άσηπτο και αδιάβροχο. Το όνομά τους προέρχεται από την ικανότητά τους να μαυρίζουν (tan) το δέρμα. Όσον αφορά την οινοποίηση, παίρνουν μέρος στη διαύγαση (κολλάρισμα) των κρασιών, όπου χρησιμοποιούνται διάφορες πρωτεϊνιούχες κόλλες. Έτσι, οι ταννίνες σχηματίζουν με τις πρωτεΐνες, ή και τα αλκαλοειδή, μεγαλομοριακά σύμπλοκα, τα οποία λόγω του βάρους τους καθιζάνουν και παρασύρουν τα διάφορα αιωρήματα. Τέλος, προκαλούν την καθίζηση των πρωτεϊνών και των γλυκοπρωτεϊνών του σιέλου, με αποτέλεσμα να δημιουργείται το αίσθημα της στυφής και πικρής γεύσης των κόκκινων κρασιών (Σουφλερός 2000, Jackson 2008).

Οι ταννίνες χαρακτηρίζονται από την αντιοξειδωτική τους δράση, καθώς επίσης, και από την ικανότητά τους να σχηματίζουν ενώσεις με τον σίδηρο. Οι ενώσεις αυτές συμμετέχουν στο σιδηρικό θόλωμα των κρασιών. Κατά τη διάρκεια της παλαίωσης των κρασιών, οι ταννίνες εξακολουθούν να πολυμερίζονται, με αποτέλεσμα να μετατρέπονται σε μεγαλομοριακά σύμπλοκα, που αποτελούν τη βάση για το σχηματισμό των ιζημάτων των χρωστικών ουσιών. Επιπλέον, ο πολυμερισμός των ταννινών, σε συνδυασμό βέβαια με τις επιδράσεις άλλων παραγόντων (O₂, Fe κ.α.), μεταβάλλει το χρώμα των κρασιών από ζωνρό κόκκινο σε κεραμιδί. Παράλληλα με τον πολυμερισμό των ταννινών, αλλά μόνο μέχρι ένα ορισμένο σημείο, αυξάνει και η ένταση των χαρακτηριστικών ιδιοτήτων τους. Πέρα από το σημείο αυτό, όμως, η ένταση

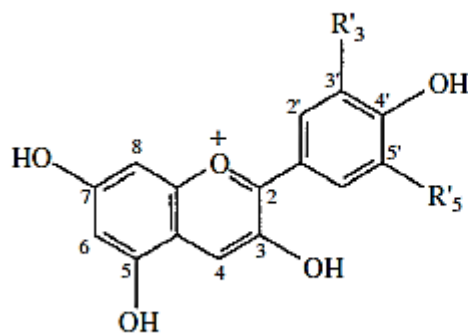
των ιδιοτήτων των ταννινών μειώνεται. Επιπλέον, καθώς αυξάνεται ο βαθμός πολυμερισμού, μειώνεται η διαλυτότητα του πολυμερούς, και έτσι δεν μπορεί να αντιδράσει ή να καταβυθίσει τις πρωτεΐνες (Σουφλερός 2000).

Οι συμπυκνωμένες ταννίνες αποτελούν ουσιαστικά το σώμα του κρασιού και το ποσό τους αυξάνεται με την ηλικία του κρασιού. Οι αλυσίδες τους σχηματίζουν ένα είδος σκελετού, στον οποίο προστίθενται και άλλα μόρια ή άλλες ομάδες μορίων (πεπτίδια, πολυσακχαρίτες, ανόργανα στοιχεία, μόρια νερού και ίσως τρυγικό οξύ). Η παρεμβολή, ειδικότερα, πολυσακχαριτών και πεπτιδίων οδηγεί σε ένα είδος απενεργοποίησης των ταννινικών ιδιοτήτων των συμπυκνωμένων ταννινών, που εκδηλώνεται με μειωμένη δραστηριότητα επί των πρωτεϊνών, και επομένως, με το γευστικό «μαλάκωμα» των κρασιών, όταν ωριμάζουν και παλαιώνουν υπό κατάλληλες συνθήκες.

Εκτός από τις συμπυκνωμένες ταννίνες των κρασιών, οι οποίες προκύπτουν από τον πολυμερισμό των προκυανιδινών, υπάρχουν και οι υδρολύσιμες ταννίνες, οι οποίες ανήκουν στα μη φλαβονοειδή. Οι υδρολύσιμες ταννίνες αποτελούνται από ένα μόριο σακχάρου (γλυκόζη ή πολυσακχαρίτης), του οποίου πολλά υδροξύλια είναι εστεροποιημένα με διάφορα φαινολικά οξέα, κυρίως με το γαλλικό (γαλλοταννίνες) ή με το διμερές του γαλλικού οξέος, το ελλαγικό οξύ (ελλαγιταννίνες). Δεν περιέχονται στα σταφύλια, αλλά είναι δυνατόν να βρεθούν σε κρασιά, αφού αποτελούν τις κύριες εμπορικές ταννίνες, που χρησιμοποιούνται στις διάφορες κατεργασίες του κρασιού. Επίσης, επειδή περιέχονται υδρολύσιμες ταννίνες στα δρύινα βαρέλια, τα κρασιά που παλαιώσαν μέσα σε αυτά, περιέχουν μικροποσότητες προϊόντων υδρόλυσης των ταννινών του ξύλου, κυρίως γαλλικό και ελλαγικό οξύ (Κουράκου - Δραγώνα 1998, Jackson 2008).

3.2.3. Ανθοκυάνες

Οι ανθοκυάνες είναι οι κόκκινες χρωστικές ενώσεις των σταφυλιών, οι οποίες βρίσκονται στους φλοιούς τους, καθώς και σπάνια σε μερικές ποικιλίες και στη σάρκα τους. Πρόκειται για γλυκοζυλιωμένα παράγωγα των ανθοκυανιδινών. Η δομή των ανθοκυανιδινών περιλαμβάνει το κατιόν του φλαβυλίου, το οποίο αποτελείται από δύο βενζολικούς δακτυλίους (Α και Β), που περιβάλλουν ένα δακτύλιο πυρυλίου. Έχουν προσδιορισθεί πέντε ανθοκυανιδίνες στα σταφύλια και στα κρασιά, όπως φαίνεται στην Εικόνα 15. Αυτές είναι η κυανιδίνη, η παιονιδίνη, η δελφινιδίνη, η πετουνιδίνη και η μαλβιδίνη. Από αυτές η πιο διαδεδομένη στη φύση είναι η κυανιδίνη, παρόλο που είναι, όπως και η δελφινιδίνη, η πιο ασταθής. Θεωρείται ότι οι δύο αυτές ανθοκυανιδίνες είναι πρόδρομοι ανθοκυανιδινών σταθερότερων μορφών, όπως η παιονιδίνη και η μαλβιδίνη. Πράγματι, ενώ στα σταφύλια των ερυθρών ποικιλιών εμφανίζεται αμέσως μετά τον περκασμό η κυανιδίνη, της οποίας η συγκέντρωση αυξάνεται, όπως και της δελφινιδίνης, κατά τις πρώτες δεκαπέντε ημέρες ωρίμανσης των σταφυλιών, τελικά επικρατεί κατά πολύ η μαλβιδίνη, που είναι η κύρια ανθοκυανιδίνη όλων σχεδόν των σταφυλιών των κόκκινων κρασιών (Ribèreau - Gayon et al. 2006, Κουράκου - Δραγώνα 1998).

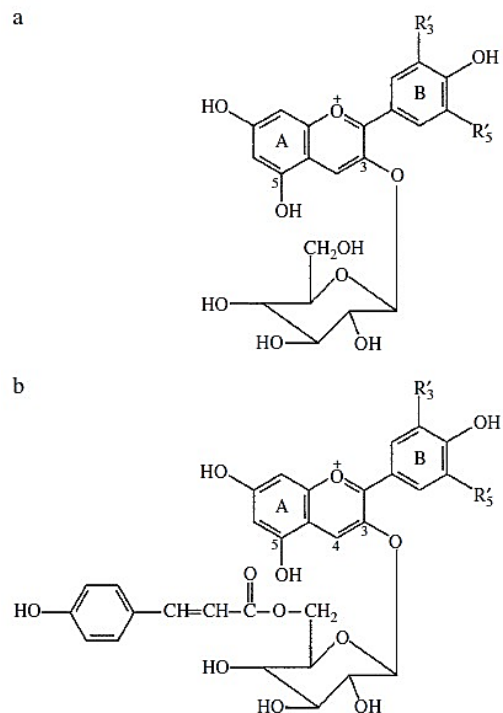


R' ₃	R' ₅	Name of aglycone
OH	H	Cyanidin
OCH ₃	H	Peonidin
OH	OH	Delphinidin
OH	OCH ₃	Petunidin
OCH ₃	OCH ₃	Malvidin

Εικόνα 15: Δομή μορίων ανθοκυανιδίων

Στη φύση, οι ανθοκυανιδίνες δεν απαντούν ελεύθερες, αλλά ενωμένες με σάκχαρα, ως ετεροζίτες, οι οποίες, όπως ήδη αναφέρθηκε, ονομάζονται ανθοκυάνες. Μεταξύ αυτών, εκείνες που έχουν το σάκχαρο ενωμένο στην θέση 3 του φλαβυλίου, είναι οι πιο διαδεδομένες (Εικόνα 16a). Όλες οι γνωστές ανθοκυάνες έχουν ένα μόριο σακχάρου σε αυτή τη θέση. Η γλυκοζιδίωσή του είναι απαραίτητη για τη σταθεροποίηση του μορίου. Εάν στην ανθοκυάνη υπάρχει και ένα δεύτερο μόριο σακχάρου, αυτό βρίσκεται πάντα στη θέση 5. Οι διγλυκοζιλιωμένες ανθοκυάνες είναι πολύ διαδεδομένες (Κουράκου - Δραγώνα 1998).

Είναι, επίσης, διαδεδομένες στη φύση οι ακυλιωμένες ανθοκυάνες. Σ' αυτές τις χρωστικές, το αλκοολικό υδροξύλιο της θέσης 6 του σακχάρου, είναι εστεροποιημένο με ένα οργανικό οξύ της αλειφατικής σειράς (π.χ. οξικό οξύ) ή της αρωματικής (π.χ. π-κουμαρικό οξύ, καφεϊκό οξύ) (Εικόνα 16b). Σε όλες τις ακυλιωμένες ανθοκυάνες, το μόριο του σακχάρου είναι πάντα ενωμένο στη θέση 3 του φλαβυλίου. Επίσης, σε κάποια κόκκινα κρασιά έχουν βρεθεί σε ίχνη ακετυλιωμένες ανθοκυάνες με ασυνήθιστα οργανικά οξέα, όπως το γαλακτικό και το φερουλικό οξύ (Alcalde-Eon et al. 2006). Έχει διαπιστωθεί ότι η έκθεση των σταφυλιών στην ηλιακή ακτινοβία μειώνει το ποσοστό των ακυλιωμένων ανθοκυανών (Haselgrove et al. 2000, Rustioni et al. 2011). Σε όλες τις ελληνικές ποικιλίες (Αγιωργίτικο, Ξινόμαυρο, Κοτσιφάλι, Μανδηλαριά) διαπιστώθηκε η παρουσία του μονογλυκοζίτη-3 της μαλβιδίνης, ακυλιωμένου με οξικό οξύ, κυρίως όμως με π-κουμαρικό



Εικόνα 16: Δομή των (a) μονογλυκοζίτη-3 της ανθοκυάνης, (b) ακυλιωμένος μονογλυκοζίτη-3 από το π-κουμαρικό οξύ στην θέση 5 της γλυκόζης

οξύ. Μόνο οι μονογλυκοζίτες των ανθοκυανών και οι ακυλιωμένοι μονογλυκοζίτες των ανθοκυανών έχουν βρεθεί σε σταφύλια του είδους *Vitis vinifera* και στα κρασιά τους. Η παρουσία διγλυκοζιτών των ανθοκυανών είναι χαρακτηριστικό ορισμένων ειδών του γένους *Vitis* (*V. riparia* και *V. rupestris*), αλλά έχει βρεθεί και σε ίχνη σε κάποια σταφύλια του *V. vinifera* (Ribèreau - Gayon et al. 2006, Κουράκου - Δραγώνα 1998).

Το χρώμα αυτών των χρωστικών εξαρτάται από τις συνθήκες του μέσου (pH, θειώδης ανυδρίτης), καθώς και από τη μοριακή δομή και το περιβάλλον. Αφενός, η υποκατάσταση του δακτυλίου Β οδηγεί σε μετατόπιση του μήκους κύματος της μέγιστης απορρόφησης προς το ιώδες, αφετέρου η γλυκοζιλίωση και η ακυλίωση του μορίου οδηγεί στη μετατόπιση του χρώματος προς την αντίθετη κατεύθυνση, προς το πορτοκαλί (Ribèreau - Gayon et al. 2006).

Λόγω της ύπαρξης των δραστικών φαινολικών υδροξυλίων στο μόριό τους, ιδιαίτερα όταν αυτά βρίσκονται σε *ορθο*-θέση, οι ελεύθερες ανθοκυάνες αποτελούν ευαίσθητα υποστρώματα χημικών και ενζυμικών οξειδώσεων. Οι ανθοκυάνες έχουν την ιδιότητα να ενώνονται με τις ταννίνες προς πολυμερή ταννινών-ανθοκυανών που έχουν, αντίθετα προς τις ελεύθερες ανθοκυάνες, αρκετή σταθερότητα. Γι' αυτό θεωρείται ότι οι ταννίνες σταθεροποιούν το χρώμα των κόκκινων κρασιών. Όταν τα πολυμερή αυτά είναι μικρού μοριακού βάρους ονομάζονται συμπυκνωμένες ανθοκυάνες, στις οποίες το ανθοκυανικό μόριο εξακολουθεί να έχει τη μορφή του φλαβυλίου και είναι, επομένως, έγχρωμο. Αντίθετα, σε πολυμερή υψηλού βαθμού συμπύκνωσης επικρατεί το χρώμα της ταννίνης, και τότε οι ανθοκυάνες αυτές ονομάζονται πολυμερισμένες. Σ' αυτές οφείλεται το κεραμιδί χρώμα που αποκτούν τα κόκκινα κρασιά παλαιώνοντας (Κουράκου - Δραγώνα 1998).

Σε αναγωγικό περιβάλλον, οι ελεύθερες ανθοκυάνες αποχρωματίζονται, και ο αποχρωματισμός είναι μόνιμος απουσία αέρα. Όμως η αντίδραση είναι αμφίδρομη, και το χρώμα επανέρχεται σταδιακά, ανάλογα με τις συνθήκες. Σ' αυτή την ιδιότητα οφείλεται το γεγονός ότι το φρέσκο κρασί μέσα στη δεξαμενή ερυθρής οινοποίησης έχει, αμέσως μετά τη ζύμωση, ανοιχτότερο χρώμα από αυτό που αποκτά μετά την πρώτη μετάγγιση.

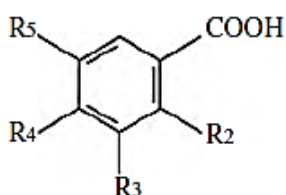
Στα φρέσκα κρασιά, όπου υπάρχει υψηλό ποσοστό ελεύθερων ανθοκυανών, σε αντίθεση με τα παλαιωμένα όπου οι ελεύθερες ανθοκυάνες τείνουν να εξαφανιστούν, η προσθήκη θειώδη ανυδρίτη αποχρωματίζει το κρασί, αφού ένα μέρος του δεσμεύεται από τις ανθοκυάνες. Το ποσοστό αποχρωματισμού εξαρτάται από το pH, τον ελεύθερο θειώδη ανυδρίτη και τη συγκέντρωση των ελεύθερων ανθοκυανών. Όσο αυξάνεται το pH, τόσο μειώνεται ο αποχρωματισμός. Η αντίδραση των ανθοκυανών με τον θειώδη ανυδρίτη είναι αμφίδρομη. Όταν υπό την επίδραση του οξυγόνου, η αλκοόλη οξειδώνεται αργά προς ακεταλδεΐδη, που έχει μεγάλη συγγένεια με τον θειώδη ανυδρίτη, ο ελεύθερος θειώδης ανυδρίτης του κρασιού μειώνεται λόγω της δέσμευσής του από την αλδεϋδομάδα, οπότε οι ανθοκυάνες αποδεσμεύουν τον θειώδη ανυδρίτη, προς αποκατάσταση της ισορροπίας. Έτσι, το χρώμα επανέρχεται βαθμιαία, ανάλογα με την σύσταση του κρασιού και τις συνθήκες αποθήκευσης.

Σε όξινο περιβάλλον, οι ανθοκυάνες δημιουργούν σύμπλοκα με μέταλλα. Στη φύση, υπεισέρχεται ο σίδηρος, το μαγνήσιο και ενδεχομένως το κάλιο. Στα κρασιά, το αδιάλυτο σύμπλοκο ανθοκυάνες-Fe⁺⁺⁺, προκαλεί το «μπλε θόλωμα» σιδήρου, το οποίο δεν οφείλεται όμως αποκλειστικά στις ανθοκυάνες, δεδομένου ότι την αντίδραση αυτή δίνουν και άλλες φλαβονοειδής φαινόλες, καθώς και οι ταννίνες, όπως έχει προαναφερθεί (Κουράκου - Δραγώνα 1998).

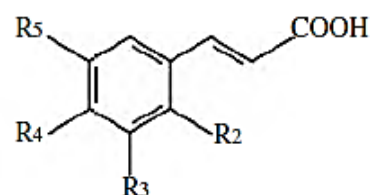
Οι αντιδράσεις των ανθοκυανών με τις ταννίνες, του αποχρωματισμού τους σε αναγωγικό περιβάλλον, του αποχρωματισμού τους από τον θειώδη ανυδρίτη, καθώς και του σχηματισμού των συμπλόκων με τον σίδηρο (μέταλλα), θα παρουσιαστούν λεπτομερέστερα στο κεφάλαιο 4.

3.3. Μη φλαβονοειδείς φαινόλες

Τα μη φλαβονοειδή συστατικά αποτελούνται από έναν C₆-C₃ σκελετό, και άρα είναι δομικά απλούστερα, αλλά η προέλευσή τους είναι πιο πολύπλοκη. Τα σταφύλια και το κρασί περιέχουν βενζοϊκά και κινναμωμικά οξέα (Εικόνα 17). Έχουν προσδιορισθεί επτά βενζοϊκά οξέα, από τα οποία τα δύο βρίσκονται σε ίχνη (σαλικυλικό και γεντισικό οξύ). Τα οξέα αυτά διαφοροποιούνται από την υποκατάσταση του βενζολικού δακτυλίου. Στα σταφύλια, βρίσκονται συνήθως ως γλυκοζίτες, απ' όπου απελευθερώνονται μέσω τη όξινης υδρόλυσης, και ως εστέρες (γαλλοτανίνες και ελλαγιταννίνες), απ' όπου απελευθερώνονται μέσω της αλκαλικής υδρόλυσης. Οι ελεύθερες μορφές τους επικρατούν κυρίως στα κόκκινα κρασιά, λόγω της υδρόλυσης αυτών των συνδυασμών και των αντιδράσεων θερμικής διάσπασης πιο πολύπλοκων μορίων, όπως οι ανθοκυάνες. Στα κρασιά που έχουν παλαιωθεί σε δρύινα βαρέλια, υπάρχουν υψηλά ποσοστά παραγώγων των βενζοϊκών οξέων, όπως το ελλαγικό οξύ. Το ελλαγικό οξύ προέρχεται από την υδρόλυση των ελλαγιταννινών (Εικόνα 18) (Jackson 2008, Ribèreau - Gayon et al. 2006).



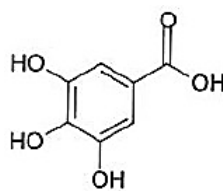
(1) Benzoic acids	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	H	H	OH	H
Protocatechic acid	H	OH	OH	H
Vanillic acid	H	OCH ₃	OH	H
Gallic acid	H	OH	OH	OH
Syringic acid	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Salicylic acid	OH	H	H	H
Gentisic acid	OH	H	H	OH



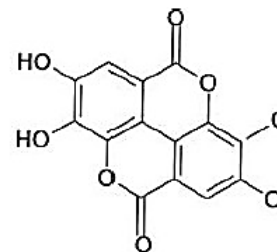
(2) Cinnamic acids
<i>p</i> -Coumaric acid
Caffeic acid
Ferulic acid
Sinapic acid

Εικόνα 17: Βενζοϊκά και κινναμωμικά οξέα στο κρασί

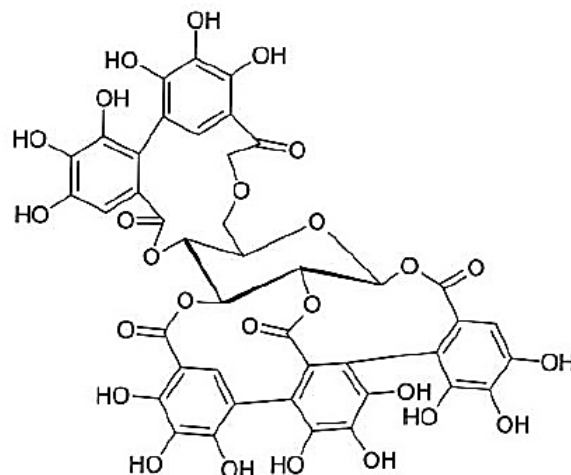
Διάφορα κινναμωμικά οξέα έχουν προσδιορισθεί στα σταφύλια και στο φρέσκο κρασί. Είναι κυρίως εστεροποιημένα, συνήθως με τρυγικό οξύ, αλλά και σε ένα πολύ μικρό ποσοστό σε ελεύθερη μορφή. Μπορούν, επίσης, να είναι και απλοί γλυκοζίτες της γλυκόζης. Οι εστέρες του τρυγικού οξέος, ειδικά με το καφεϊκό και το *π*-κουμαρικό οξύ (καφταρικό και κουταρικό οξύ, αντίστοιχα), είναι από τα συστατικά του γλεύκους που οξειδώνονται εύκολα, και είναι υπεύθυνα για το καφέτισμα των λευκών γλεύκων. Σε μικρά ποσοστά, τα οξειδωμένα παράγωγα του καφεϊκού και *π*-κουμαρικού οξέος, μπορούν να δώσουν τον κίτρινο-χρυσό χρωματισμό στα λευκά κρασιά. Παρά την ίδια περιεκτικότητα των οξειδωμένων μη φλαβονοειδών στα κόκκινα κρασιά, η αφθονία των ανθοκυανών και των προκυανιδινών υπερκαλύπτει το χρώμα τους. Τα κινναμωμικά οξέα ενώνονται με τις ανθοκυάνες, μέσω της εστεροποίησης του καφεϊκού και του *π*-κουμαρικού οξέος με τη γλυκόζη του γλυκοζίτη, όπως ήδη αναφέρθηκε στο υποκεφάλαιο 3.2..



Gallic acid



Ellagic acid



Example of an ellagitannin

Εικόνα 18: Γαλλικό οξύ, ελλαγικό οξύ και μία ελλαγιτανίνη

Τα φαινολικά οξέα είναι άχρωμα σε αλκοολικά διαλύματα, αλλά γίνονται κίτρινα λόγω της οξείδωσης. Από οργανοληπτική άποψη, τα συστατικά αυτά δεν έχουν κάποια ιδιαίτερη γεύση ή οσμή. Παρ' όλα αυτά, είναι πρόδρομες ενώσεις των πτητικών φαινολών που παράγονται από τη δράση συγκεκριμένων μικροοργανισμών, όπως ζύμες του γένους *Brettanomyces* και μερικών βακτηρίων. Όταν τα κρασιά παλαιώνουν σε καινούρια δρύινα βαρέλια, το ψήσιμο του βαρελιού κατά την κατασκευή του προκαλεί την διάσπαση της λιγνίνης και τον σχηματισμό διάφορων συστατικών με αρώματα που θυμίζουν καπνιστά, ψημένα και καμένα υλικά. Η αποικοδόμηση αυτή των λιγνινών των δρύινων βαρελιών, απελευθερώνει διάφορα πτητικά παράγωγα της κινναμαλδεΰδης και της βενζαλδεΰδης, όπως βανιλίνη, σιναπαλδεΰδη, κονιφεραλδεΰδη και συριναλδεΰδη. Επιπλέον, απελευθερώνονται μικρά ποσά μη φλαβονοειδών φαινολικών, των κουμαρινών. Αυτά τα μόρια είναι συστατικά του δρύινου ξύλου, είτε στην γλυκοζυλιωμένη μορφή (εσκουλίνη και σκοπολίνη) στο πράσινο ξύλο, είτε στην μορφή αγλυκόνης (εσκουλετίνη και σκοπολετίνη) στο φυσικά ωριμασμένο ξύλο. Παρ' ότι ένα πολύ μικρό ποσό (μερικά mg/L) κουμαρινών βρίσκονται στο παλαιωμένο σε δρύινο βαρέλι κρασί, επηρεάζουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, καθώς οι γλυκοζίτες είναι πιο πικροί και οι αγλυκόνες πιο όξινες, με όριο ανίχνευσης στα κόκκινα κρασιά τα 3 μg/L. Η αργή μετατροπή της εσκουλίνης στην λιγότερο

πικρή εσκουλετίνη κατά τη διάρκεια της παλαίωσης, θεωρείται ότι είναι εν μέρει υπεύθυνη για την μείωση της πικρότητας των κρασιών που παλαιώνουν σε δρύινα βαρέλια.

Ο μεταβολισμός των ζυμών μπορεί να παράγει επιπλέον μη φλαβονοειδή φαινολικά. Η επικρατέστερη ένωση είναι η τυροσόλη. Η τυροσόλη περιέχεται και στα κόκκινα και στα λευκά κρασιά σε περιεκτικότητες της τάξης των 20-30 mg/L, και σχηματίζεται κατά τη ζύμωση από την τυροσίνη, η οποία με τη σειρά της σχηματίζεται από τις ζύμες. Το συστατικό αυτό, του οποίου η συγκέντρωση παραμένει σχετικά σταθερή κατά τη παλαίωση, συνοδεύεται από άλλες μη φαινολικές αλκοόλες όπως η τρυπτοφόλη (0-1 mg/L) και η φαινυλαιθυλική αλκοόλη (10-75 mg/L) (Jackson 2008, Ribèreau - Gayon et al. 2006).

Μία άλλη οικογένεια από πιο περίπλοκες πολυφαινόλες που βρίσκονται στα κρασιά, στα σταφύλια και το δρύινο ξύλο είναι τα στυλβένια. Έχουν δύο βενζολικούς δακτυλίους, συνδεδεμένους με ένα αιθάνιο, ή μπορεί και αιθυλένιο. Μία αντιπροσωπευτική ένωση αυτής της οικογένειας, είναι η ρεσβερατρόλη, η οποία πιστεύεται ότι παράγεται στους αμπελώνες από μία μυκητισιακή μόλυνση. Βρίσκεται στους φλοιούς, εκχυλίζεται κατά την ζύμωση των κόκκινων κρασιών, και φαίνεται ότι έχει θεραπευτικές ιδιότητες. Η περιεκτικότητά της είναι της τάξης των 1- 3 mg/L (Ribèreau - Gayon et al. 2006).

3.4. Η θέση των φαινολικών στο σταφύλι

Στα σταφύλια, τα φλαβονοειδή συντίθενται πρωταρχικά στους φλοιούς και στα γίγαρτα. Παράγονται, επίσης, αλλά σε μικρότερες ποσότητες στους βοστρύχους. Οι φλαβονόλες και οι ανθοκυάνες βρίσκονται κυρίως στους φλοιούς, ενώ οι φλαβαν-3-όλες και τα πολυμερή τους (προκυανιδίνες) σχηματίζονται κυρίως στα γίγαρτα και στους βοστρύχους (περίπου 60 και 20% αντίστοιχα), και λιγότερο στους φλοιούς (15-20%). Οι ταννίνες των σταφυλιών βρίσκονται στα γίγαρτα (έως 65%), στους βοστρύχους (έως 22%), στους φλοιούς (έως 12%) και στη σάρκα (έως 1%). Οι ταννίνες των γιγάρτων είναι λιγότερο πολυμερισμένες από αυτές των φλοιών, με τις ταννίνες των γιγάρτων να περιέχουν πάνω από 28 μονάδες φλαβανολών, ενώ αυτές των φλοιών πάνω από 74. Κάποιες ποικιλίες, όπως το Pinot noir, δεν περιέχουν συμπυκνωμένες ταννίνες στους φλοιούς. Αυτό δικαιολογεί το «φτωχό» χρώμα των κρασιών αυτής της ποικιλίας, καθώς και το γεγονός ότι συχνά η οινοποίησή του συμπεριλαμβάνει και τους βοστρύχους. Κατά τη ζύμωση, οι ταννίνες των φλοιών εκχυλίζονται πρώτα από αυτές των γιγάρτων, αλλά αυτό μεταβάλλεται κατά την διάρκεια της ζύμωσης (Jackson 2008).

Οι ανθοκυάνες βρίσκονται στα χυμοτόπια των κυττάρων του φλοιού. Καθώς τα σταφύλια ωριμάζουν, καταλαμβάνουν όλο και μεγαλύτερο χώρο, προκαλώντας ζημιά στο κυτόπλασμα. Η συγκέντρωσή τους ακολουθεί θετική διαβάθμιση, από το εξωτερικό μέχρι το εσωτερικό μέρος των σταφυλιών. Τα κύτταρα που βρίσκονται κοντά στη σάρκα είναι περισσότερο χρωματισμένα σε σχέση με αυτά που είναι κοντά στην επιδερμίδα. Στα σταφύλια υπάρχει αντίθεση μεταξύ των ταννινών των γιγάρτων και των φλοιών. Στα γίγαρτα οι ταννίνες είναι τοποθετημένες στο εξωτερικό και το εσωτερικό τμήμα που προστατεύει το έμβρυο. Μπορούν να ελευθερωθούν στο εξωτερικό περιβάλλον μόνο σε περίπτωση διαλυτοποίησης του δερματίου (Συμεού 2010).

Στους φλοιούς των σταφυλιών έχουν ταυτοποιηθεί τρία είδη ταννινών. Το πρώτο είναι οι ταννίνες που βρίσκονται στα χυμοτόπια, σχηματίζοντας πυκνές δέσμες στα κύτταρα που είναι κοντά στην επιδερμίδα, ενώ διαχέονται αραιά στα εσωτερικά κύτταρα του μεσοκαρπίου. Η διαβάθμιση της συγκέντρωσης είναι αντίστροφη, αφού τα κύτταρα του εξωτερικού μέρους περιέχουν τις περισσότερες ταννίνες. Η δεύτερη ομάδα ταννινών είναι αυτές που βρίσκονται δεμένες με ισχυρούς δεσμούς στην πρωτεοφωσφολιπιδική μεμβράνη (τονοπλάστης), ενώ η τελευταία κατηγορία αφορά στις ταννίνες που είναι ενσωματωμένες στο τοίχωμα κυτταρίνης-πηκτίνης. Η κατανομή αυτών των μορίων είναι απόλυτα ακόλουθη με τις αντιμυκητιακές τους ιδιότητες, καθώς σταματούν την μυκηλιακή ανάπτυξη των μυκήτων που στερούνται λακκάσης, που είναι το μοναδικό ένζυμο που έχει την ικανότητα να τα καταστρέψει χωρίς να απενεργοποιηθεί. Ο φλοιός επίσης περιέχει φαινολικά οξέα και φλαβανόλες στα χυμοτόπια των κυττάρων, ενώ τα φαινολικά οξέα είναι τα μοναδικά φαινολικά συστατικά της σάρκας (Συμεού 2010, Ribèreau - Gayon et al. 2006). Η εκχύλιση των φαινολικών συστατικών αναπτύσσεται λεπτομερώς παρακάτω.

3.5. Εκχύλιση πολυφαινολών

Η μεταφορά των συστατικών του φλοιού, κυρίως των φαινολικών, στο ζυμούμενο γλεύκος εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, η συνισταμένη των οποίων αποτελεί την κινητική της εκχύλισης. Τα φαινόμενα είναι πολύπλοκα και δεν οδηγούν πάντα σε αύξηση των ουσιών που εκχυλίζονται. Στο παραγόμενο κρασί δεν βρίσκεται παρά ένα μικρό ποσοστό (<50%) των φαινολικών συστατικών του σταφυλιού (Συμεού 2010).

Η εκχύλιση των συστατικών ξεκινά μετά την έκθλιψη των σταφυλιών και συνεχίζεται μέχρι τον διαχωρισμό των στεμφύλων από το γλεύκος. Ο ρυθμός της εκχύλισης εξαρτάται από την διαλυτότητα των συστατικών και τη θέση τους στη ράγα του σταφυλιού. Περαιτέρω, εξαρτάται από άλλους παράγοντες όπως η συγκέντρωση της αιθανόλης και του θειώδη ανυδρίτη, η θερμοκρασία και ο βαθμός ομογενοποίησης του γλεύκους (Cheynier 2006).

Κατά την αλκοολική ζύμωση παρουσία των στερεών μερών του σταφυλιού, το χρώμα του ζυμούμενου γλεύκους αυξάνεται, λόγω της σταδιακής εκχύλισης των ανθοκυανών από τα χυμοτόπια των κυττάρων των φλοιών. Έτσι το χρώμα είναι δείκτης της πορείας εκχύλισης και αποτελεί το ορατό αποτέλεσμα μιας σειράς φαινομένων που συνεπάγονται τον εμπλουτισμό του γλεύκους με πολλά συστατικά των φλοιών και των γιγάρτων, μεταξύ των οποίων είναι οι ανθοκυάνες και τα υπόλοιπα φαινολικά παράγωγα (Συμεού 2010).

3.5.1. Σειρά εκχύλισης πολυφαινολών

Το ολικό φαινολικό φορτίο στα κρασιά αυξάνεται κατά τα πρώτα στάδια της ζύμωσης των ερυθρών ποικιλιών. Τα παράγωγα των υδροξυκιναμωμικών και υδροξυβενζοϊκών οξέων είναι τα πρώτα που εκχυλίζονται, σχεδόν ταυτόχρονα με τις φλαβονόλες και τις ανθοκυάνες του κρασιού. Οι ανθοκυάνες είναι ευδιάλυτες και σε υδατικά διαλύματα, βρίσκονται αποκλειστικά στα χυμοτόπια των κυττάρων των φλοιών, στις τρεις με τέσσερις εξωτερικές σειρές κυττάρων, από

όπου διαχέονται εύκολα στο γλεύκος, αμέσως μόλις υποστούν πλασμόλυση τα κύτταρα. Ιδιαίτερη σημασία επίσης έχει και η κατάσταση των ίδιων των ανθοκυανών. Οι ελεύθερες ανθοκυάνες εκχυλίζονται πιο γρήγορα όταν δεν είναι ακυλιωμένες, ενώ οι συμπυκνωμένες εκχυλίζονται πολύ αργά ή και καθόλου, γι' αυτό ο υψηλός βαθμός συμπύκνωσής τους στα σταφύλια εκτιμάται ως αρνητικός παράγοντας κατά τις ερυθρές οινοποιήσεις (Κουράκου - Δραγώνα 1998, Jackson 2008, Συμεού 2010). Οι διαφορετικές δομές των ανθοκυανών έχουν διαφορετική διάχυση στο γλεύκος στα πρώτα στάδια της εκχύλισης. Έχει επιβεβαιωθεί η μείωση των ποσοστών της κυανιδίνης και της παιονιδίνης κατά τις πρώτες μέρες, και η επακόλουθη αύξηση της μαλβιδίνης, της πετουνιδίνης και της δελφινιδίνης. Η συγκέντρωση των ανθοκυανών στο γλεύκος αυξάνεται γρήγορα λόγω της διάχυσης των γλυκοζιτών της μαλβιδίνης και των μη ακυλιωμένων γλυκοζιτών. Παρόλα αυτά, τα σχετικά ποσοστά των μη ακυλιωμένων μορφών μειώνονται κατά τη διάρκεια των πρώτων ημερών της εκχύλισης, και αυτά των ακετυλιωμένων και των κουμαρυλιωμένων γλυκοζιτών αυξάνονται (González-Neves et al. 2007, Puértolas et al. 2011). Έχει παρατηρηθεί ότι οι μονογλυκοζίτες των ανθοκυανών επικρατούν σε εκχυλίσεις που πραγματοποιούνται σε χαμηλές θερμοκρασίες (Busse-Valverde et al. 2011).

Τα τελευταία που εκχυλίζονται είναι οι φλαβαν-3-όλες (κατεχίνες) και τα πολυμερή τους (προκυανιδίνες και συμπυκνωμένες ταννίνες). Αυτές οι ουσίες βρίσκονται κυρίως στα γιγάρτα και λιγότερο στους φλοιούς και στους βοστρύχους και η εκχύλισή τους διευκολύνεται από την παραγόμενη αιθανόλη. Η παρουσία της αιθανόλης, μαζί με το διοξείδιο του άνθρακα και τη θερμότητα που παράγονται κατά την αλκοολική ζύμωση, προκαλούν τη διάρρηξη των κυτταρικών τοιχωμάτων και των κυτταρικών μεμβρανών, ενισχύοντας την εκχύλιση αυτών των συστατικών (Romero-Cascales et al. 2012). Οι προκυανιδίνες των φλοιών παραλαμβάνονται σχετικά γρήγορα, λόγω της θέσης τους και λόγω της υψηλότερης διαλυτότητας στο νερό των προδελφινιδινών σε σχέση με τις γαλλοπροκυανιδίνες. Οι προκυανιδίνες των γιγάρτων διαχέονται με μικρότερο ρυθμό, ανάλογα με το στάδιο ωριμότητας των γιγάρτων και παρουσιάζουν μία υστέρηση, καθώς η εκχύλισή τους ξεκινά όταν αυξάνεται η περιεκτικότητα της αιθανόλης στο ζυμούμενο γλεύκος (Cheynier 2006, Jackson 2008, Συμεού 2010, Puértolas et al. 2011).

Η εκχύλιση των φαινολικών συστατικών εξαρτάται από το χρόνο, και αυξάνεται ανάλογα με τη διάρκεια της επαφής των στεμφύλων με το γλεύκος. Η περιεκτικότητα του κρασιού σε φαινολικά μειώνεται, καθώς αυτά οξειδώνονται, πολυμερίζονται και καταβυθίζονται με τις πρωτεΐνες και τα υπολείμματα των κυττάρων. Κατά τη διάρκεια της διαύγασης και της ωρίμανσης, η περιεκτικότητα σε φαινολικά συνεχίζει να μειώνεται. Η παλαίωση σε ξύλινο βαρέλι, επιφέρει μία προσωρινή αύξηση του φαινολικού φορτίου (Jackson 2008, Συμεού 2010).

3.5.2. Παράγοντες που επηρεάζουν την εκχύλιση

Ο βαθμός της εκχύλισης των φαινολικών κατά την οινοποίηση εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Η εκχύλιση τελικά περιορίζεται από το ποσό των φαινολικών που υπάρχουν στο σταφύλι, που διαφέρει από ποικιλία σε ποικιλία, ανάλογα με τις κλιματικές συνθήκες και την ωριμότητα. Η εκχύλιση των φαινολικών επηρεάζεται, επίσης, από τη διάρκεια παραμονής του

ζυμούμενου γλεύκους με τα στέμφυλα, τον τρόπο διαβροχής των στεμφύλων από το γλεύκος, τη θερμοκρασία, την παραγόμενη αιθανόλη, τον θειώδη ανυδρίτη κ.α.. Επομένως, δεν είναι εφικτό να προβλεφθεί το φαινολικό φορτίο του κρασιού από την περιεκτικότητα των σταφυλιών. Επιπλέον, υπάρχουν μεγαλύτερες ποσοτικές και ποιοτικές διαφορές στη συγκέντρωση και στη δομή των φαινολικών, κατά την παλαίωση, από όλα τα άλλα συστατικά του κρασιού (Jackson 2008, Κουράκου - Δραγώνα 1998).

3.5.2.1. Διάρκεια παραμονής του γλεύκους με τα στέμφυλα

Η εκχύλιση των φαινολικών συστατικών στο ζυμούμενο γλεύκος εξαρτάται από το χρόνο επαφής των στεμφύλων με το γλεύκος, χωρίς η σχέση να είναι γραμμική. Είναι γνωστό πως η ένταση του χρώματος περνά από ένα μέγιστο και στη συνέχεια μειώνεται, ενώ τα φαινολικά συστατικά αυξάνονται συνεχώς, με έντονο ρυθμό τις πρώτες μέρες και πιο αργά στη συνέχεια.

Κατά την 5^η έως 8^η ημέρα της επαφής των στεμφύλων με το γλεύκος, η ένταση του χρώματος βρίσκεται σε ένα μέγιστο και οι ταννίνες είναι σχετικά λίγες, επιτρέποντας στις φρουτώδεις γεύσεις να αναδειχθούν. Έτσι, η χρονική διάρκεια παραμονής του γλεύκους με τα στέμφυλα σχετίζεται με τον τύπο του κρασιού που θα παραχθεί. Συγκεκριμένα, στα κρασιά πρώιμης κατανάλωσης, το χρώμα των οποίων οφείλεται κυρίως στις ανθοκυάνες, η παραμονή είναι μικρής διάρκειας. Αντίθετα, στα κρασιά παλαίωσης, όπου οι ταννίνες παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση του χρώματος, η επαφή των στεμφύλων με το γλεύκος είναι μακράς διάρκειας. Η διάρκεια παραμονής του γλεύκους με τα στέμφυλα επηρεάζει και τη γευστική ισορροπία των κρασιών, γιατί καθώς αυξάνεται, ενισχύεται το σώμα των κρασιών, αλλά και η ένταση του αρώματός του, αφού οι ταννοειδείς ουσίες ενισχύουν το άρωμα, αλλά καλύπτουν τη φρουτώδη γεύση του (Συμεού 2010).

3.5.2.2. Διαβροχή των στεμφύλων με το γλεύκος

Όπως είναι γνωστό, όταν αρχίσει η αλκοολική ζύμωση, το διοξείδιο του άνθρακα που εκλύεται κατά τη διάσπαση των σακχάρων, ωθεί με μεγάλη πίεση τα στέμφυλα, στις δεξαμενές ερυθρής οινοποίησης, προς τα επάνω, δημιουργώντας έτσι μια αρκετά συμπαγή στερεά φάση (καπέλο), διαχωρισμένη από το μεγάλο όγκο της υγρής φάσης, με αποτέλεσμα την ατελή εκχύλιση των συστατικών των φλοιών στο χυμό και τη δημιουργία άλλων προβλημάτων στη διεξαγωγή της οινοποίησης. Για το λόγο αυτό, είναι απαραίτητη η διαβροχή των στεμφύλων με το γλεύκος (ανακύκλωση) με την κατάλληλη συχνότητα, ώστε να εξασφαλιστεί η ομαλότητα της εκχύλισης των συστατικών των φλοιών και η ομογενοποίηση του γλεύκους (Κουράκου - Δραγώνα 1998).

Αυξάνοντας τον αριθμό των ανακυκλώσεων αυξάνεται και η εκχύλιση των φαινολικών συστατικών. Οι πρώτες ανακυκλώσεις ευνοούν την εκχύλιση των ταννινών και λοιπών φαινολικών συστατικών των φλοιών (οινοποίηση για παραγωγή πρώιμων κρασιών), ενώ προς το τέλος της ζύμωσης ευνοούν την εκχύλιση των ταννινών των γιγάρτων (οινοποίηση για παραγωγή κρασιών παλαίωσης). Σε ορισμένες περιπτώσεις προτιμάται, αντί για την ανακύκλωση, η

εμβάπτιση των στεμφύλων στο ζυμούμενο γλεύκος. Η τεχνική αυτή ευνοεί την εκχύλιση των ταννινών των γιγάρτων και εμπλουτίζει την ταννική δομή του κρασιού (Συμεού 2010).

3.5.2.3. Θερμοκρασία

Μεγάλη σημασία για την εκχύλιση έχει και η θερμοκρασία της οινοποίησης. Η αύξηση της θερμοκρασίας νεκρώνει τα κύτταρα των φλοιών και κάνει πιο έντονη τη διάλυση των συστατικών τους στο γλεύκος. Η θερμοκρασία πρέπει να είναι αρκετά υψηλή για την ικανοποιητική εκχύλιση του συνόλου των φαινολικών συστατικών των φλοιών και των ραγών. Όπως προκύπτει από διάφορες έρευνες, όταν η ερυθρή οινοποίηση διεξάγεται σε θερμοκρασία 30-35 °C, το κρασί που παράγεται έχει σημαντικά περισσότερες ολικές φαινόλες και ανθοκυάνες και πολύ μεγαλύτερη ένταση χρώματος, από το κρασί που παράγεται στους 20-25 °C. Επιπλέον, η υψηλή θερμοκρασία έχει σαν συνέπεια τη διευκόλυνση της απελευθέρωσης των μαννοπρωτεϊνών των ζυμών. Οι ενώσεις αυτές συμβάλλουν στην παραγωγή μαλακών κρασιών που χαρακτηρίζονται από στρογγυλότητα (Συμεού 2010, Ribéreau-Gayon et al. 2006).

Συνεπώς, το στάδιο της ζύμωσης με ταυτόχρονη εκχύλιση πρέπει να διεξάγεται σε θερμοκρασία τέτοια που να ευνοείται η εκχύλιση, χωρίς να επιβραδύνεται η δράση των ζυμών και ούτε να μειώνεται η αρωματική ένταση. Τέτοιες τιμές θερμοκρασίας για την ερυθρή οινοποίηση κυμαίνονται από 25 έως 35 °C. Για τα κρασιά πρώιμης κατανάλωσης που χαρακτηρίζονται από έντονο κόκκινο χρώμα και φρουτώδη χαρακτήρα, συνιστάται μέτρια θερμοκρασία ζύμωσης (25 °C), ενώ αντίθετα για τα κρασιά παλαιώσης, που το χαρακτηριστικό τους είναι η πλούσια ταννική δομή, μια θερμοκρασία ζύμωσης 30 °C είναι απαραίτητη. Ακόμα υψηλότερες θερμοκρασίες, πιθανώς, θα μπορούσαν να ευνοήσουν την πληρέστερη εκχύλιση των φαινολικών συστατικών, αλλά υπάρχει κίνδυνος να δημιουργηθούν προβλήματα στη δραστηριότητα των ζυμών (Συμεού 2010).

3.5.2.4. Αιθανόλη

Η αιθανόλη επηρεάζει καθοριστικά την εκχύλιση των ανθοκυανών και των φαινολικών παραγώγων, αλλά και των αρωματικών και πρόδρομων αρωματικών ενώσεων. Η ένταση του χρώματος αυξάνεται πολύ γρήγορα στα πρώτα στάδια της ζύμωσης (2-3 ημέρες μετά την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης), αφού οι ανθοκυάνες είναι υδατοδιαλυτές, και στη συνέχεια παρουσιάζεται μια ελάττωση, λιγότερο ή περισσότερο απότομη (Mazza et al. 1999, Puértolas et al. 2011). Η ελάττωση αυτή συμβαίνει όταν η αιθανόλη φτάσει σε ορισμένα επίπεδα. Τότε η εκχύλιση των ανθοκυανών έχει σχεδόν ολοκληρωθεί και αρχίζουν να ενεργοποιούνται διάφοροι μηχανισμοί οι οποίοι έχουν σαν αποτέλεσμα τη μείωση της συγκέντρωσής τους. Πρόκειται για την προσρόφιση των ανθοκυανών από τους φλοιούς των ραγών και τα κύτταρα των ζυμών, αλλά και την καταστροφή των έγχρωμων ενώσεων ταννινών - ανθοκυανών από τη σχηματιζόμενη αιθανόλη (Cheynier 2006, Puértolas et al. 2011).

Οι ολικές φαινόλες στην αρχή αυξάνονται όπως οι ανθοκυάνες, αλλά και στη συνέχεια εξακολουθούν να εκχυλίζονται, σε όλη τη διάρκεια παραμονής των στεμφύλων. Έχει αποδειχθεί

ότι η αύξηση της περιεκτικότητας της αιθανόλης κατά την εξέλιξη της αλκοολικής ζύμωσης συντελεί στην καλύτερη εκχύλιση των προκυανιδινών (Cheynier 2006). Από τη στιγμή που τα γιγάρτα προστατεύονται από ένα λιπιδικό στρώμα, η παρουσία της αιθανόλης είναι απαραίτητη για την υποβάθμισή του και γι' αυτό οι ταννίνες των γιγάρτων είναι αυτές που εκχυλίζονται τελευταίες (Bautista - Ortín et al. 2007, Κουράκου - Δραγώνα 1998, Ribéreau-Gayon et al. 2006, Συμεού 2010).

3.5.2.5. Θειώδης ανυδρίτης

Ο θειώδης ανυδρίτης διευκολύνει την εκχύλιση των διάφορων φαινολικών παραγώγων των στερεών συστατικών του σταφυλοπολλτού στο ζυμούμενο γλεύκος, με συνέπεια την παραγωγή κρασιών με πιο έντονο χρώμα και μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ολικές φαινόλες. Στην ερυθρή οινοποίηση είναι γεγονός πως η προσθήκη θειώδη ανυδρίτη στον σταφυλοπολλτό ευνοεί τη διάχυση των ανόργανων συστατικών, των οργανικών οξέων και κυρίως των φαινολικών συστατικών των φλοιών. Η δράση αυτή του θειώδη ανυδρίτη οφείλεται στην καταστροφή των κυττάρων των φλοιών, τα οποία απελευθερώνουν έτσι πιο εύκολα τα συστατικά τους. Στην περίπτωση των σάπιων σταφυλιών ο θειώδης ανυδρίτης δρα βελτιώνοντας των εκχύλιση των χρωστικών, αλλά και παρεμποδίζοντας την καταστροφή τους από τη λακκάση του *Botrytis cinerea* (Συμεού 2010).

3.5.2.6. Λοιποί παράγοντες

Ακόμα και στην περίπτωση που η οινοποίηση διεξαχθεί υπό τις ίδιες ακριβώς συνθήκες, το ποσό των ανθοκυανών που διαχέονται στο γλεύκος δεν είναι το ίδιο. Κάθε ράγα έχει τη δική της ικανότητα να κατακρατάει τις ανθοκυάνες, η οποία εξαρτάται από τη μεμβράνη των κυττάρων του φλοιού. Αυτή η ικανότητα είναι αντίστροφη του συντελεστή εκχύλισης, ο οποίος υπολογίζεται από το πηλίκο της περιεκτικότητας του κρασιού σε ανθοκυάνες προς την αντίστοιχη των ραγών, επί τις εκατό. Ο συντελεστής αυτός μπορεί να παρουσιάσει μεγάλη διακύμανση από το ένα έτος στο άλλο, ενώ δεν εξαρτάται ούτε από το μέγεθος των ραγών, ούτε από τον αλκοολικό τίτλο. Η κατάσταση του φλοιού είναι ο κύριος παράγοντας που επηρεάζει το συντελεστή εκχύλισης, ο οποίος αυξάνεται όταν το σταφύλι είναι φτωχότερο σε ανθοκυάνες.

Όταν οι ερυθρές ποικιλίες έχουν μικρές ράγες, η αναλογία του φλοιού επί του βάρους του γλεύκους (σχέση υγρής/στερεής φάσης) είναι μεγάλη, οπότε ο εμπλουτισμός του ζυμούμενου γλεύκους με χρωστικές ουσίες και αρωματικά συστατικά του φλοιού είναι έντονος. Δηλαδή η ένταση του χρώματος του κρασιού και η περιεκτικότητά του σε ανθοκυάνες και ολικές φαινόλες είναι αντιστρόφως ανάλογες με την απόδοση των σταφυλιών σε χυμό (Κουράκου - Δραγώνα 1998).

4. Το χρώμα στα λευκά και κόκκινα κρασιά

4.1. Το χρώμα στα λευκά κρασιά

Σε αντίθεση με τα κόκκινα κρασιά, σχετικά λίγα είναι γνωστά για την ανάπτυξη και τη χημική φύση του χρώματος των λευκών κρασιών. Στα ξηρά λευκά κρασιά η συνολική περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά κυμαίνεται από 50 μέχρι 250 mg/L, δηλαδή λιγότερο από το 10% της αντίστοιχης τιμής των κόκκινων κρασιών. Οι τιμές αυτές είναι ακόμα μικρότερες όταν πρόκειται για γλυκά λευκά κρασιά που έχουν παραχθεί από ευγενή σήψη, ενώ στην περίπτωση των γλυκών λευκών κρασιών από σταφύλια που συμπυκνώθηκαν με ξήρανση, το ποσό των φαινολικών συστατικών πλησιάζει αυτό των κόκκινων κρασιών. Τα λευκά γλεύκη και τα κρασιά περιέχουν βενζοϊκά και κινναμωμικά οξέα, κατεχίνες, προκυανιδίνες, και φλαβονόλες. Έχουν, επίσης, βρεθεί και σύμπλοκα πρωτεϊνών - ταννινών, τα οποία συνεισφέρουν στο φαινολικό φορτίο των λευκών κρασιών. Αυτός είναι και ένας λόγος για την υψηλή τιμή των λευκών κρασιών που προκύπτει από τη μέθοδο Folin-Ciocalteu (υποκεφάλαιο 5.3.1.1.) Από το χαμηλό ποσοστό των φαινολικών συστατικών που βρίσκονται στα λευκά κρασιά, το μεγαλύτερο το κατέχουν τα άμεσα διαλυτά μη φλαβονοειδή (υδροξυκινναμωμικά), όπως το καφταρικό οξύ και τα σχετικά παράγωγα, π-κουμαρικό οξύ και φερουλικό οξύ (Jackson 2008, Ribèreau - Gayon et al. 2006).

Το ιδιαίτερα έντονο κίτρινο χρώμα των γλυκών λευκών κρασιών είναι διαφορετικό από αυτό των ξηρών, ακόμα και όταν είναι οξειδωμένα. Η απορρόφηση είναι συνεχόμενη, με μέγιστο στα 270 nm. Η συμπύκνωση λόγω της εξάτμισης του νερού από τα σταφύλια που έχουν υποστεί ευγενή σήψη, και τα συστατικά που παράγονται από τη δράση των οξειδασών, είναι υπεύθυνα για την υψηλή απορρόφηση της υπεριώδους ακτινοβολίας. Το χρώμα των λευκών κρασιών συνεπώς σχετίζεται με την οξείδωση των φαινολικών συστατικών. Είναι αξιοσημείωτο πως οι συνέπειες από την ενζυμική και τη χημική οξείδωση δεν είναι οι ίδιες. Η χημική οξείδωση ενός διαλύματος κατεχινών παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στα 400 nm και έχει περισσότερο έντονο κίτρινο χρώμα σε σχέση με διαλύματα στα οποία η οξείδωση έχει καταλυθεί από τη λακκάση (Ribèreau-Gayon et al. 2006).

Η χρήση πηκτινολυτικών ενζύμων, κατά την οινοποίηση, ενισχύει την υδρόλυση του καφταρικού οξέος στα συστατικά του, καφεϊκό και τρυγικό οξύ. Μετά την έκθλιψη των σταφυλιών, το καφταρικό οξύ και οι σχετικές *ορθο*-διφαινόλες οξειδώνονται άμεσα υπό τη παρουσία της πολυφαινολοξειδάσης των σταφυλιών και του οξυγόνου. Αυτά τα συστατικά, καθώς και τα οξειδωμένα τους προϊόντα, μπορούν να αντιδράσουν με το τριπεπτίδιο της γλουταθειόνης για να σχηματίσουν άχρωμα S-γλουταθειονυλικά σύμπλοκα. Αυτά τα σύμπλοκα, ενώνονται με άλλα συστατικά και καθιζάνουν. Παρά την περεταιίρω οξείδωσή τους, π.χ. από την λακκάση που προέρχεται από τα σταφύλια που έχουν υποστεί σήψη, τα άχρωμα σύμπλοκα γλουταθειόνης-υδροξυκινναμωμικού οξέος, συνήθως δεν πολυμερίζονται και δεν σχηματίζουν καστανές έγχρωμες ενώσεις. Συνεπώς, η προστασία του γλεύκους από το οξυγόνο, κατά την έκθλιψη, ή η προσθήκη θειώδη ανυδρίτη για την αδρανοποίηση των πολυφαινολοξειδασών, είναι κακές μέθοδοι. Οι μέθοδοι αυτοί εμποδίζουν το σχηματισμό συμπλόκων γλουταθειόνης-

υδροξυκινναμωμικού οξέος, και συμβάλλουν στο επακόλουθο καφέτισμα του κρασιού. Το περιεχόμενο σε γλουταθειόνη των σταφυλιών αυξάνεται σημαντικά κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης. Ποικιλίες με υψηλή περιεκτικότητα σε υδροξυκινναμωμικό οξύ, αλλά χαμηλή σε γλουταθειόνη, παρουσιάζουν αυξημένες πιθανότητες για καφέτισμα του κρασιού τους (Jackson 2008).

Η τυροσόλη (π-υδροξυφαινυλαιθυλαλκοόλη) είναι η κύρια φαινολική ουσία που απαντάται σε διάφορα είδη λευκών κρασιών. Παράγεται από την τυροσίνη, με τη δράση των ζυμών και απαντάται σε συγκεντρώσεις από 6 έως 25 mg/L. Σε περίπτωση προσβολής από τον *Botrytis cinerea*, τα περισσότερα φαινολικά συστατικά με προέλευση τους φλοιούς, εκτός από την τυροσόλη, καταστρέφονται, όχι όμως και αυτά που προέρχονται από τα γίγαρτα (Ribèreau - Gayon et al. 2006).

Επειδή οι φλαβονόλες και οι άλλες φλαβονοειδείς φαινόλες εκχυλίζονται σχετικά αργά, βρίσκονται σε σημαντικές συγκεντρώσεις μόνο στα γλεύκη που έχουν παραμείνει κάποιο διάστημα σε επαφή με τα στέμφυλα. Θεωρείται ότι το μεγαλύτερο μέρος του κιτρινωπού χρωματισμού των φρέσκων λευκών κρασιών, προέρχεται από την περιορισμένη εκχύλιση και την οξείδωση των φλαβονολών, όπως η κερκετίνη και η καιμπερόλη (Jackson 2008).

Οι φλαβανόλες που περιέχονται στα λευκά κρασιά είναι κυρίως κατεχίνες και πολυμερή γαλλοκατεχινών. Το επακόλουθο οξειδωτικό καφέτισμα των λευκών κρασιών σχετίζεται με το φλαβονοειδές, και όχι το μη φλαβονοειδές φορτίο. Ένας μέρος του καφετίσματος μπορεί να οφείλεται στον σχηματισμό έγχρωμων ξανθυλιοκατιόντων, από κατεχίνες και γλυοξυλικό οξύ (μέσω της οξείδωσης του τρυγικού οξέος). Οι ταννίνες από τον πολυμερισμό των προκυανιδινών είναι, επίσης, κίτρινες και το χρώμα τους ποικίλει ανάλογα με το επίπεδο της οξείδωσης. Η οξείδωση των ξηρών λευκών κρασιών οδηγεί στο καφέτισμα, εξαιτίας των τροποποιήσεων των ταννινών και των ιδιαίτερα ευοξειδωτών παραγώγων του καφταρικού οξέος, καθώς και του ίδιου. Τα υπόλοιπα συστατικά είναι σχετικά ανεπηρέαστα από την οξείδωση. Μέσα σε ένα χρόνο, η μείωση στη συγκέντρωση των κατεχινών των λευκών κρασιών μπορεί να φτάσει το 35 με 50% (Jackson 2008, Συμεού 2010, Ribèreau - Gayon et al. 2006).

Τα μη φλαβονοειδή και οι λιγνίνες που εκχυλίζονται από τα δρύινα βαρέλια κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του κρασιού, συνεισφέρουν στο χρώμα των λευκών κρασιών. Για παράδειγμα, κατά την οξείδωση, το καφεϊκό οξύ μπορεί να πολυμεριστεί, σχηματίζοντας διμερή και τριμερή. Το χρυσοκίτρινο χρώμα των παλαιών λευκών κρασιών, ίσως προέρχεται από την οξείδωση τέτοιων φαινολικών και πιθανώς γαλακτουρονικού οξέος. Αυτές οι ουσίες είναι γνωστό ότι ενισχύουν την απορρόφηση στο ορατό φάσμα (380-450 nm). Οι χρυσωπές χροιές των γλυκών λευκών κρασιών οφείλονται στο σχηματισμό μελανοειδών συστατικών από τις αντιδράσεις Maillard, ή την καραμελοποίηση των σακχάρων. Αυτές οι δύο σειρές αντιδράσεων συμβάλλουν, επίσης, στον καστανωπό χρωματισμό των κρασιών που έχουν εκτεθεί σε θέρμανση, όπως είναι η Μαδέρα και το Vin santo (Jackson 2008).

4.2. Το χρώμα στα κόκκινα κρασιά

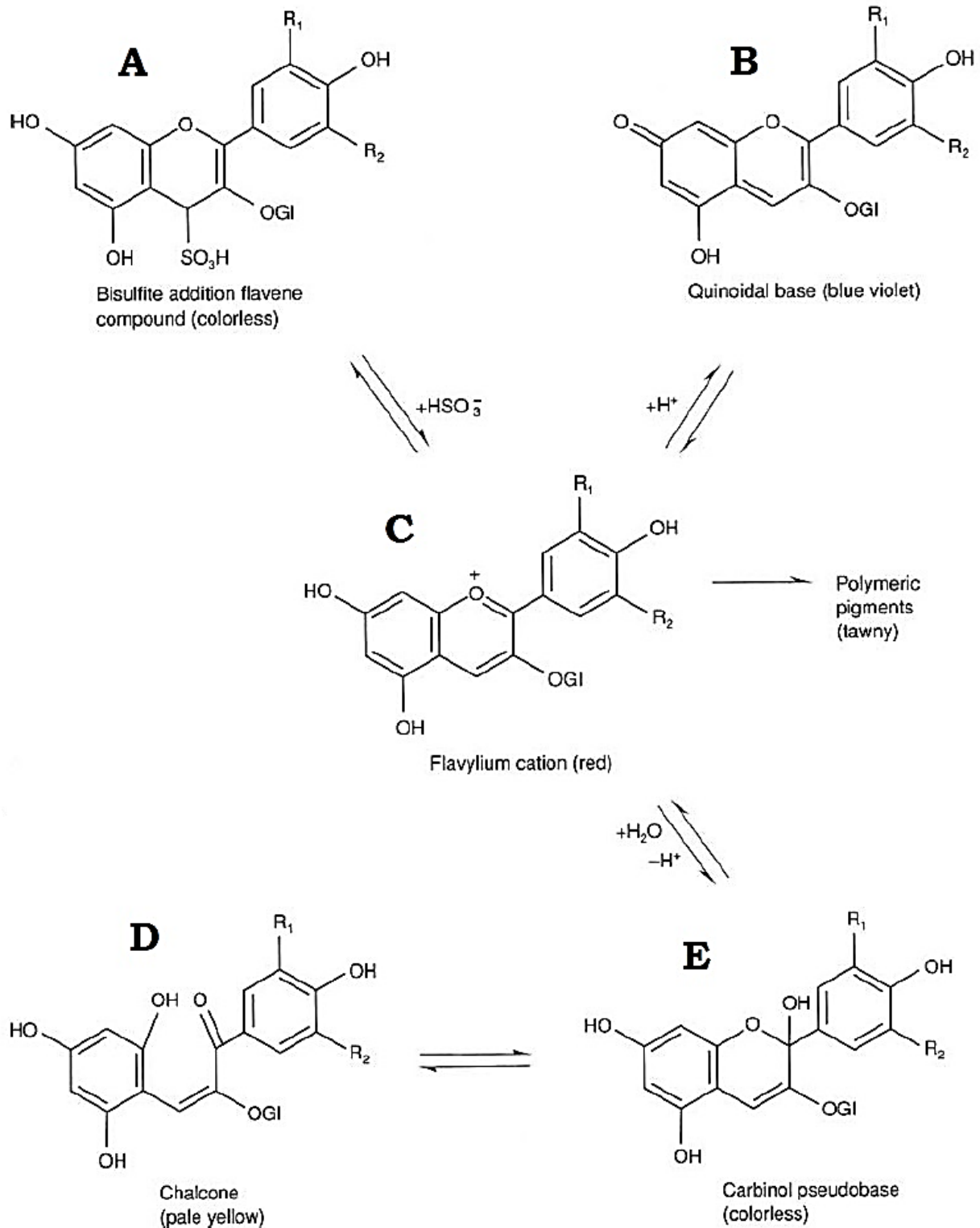
Η κύρια πηγή του κόκκινου χρώματος των κρασιών είναι οι ανθοκυάνες. Οι ανθοκυάνες δεν είναι σταθερά μόρια, οπότε η συγκέντρωσή τους στα κρασιά μειώνεται κατά τους πρώτους μήνες της παραμονής στο βαρέλι. Μετά από μερικά χρόνια εξαφανίζονται εντελώς, παρά το γεγονός ότι το κρασί παραμένει κόκκινο. Αυτή η μείωση οφείλεται σε αντιδράσεις που συμβαίνουν με άλλα συστατικά του κρασιού, σε αντιδράσεις διάσπασης, αλλά και σε τροποποίηση της δομής τους (Ribèreau - Gayon et al. 2006).

Η σταθερότητα των ανθοκυανών εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως ο τύπος των μορίων, η συγκέντρωση των διάφορων συστατικών του κρασιού, το pH, η θερμοκρασία, η οξείδωση και το φως. Η μείωση της συγκέντρωσης των ελεύθερων ανθοκυανών, που καταλήγει στην εξαφάνισή τους μετά από μερικά χρόνια, οφείλεται σε αντιδράσεις διάσπασης και σε αντιδράσεις σταθεροποίησης. Η σταθερότητα αναπτύσσεται μέσω μίας περίπλοκης σειράς μηχανισμών, που καταλήγουν σε ενώσεις που σχηματίζονται άμεσα, όπως αυτές των έγχρωμων συμπλόκων (copigmentation), και άλλες που δημιουργούνται βραδέως, όπως ο πολυμερισμός των ανθοκυανών με φλαβαν-3-όλες και προκυανιδίνες, καθώς και ο σχηματισμός νέων έγχρωμων ενώσεων, όπως οι πυρανοανθοκυάνες. Οι τελευταίες μπορούν επίσης να συμπυκνωθούν με ταννίνες. Μία άλλη πηγή έγχρωμων ενώσεων αποτελούν οι ενώσεις της οξείδωσης και του πολυμερισμού των φλαβονοειδών που προέρχονται από το σταφύλι και το δρύινο βαρέλι (Jackson 2008, Ribèreau - Gayon et al. 2006).

4.2.1. Οι ανθοκυάνες και η υποκατάστασή τους

Οι ανθοκυάνες βρίσκονται στα σταφύλια υπό την μορφή γλυκοζιτών. Ο γλυκοζιδικός δεσμός αυξάνει την χημική σταθερότητα καθώς και την διαλυτότητα της ανθοκυάνης. Στα φρέσκα κρασιά, οι ανθοκυάνες βρίσκονται σε μία δυναμική ισορροπία μεταξύ 5 μοριακών μορφών, όπως φαίνεται στην Εικόνα 19 : μίας δεσμευμένης με το διοξειδίο του θείου (A) και τεσσάρων ελεύθερων, της μορφής του φλαβυλίου (C) (flavylium cation), μίας άχρωμης ψευδοβάσης υπό τη μορφή καρβινόλης ή αλλιώς ημικεταλική μορφή (E) (carbinol pseudobase), μίας άνυδρης βάσης υπό τη μορφή κιννόνης (B) (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) γίνεται γρήγορα 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 γίνεται αργά, και η ισορροπία μεταξύ *cis*- και *trans*-χαλκόνης απέρχεται αργά και είναι δύσκολο να μεταβληθεί (Jackson 2008, He et al. 2012).

Οι περισσότερες μορφές είναι άχρωμες στο pH του κρασιού. Το κόκκινο χρώμα προέρχεται αρχικά από το μικρό ποσοστό των ανθοκυανών που βρίσκονται στη μορφή του φλαβυλίου, αφού στο pH του κρασιού η ισορροπία είναι μετατοπισμένη προς την ημικεταλική μορφή, που είναι άχρωμη. Το ποσοστό αυτό εξαρτάται από το pH και τη συγκέντρωση του ελεύθερου θειώδη ανυδρίτη στο κρασί. Χαμηλά pH αυξάνουν την συγκέντρωση της μορφής του φλαβυλίου, ενισχύοντας το κόκκινο χρώμα. Το χαμηλό pH, επίσης, καθυστερεί την υδρόλυση των μορίων των ανθοκυανών σε αγλυκόνη και σάκχαρο. Καθώς το pH αυξάνεται, μειώνεται δραματικά η πυκνότητα του χρώματος και το ποσοστό των ανθοκυανών που βρίσκονται υπό την μορφή φλαβυλίου. Για παράδειγμα, το 20-25% των ανθοκυανών σε pH 3.4 - 3.6 βρίσκεται στην ιονισμένη μορφή του φλαβυλίου, ενώ σε pH 4 μόνο το 10%. Παρόλα αυτά, ο σημαντικότερος παράγοντας που επηρεάζει την πυκνότητα του χρώματος στα φρέσκα κόκκινα κρασιά δεν είναι το pH, αλλά η συγκέντρωση του θειώδη ανυδρίτη, που είναι ένας αποτελεσματικός, αν και αναστρέψιμος, παράγοντας αποχρωματισμού των ανθοκυανών. Οι ελεύθερες ανθοκυάνες δεσμεύουν τον θειώδη ανυδρίτη σύμφωνα με την αντίδραση $C + SO_3H^- \leftrightarrow A$, όπως είναι φανερό και στην Εικόνα 19 (Jackson 2008, Κουράκου - Δραγώνα 1998, He et al. 2012).



Εικόνα 19: Ισορροπία μεταξύ των διαφόρων μορφών των ανθοκυανών στο κρασί

Η απόχρωση και η σταθερότητα του χρώματος επηρεάζονται από την έκταση και το είδος της υποκατάστασης του Β δακτυλίου της ανθοκυάνης. Το μπλε χρώμα αυξάνεται με το βαθμό υποκατάστασης από τις ελεύθερες υδροξυλομάδες, ενώ το κόκκινο με τις μεθυλομάδες. Η κυρίαρχη ανθοκυάνη στα περισσότερα κόκκινα κρασιά είναι η μαλβίνη, η πιο κόκκινη ανθοκυάνη, και άρα είναι αυτή που δίνει το χρώμα.

Η ευαισθησία στην οξείδωση των ανθοκυανών επηρεάζεται από την παρουσία *ορθο*-υδροξυλίων στον Β δακτύλιο. Οι *ορθο*-υδροξυλομάδες είναι ευαίσθητες στην ενζυμική και μη ενζυμική οξείδωση. Εκτός από την λακκάση, οι περισσότερες πολυφαινολικές οξειδάσες επιδρούν μόνο στις *ορθο*-διφαινολικές θέσεις. Αφού ούτε η μαλβιδίνη ούτε η παιονιδίνη έχουν υδροξυλομάδες σε *ορθο*-θέση, είναι συγκριτικά ανθεκτικότερες στην οξείδωση. Η ανθεκτικότητα στην οξείδωση επηρεάζεται, επίσης, και από την σύζευξη με σάκχαρα και άλλα συστατικά. Οι ενυδατωμένες μορφές των ανθοκυανών (ημικετάλη ή καρβινόλη) αντιδρούν με *ορθο*-δικιννόνες, οι οποίες παρήχθησαν από την οξείδωση. Το προϊόν την αντίδρασης είναι άχρωμο και χημικά ασταθές.

Επιπλέον, οι ανθοκυάνες τείνουν να υδρολύονται σε ανθοκυανιδίνες, χάνοντας το ακυλιωμένο τους μέρος (οξικό, καφεϊκό ή *π*-κουμαρικό οξύ), μαζί με το γλυκοζυλιωμένο (γλυκόζη). Οι διαστασιοποιημένες ανθοκυάνες είναι πιο ευαίσθητες στη μη αναστρέψιμη απώλεια χρώματος, καθώς και στην αναστρέψιμη μετατροπή της έγχρωμης μορφής του φλαβυλίου σε άχρωμες ημικετάλες (Jackson 2008).

4.2.2. Αντιδράσεις διάσπασης των ανθοκυανών

Οι αντιδράσεις διάσπασης καταλήγουν στο σχηματισμό διάφορων ενώσεων όπως χαλκόνες (σε αλκαλικό μέσο), μαλβόνες (υπό την επίδραση υπεροξειδίων), φαινολικά οξέα και κουμαρίνες (σε υδατικά διαλύματα με pH από 3 έως 7) και διυδροφλαβονόλες (παρουσία αλκοόλης). Οι αντιδράσεις διάσπασης εντάσσονται σε τρεις κατηγορίες, στη θερμική υποβάθμιση των ανθοκυανών, στην οξειδωτική υποβάθμιση και στην υποβάθμιση από κετόνες.

Η θέρμανση των ανθοκυανών στους 100 °C προκαλεί μείωση της έντασης του χρώματος, που γίνεται εντονότερη με την πάροδο του χρόνου. Αυτό εξηγείται από τη μετατόπιση της ισορροπίας προς τη χαλκόνη και τις άχρωμες μορφές. Εάν θερμανθούν οι ανθοκυάνες δεν επανέρχονται ποτέ στην αρχική τους κατάσταση, όποιες και αν είναι οι μετέπειτα συνθήκες. Κατά τη θέρμανση, σπάει η ανθρακική αλυσίδα της *trans* χαλκόνης και σχηματίζεται βενζοϊκό οξύ. Επίσης, γίνεται γλυκοζιδική υδρόλυση και σχηματίζεται διυδροφλαβονόλη, από την οποία μπορεί να παραχθεί ένα κινναμωμικό οξύ. Η μαλβιδίνη έχει αποδειχθεί πολύ πιο ευαίσθητη στη θερμική υποβάθμιση σε σχέση με την κυανιδίνη.

Κατά την οξειδωτική υποβάθμιση, οι ανθοκυάνες σε όξινο περιβάλλον χάνουν το χρώμα τους μετά από μερικές μέρες έκθεσης στο φως. Η αντίδραση αυτή επηρεάζεται από τη συγκέντρωση της αλκοόλης. Το οξυγόνο και το φως δρουν ως καταλύτες. Η μαλβιδίνη έχει αποδειχθεί ότι είναι περισσότερο ανθεκτική από την κυανιδίνη στην ελεγχόμενη οξείδωση που συμβαίνει κατά την

παλαιώση, λόγω της υποκατάστασης του Β δακτυλίου της. Οι *ορθο*-διφαινόλες οξειδώνονται, όπως έχει ήδη αναφερθεί, και μπορούν να δράσουν ως υποστρώματα για τα ένζυμα οξειδωσης, όπως η πολυφαινολοξειδάση, και σε μικρότερο βαθμό η υπεροξειδάση. Οι *ορθο*-κινόνες που παράγονται με αυτόν τον τρόπο είναι ισχυρά οξειδωτικά με έντονη δραστηριότητα. Οι ανθοκυάνες αντιδρούν με τα προϊόντα της οξειδωσης, αλλά όχι τόσο έντονα, όπως το καφταρικό οξύ. Μπορούν να οξειδωθούν από τις κινόνες προς παραγωγή ιδιαίτερα ασταθών συμπλόκων ανθοκυανών-κινονών. Διαφορετικά, η βάση της καρβινόλης, με αρνητικά φορτία στις θέσεις 6 και 8, μπορεί να προσελκύσει τις ηλεκτρονιόφιλες κινόνες, δίνοντας άχρωμα προϊόντα προσθήκης, τα οποία αφυδατώνονται και σχηματίζουν ερυθρά κατιόντα φλαβυλίου.

Τελευταία κατηγορία αντιδράσεων αποτελεί η υποβάθμιση από κετόνες. Σε όξινα υδατικά διαλύματα που περιέχουν ακετόνη, οι ανθοκυάνες παράγουν προϊόντα χρώματος πορτοκαλί. Έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί πραγματοποίησης της αντίδρασης αυτής: υδρόλυση των ανθοκυανών και μετατροπή των ανθοκυανιδινών σε διυδροφλαβονόλες, διάσπαση του ετεροκυκλικού δακτυλίου με σχηματισμό βενζοϊκών οξέων, ή αντίδραση μεταξύ της ακετόνης και της ανθοκυάνης, μέσω πολικών διπλών δεσμών.

Η παρουσία του 2- και του 5- οξογλυκονικού οξέος στα κόκκινα κρασιά, ορισμένες φορές σε ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις, όταν το κρασί έχει παραχθεί από σταφύλια προσβεβλημένα, έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία χρωμάτων που γρήγορα αποκτούν πορτοκαλί τόνους. Αυτό πιθανώς οφείλεται σε αντίδραση μεταξύ αυτών των οξέων και των ανθοκυανών, με σταθεροποίηση του πολικού διπλού δεσμού στον C₄ (Ribèreau - Gayon et al. 2006).

4.2.3. Αντιδράσεις των ανθοκυανών με άλλα συστατικά του κρασιού

Η αυτοσυνένωση των ανθοκυανών (self-association), το φαινόμενο του σχηματισμού έγχρωμων συμπλόκων (copigmentation) και τα διάφορα προϊόντα της συμπύκνωσης, εμπλέκονται στην αρχική εξέλιξη του χρώματος των κόκκινων κρασιών, κατά τη διάρκεια και αμέσως μετά την αλκοολική ζύμωση. Μετά τη ζύμωση, περίπου το 25% των ανθοκυανών πολυμερίζονται με φλαβονοειδή ή μη φλαβονοειδή φαινολικά. Το ποσοστό αυτό μπορεί να φτάσει και πάνω από το 40% μέσα στον πρώτο χρόνο. Στη συνέχεια, ο πολυμερισμός συνεχίζεται με πιο αργό ρυθμό, μέχρι να φτάσει το 100% μετά από μερικά χρόνια. Αυτές οι πολυμερείς χρωστικές ουσίες μπορούν να δώσουν διάφορα χρώματα όπως, κίτρινο, ερυθροκίτρινο, καστανοκίτρινο, κόκκινο, και ιώδες, ανάλογα με τη χημική τους φύση. Επειδή τα περισσότερα πολυμερή έχουν μία κιτρινωπή, πορτοκαλί και καστανή απόχρωση, το κρασί σταδιακά παίρνει ένα κεραμιδί χρώμα. Οι διαφορές των ποικιλιών στο περιεχόμενο των φλαβονοειδών, έχει προταθεί ως μία από τις αιτίες της διαφοράς της σταθερότητας του χρώματος στα κόκκινα κρασιά. Η πυκνότητα του χρώματος επίσης μειώνεται με το χρόνο. Αυτό μπορεί να προκαλείται από την υποβάθμιση των ανθοκυανών, την επιπρόσθετη αναδόμηση των πολυμερών ανθοκυανών-ταννινών που τροποποιεί την απόχρωσή τους, και τον σχηματισμό και την καθίζηση των έγχρωμων πολυμερών. Επειδή οι ανθοκυάνες συνδέονται κυρίως μέσω C₄-C₈ δεσμών με τις τερματικές φλαβονοειδείς ομάδες των

ταννινών, τα πολυμερή ανθοκυανών-ταννινών γενικά δεν μεγαλώνουν όσο αυτά των ταννινών. Έτσι, η καθίζηση των έγχρωμων πολυμερών συνήθως απαιτεί την ένωσή τους με τα υπολείμματα των διαλυτών πρωτεϊνών του κρασιού (Jackson 2008).

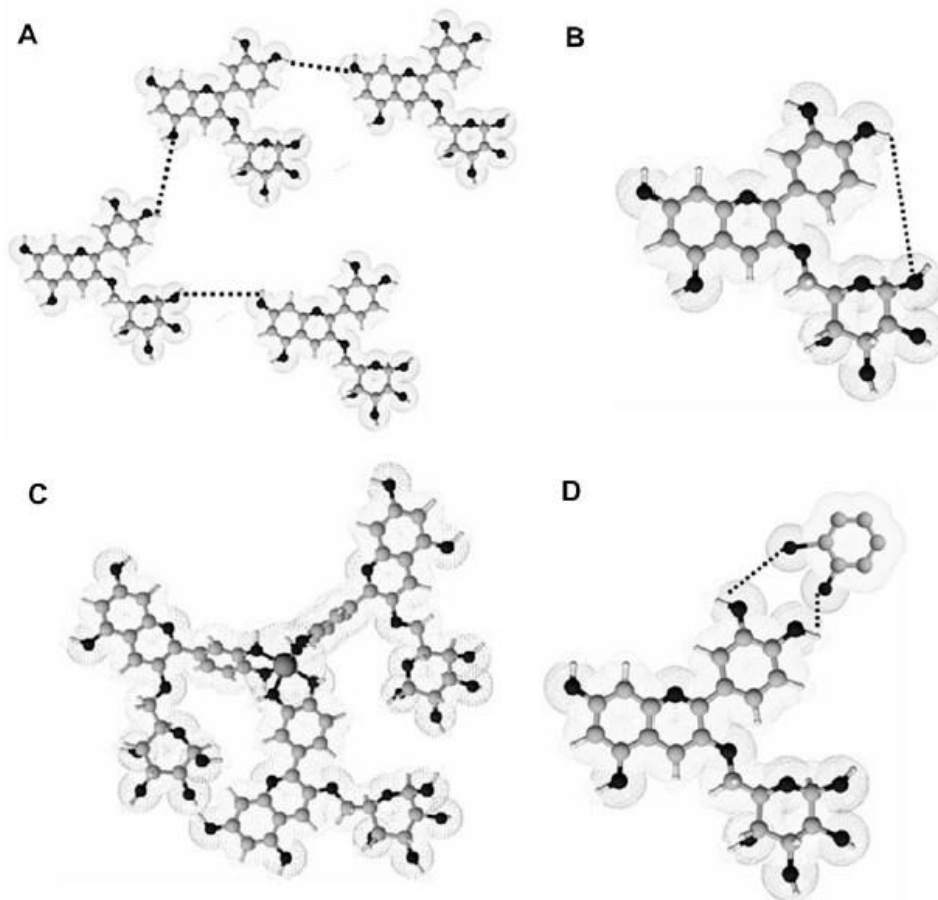
4.2.3.1. Η αυτοσυνένωση των ανθοκυανών και το φαινόμενο του σχηματισμού έγχρωμων συμπλόκων

Στα κόκκινα κρασιά, οι ανθοκυάνες βρίσκονται ως σύμπλοκα, είτε μεταξύ τους, είτε με άλλα συστατικά. Οι ανθοκυάνες συσσωρεύονται και συκρατούνται μεταξύ τους μέσω της αυτοσυνένωσης (self-association) και με άλλα συστατικά μέσω του φαινομένου του σχηματισμού έγχρωμων συμπλόκων (corigmentation). Έτσι, δημιουργούνται μοριακά συσσωματώματα που συκρατούνται από υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις, μεταξύ ανθοκυανών μόνο (αυτοσυνένωση), ή μεταξύ ανθοκυανών και άλλων άχρωμων οργανικών συστατικών ή μεταλλικών ιόντων (φαινόμενο έγχρωμων συμπλόκων). Και οι δύο τύποι συμπλόκων αυξάνουν σημαντικά την ένταση του χρώματος, και μπορούν να επηρεάσουν και την απόχρωση, όπως έχει αποδειχθεί σε πολυάριθμες μελέτες πάνω σε πρότυπα συστήματα αρχικά, αλλά και στο κρασί αργότερα (Boulton 2001). Η αυτοσυνένωση φαίνεται να είναι ιδιαίτερα σημαντική στον χρωματισμό του σταφυλιού, ενώ το φαινόμενο του σχηματισμού έγχρωμων συμπλόκων είναι περισσότερο σημαντικό στον ιώδη χρωματισμό των φρέσκων κόκκινων κρασιών. Η συσσωμάτωση των ανθοκυανικών μορίων σε αυτά τα σύμπλοκα, εμποδίζει την πρόσβαση του νερού στη μορφή του κόκκινου φλαβυλίου και της μπλε βάσης υπό μορφή κιννόνης, και άρα η ισορροπία δεν μετατοπίζεται προς την άχρωμη μορφή της ψευδοβάσης της καρβινόλης. Και οι δύο αυτές μορφές των ανθοκυανών είναι σχεδόν γραμμικές, καθιστώντας την αλληλεπίδραση μεταξύ αυτών και άλλων ανθοκυανών ή άλλων συστατικών (cofactors) ευκολότερη και πιο πιθανή (Jackson 2008).

Στο χαμηλό pH του κρασιού, στο φαινόμενο των έγχρωμων συμπλόκων συμμετέχουν κυρίως ανθοκυάνες υπό την μορφή φλαβυλίου. Αυτό, με τη σειρά του, μετατοπίζει την ισορροπία των ελεύθερων ανθοκυανών προς την έγχρωμη μορφή του φλαβυλίου, γεγονός το οποίο ενισχύει ακόμη περισσότερο το χρώμα και τείνει να μεταβάλλει την απόχρωση προς το ιώδες. Αυτά τα έγχρωμα σύμπλοκα εκτιμάται ότι συμβάλλουν περίπου 30 με 50% στο χρώμα των φρέσκων κόκκινων κρασιών (Boulton 2001, Jackson 2008).

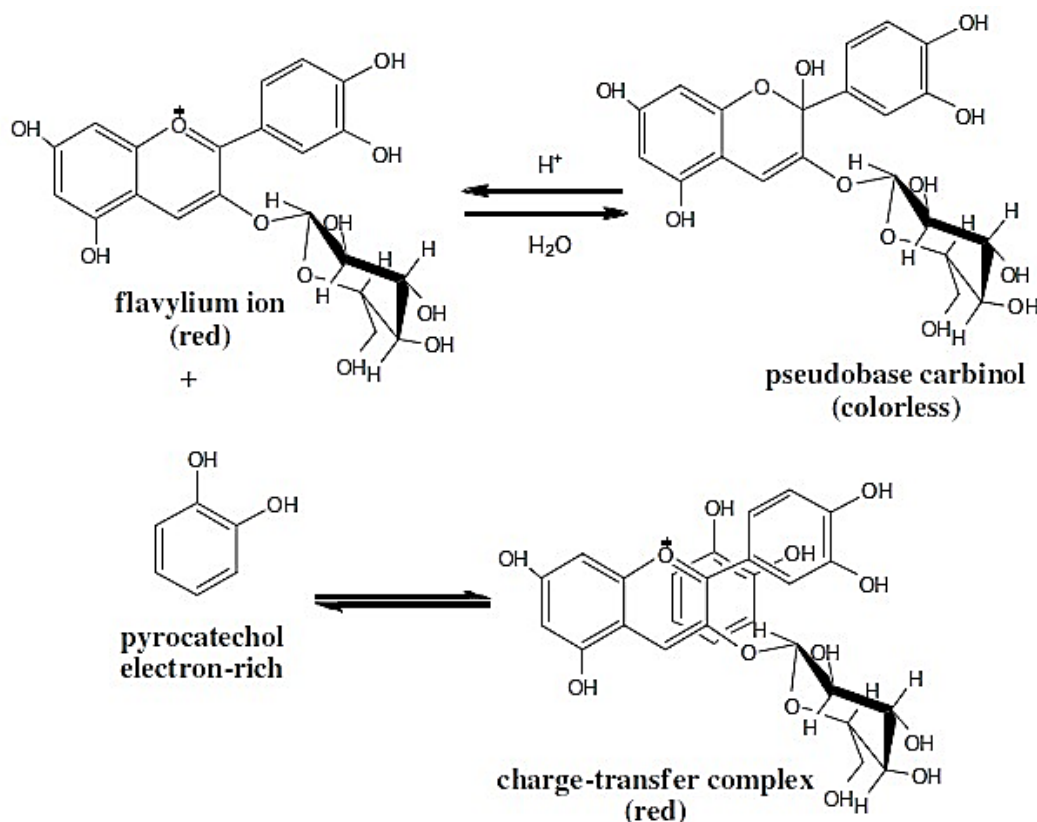
Τα συστατικά (cofactors) που συμμετέχουν στο φαινόμενο των έγχρωμων συμπλόκων είναι πλούσια σε π-ηλεκτρόνια και είναι ικανά να ενωθούν με τα ιόντα του φλαβυλίου, τα οποία είναι φτωχά σε ηλεκτρόνια. Αυτή η ένωση παρέχει προστασία από την πυρηνόφιλη προσβολή του νερού στην θέση 2 του ιόντος του φλαβυλίου, και από άλλες ενώσεις όπως τα υπεροξειδία και τον θειώδη ανυδρίτη στη θέση 4. Τα συστατικά που συνδέονται μέσω του φαινομένου αυτού με τις ανθοκυάνες, μπορούν να είναι φλαβονοειδή, αλκαλοειδή, αμινοξέα, οργανικά οξέα, νουκλεοτίδια, πολυσακχαρίτες, μέταλλα ή άλλες ανθοκυάνες (αυτοσυνένωση). Το φαινόμενο της ενίσχυσης του χρώματος μπορεί να εκδηλωθεί με πέντε διαφορετικούς τρόπους (Εικόνα 20). Αρχικά, μόνο με ανθοκυάνες, μέσω της αυτοσυνένωσης (Εικόνα 20A) και του σχηματισμού ενδομοριακού

σύμπλοκου (intramolecular copigmentation: Εικόνα 20B). Αν το συστατικό που ενώνεται με την ανθοκυάνη είναι ένα μέταλλο, τότε δημιουργείται ένα σύμπλοκο (Εικόνα 20C). Στην περίπτωση ενός συστατικού με ελεύθερο ζεύγος ηλεκτρονίων, σχηματίζεται ένα διαμοριακό έγχρωμο σύμπλοκο (intermolecular copigmentation: Εικόνα 20D). Τέλος, στην πιο πολύπλοκη περίπτωση, το φαινόμενο των έγχρωμων συμπλόκων μπορεί να πραγματοποιηθεί από μία αγλυκόνη, ένα σάκχαρο, ένα άλλο συστατικό (cofactor) και πρωτόνια, όλα μαζί ταυτόχρονα. Όταν το συστατικό είναι ένα φαινολικό συστατικό, η αλληλεπίδραση είναι παροδική, λόγω της έλλειψης χημικών δεσμών. Αυτή η συμπεριφορά είναι το αποτέλεσμα ενός χημικού φαινομένου, γνωστού ως ένωση μεταφοράς φορτίου ή π-π αλληλεπίδραση, το οποίο αναπτύσσεται όταν αλληλοεπιδρούν συστατικά αντίθετου ηλεκτρικού φορτίου. Έτσι, στους δακτυλίους που ενώνονται με ασθενείς δεσμούς, η πυκνότητα των ηλεκτρονίων μεταφέρεται από τον πλούσιο στον φτωχότερο σε ηλεκτρόνια δακτύλιο. Το ιόν του φλαβυλίου στις ανθοκυάνες είναι θετικά φορτισμένο, και άρα είναι κατάλληλο για τον σχηματισμό συμπλόκων μέσω της μεταφοράς φορτίου, με υποστρώματα που είναι πλούσια σε ηλεκτρόνια (Castaneda - Ovando et al. 2009, He et al. 2012).



Εικόνα 20: Οι αλληλεπιδράσεις των ανθοκυανών: (A) αυτοσυνένωση ανθοκυανών, (B) ενδομοριακός σχηματισμός έγχρωμου συμπλόκου ανθοκυάνης, (C) σύμπλοκο με μέταλλα, (D) διαμοριακός σχηματισμός έγχρωμων συμπλόκων με ένα συστατικό με ελεύθερο ζεύγος ηλεκτρονίων

Το φαινόμενο του σχηματισμού έγχρωμων συμπλόκων έχει δύο επιπτώσεις. Πρώτον, τον σχηματισμό των π-π ενώσεων που προκαλούν μεταβολή στις φασματικές ιδιότητες των μορίων στο ιόν του φλαβυλίου, αυξάνοντας την ένταση της απορρόφησης (αυξοχρωμική επίδραση), και μεταβάλλοντας το μήκος κύματος της μέγιστης απορρόφησης, κατά 5 έως 20 nm υψηλότερα, δίνοντας μία μπλε-ιώδη απόχρωση, στο κατά τ' άλλα κόκκινο διάλυμα (βαθοχρωμική μετατόπιση). Δεύτερον, την σταθεροποίηση της μορφής του φλαβυλίου από την π ένωση, που μετατοπίζει την ισορροπία με τέτοιο τρόπο ώστε να αυξάνεται το κόκκινο χρώμα (Εικόνα 21). Γι' αυτό, το μέγεθος της επίδρασης του φαινομένου σχηματισμού των έγχρωμων ενώσεων είναι στενά συνδεδεμένο με το pH, αφού σε χαμηλά pH όλες οι ανθοκυάνες είναι υπό τη μορφή φλαβυλίου, ενώ σε υψηλά είναι υπό την μορφή της άχρωμης ψευδοβάσης της καρβινόλης. Το φαινόμενο σχηματισμού έγχρωμων συμπλόκων είναι εμφανές υπό ασθενείς όξινες συνθήκες (pH 4-6), όπου οι ανθοκυάνες βρίσκονται στις άχρωμες μορφές τους (Castaneda - Ovando et al. 2009, Boulton 2001).



Εικόνα 21: Παράδειγμα της σταθεροποίησης των ανθοκυανών μέσω σχηματισμού ενώσεων από μεταφορά φορτίου (αλληλεπίδραση ανθοκυανών με φαινολικά συστατικά)

Πολλά συστατικά μπορούν να ενωθούν με τις ανθοκυάνες, μέσω του φαινομένου των έγχρωμων συμπλόκων, αλλά τα κύρια είναι η επικατεχίνη, οι προκυανιδίνες, οι φλαβονόλες, τα κινναμωμικά οξέα και οι υδροκινναμωμικοί εστέρες. Οι ποικιλία των ποσοστών αυτών των ουσιών από κρασί σε κρασί, μπορεί εν μέρει να εξηγήσει τα διαφορετικά χρώματα σε κρασιά της

ίδια ποικιλίας. Για παράδειγμα, παρόλο που οι επικατεχίνες συμπλοκοποιούνται με τις ανθοκυάνες αμέσως, οι κατεχίνες δίνουν πιο έντονα σε χρώμα σύμπλοκα. Τα παράγωγα των κινναμωμικών οξέων, όπως το καφεϊκό και το *π*-κουμαρικό οξύ, συμπλοκοποιούνται και αυτά αμέσως (He et al. 2012). Αυτό εξηγεί το γιατί παραδοσιακά μερικές περιοχές προσθέτουν γλεύκος λευκών ποικιλιών σταφυλιού (συνήθως πλούσιο σε αυτά τα μη φλαβονοειδή στο γλεύκος των ερυθρών ποικιλιών, πριν την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης (Jackson 2008). Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι κατά την ανάμειξη ερυθρών ποικιλιών πριν τη ζύμωση, το ποσοστό της κάθε ποικιλίας, καθώς και οι συνθήκες καλλιέργειάς της, μπορούν να επηρεάσουν την έκταση του φαινομένου του σχηματισμού έγχρωμων συμπλόκων (Lorenzo et al. 2005).

Έχουν διεξαχθεί πολλές έρευνες γύρω από το φαινόμενο του σχηματισμού έγχρωμων συμπλόκων μεταξύ ανθοκυανών και άλλων συστατικών. Σε κάποιες από αυτές έχουν μελετηθεί μέθοδοι για την ενίσχυση του χρώματος στα κρασιά, πριν την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης. Για παράδειγμα, έχουν ψεκαστεί σταφύλια με κάποια συστατικά, όπως τη φλαβονόλη ρουτίνη, ώστε να μελετηθεί η ενίσχυση του χρώματος στο κρασί που θα πρόκυπτε (González et al. 2010). Δοκιμές αυτού του τύπου δεν έχουν εξάγει σαφή αποτελέσματα. Αντίθετα, η προσθήκη διαφόρων συστατικών σε γλεύκος, όπως (+)-κατεχίνη σε περιεκτικότητα 120 mg/L, απέδειξε ότι μπορεί να ενισχύσει το χρώμα του κρασιού μετά τη ζύμωση κατά 10%. Η προσθήκη αυτών των συστατικών πριν την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης ενισχύει όχι μόνο το φαινόμενο του σχηματισμού έγχρωμων συμπλόκων, αλλά και τον πολυμερισμό των ανθοκυανών και άλλων συστατικών του κρασιού (Darias-Martín et al. 2001). Σε άλλη έρευνα, η προζυμωτική προσθήκη στο γλεύκος συστατικών που συμμετέχουν στο φαινόμενο σχηματισμού έγχρωμων συμπλόκων (καφεϊκό οξύ, ρουτίνη, (+)-κατεχίνη, ταννίνες από τους φλοιούς και ταννίνες από τα γίγαρτα λευκής ποικιλίας σταφυλιού), απέδειξε ότι αυτή η προσθήκη ενισχύει το φαινόμενο σχηματισμού έγχρωμων συμπλόκων, παράγει κρασιά με εντονότερο χρώμα, υψηλότερη περιεκτικότητα σε ανθοκυάνες, υψηλότερο ποσοστό ταννινών που είναι πολυμερισμένες με πολυσακχαρίτες και κρασιά με λιγότερη στυφότητα (Álvarez et al. 2009). Σύμφωνα με την έρευνα των Bloomfield et al. (2003), στην οποία προστέθηκαν καφεϊκό και *π*-κουμαρικό οξύ πριν την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης στο γλεύκος ποικιλιών Cabernet Sauvignon και Pinot Noir, αποδείχθηκε ότι η προσθήκη *π*-κουμαρικού οξέος είχε μεγαλύτερη επίδραση στο φαινόμενο του σχηματισμού έγχρωμων συμπλόκων, αντί αυτή του καφεϊκού οξέος.

Επίσης, έχει μελετηθεί και η προσθήκη τέτοιων συστατικών σε κρασί και σε πρότυπα διαλύματα που περιέχουν συστατικά του κρασιού. Για παράδειγμα, έχουν προστεθεί φαινολικά συστατικά (κατεχίνη, επικατεχίνη, προκυανιδίνη B2, καφεϊκό οξύ, *π*-κουμαρικό οξύ, μυρισιτρίνη και κερκιτρίνη) σε αλκοολικό διάλυμα μαλβιδίνης-3-γλυκοζίτη (pH 3.6) σε μοριακή αναλογία 1:1. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το φαινόμενο του σχηματισμού έγχρωμων συμπλόκων παρατηρήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις, παρά τη μικρή περιεκτικότητα του πρόσθετου συστατικού. Στα διαλύματα με πρόσθετες φλαβαν-3-όλες, το φαινόμενο σχηματισμού έγχρωμων συμπλόκων δεν πήρε μεγάλη έκταση, και ακόμα μικρότερη στο διάλυμα με προκυανιδίνη B2, ενώ οι φλαβονόλες αποδείχθηκαν τα καλύτερα συστατικά, αφού το φαινόμενο αυτό ήταν έντονο στα

διαλύματά τους (Gómez - Miguez et al. 2006). Επιπλέον, έχει μελετηθεί το φαινόμενο του σχηματισμού έγχρωμων συμπλόκων σε διάφορες τιμές του pH. Για τον σκοπό αυτό, σε εκχύλισμα φλοιών της ποικιλίας Cabernet Sauvignon προστέθηκαν διάφορα οργανικά οξέα (καφεϊκό, φερουλικό, γαλλικό και ταννικό οξύ) σε διαφορετικές τιμές του pH (1.0, 2.0, 3.0, 3.3, 3.5, 3.7, 4.0, 4.5). Το φαινόμενο αυτό ήταν πιο έντονο σε pH 3.3, για όλα τα οξέα που χρησιμοποιήθηκαν, αφού στο pH αυτό ήταν μεγαλύτερη η αυξοχρωμική επίδραση, καθώς και η βαθοχρωμική μετατόπιση του μήκους κύματος που παρουσιάζουν μέγιστη απορρόφηση οι ανθοκυάνες (Gauche et al. 2010).

Φαινόμενα σχηματισμού έγχρωμων συμπλόκων δεν παρατηρούνται στα ροζέ κρασιά, και προφανώς ούτε στα λευκά. Τα περισσότερα ροζέ κρασιά περιέχουν ανθοκυάνες της τάξης των 20 με 50 mg/L, όπου δεν παρατηρούνται τέτοια φαινόμενα. Επίσης, η ελάχιστη συγκέντρωση των ανθοκυανών για να αναπτυχθούν φαινόμενα αυτοσυνένωσης πρέπει να είναι μεγαλύτερη του 1 mmol/L (González-Manzano et al. 2008).

Διάφοροι παράγοντες μπορούν να προκαλέσουν διάσπαση αυτών των ενώσεων των ανθοκυανών. Με τη θέρμανση των σταφυλιών ή του γλεύκους με σκοπό την βελτίωση της εκχύλισης του χρώματος (θερμοοινοποίηση), αποτρέπεται η αυτοσυνένωση των ανθοκυανών. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε μία σημαντική απώλεια του χρώματος κατά την ωρίμανση του κρασιού, αν δεν έχουν εκχυλιστεί αρκετές ταννίνες από τα στέμφυλα, αφού οι ταννίνες τείνουν να σχηματίζουν με τις ανθοκυάνες έγχρωμα πολυμερή ανθοκυανών - ταννινών. Επίσης, η παρουσία της αιθανόλης αποσταθεροποιεί του δεσμούς ανάμεσα στα συσσωματώματα των ανθοκυανών (González-Manzano et al. 2008, Hermosín-Gutiérrez 2003). Συνεπώς, το γλεύκος που έχει παραμείνει σε επαφή με τα στέμφυλα για λίγες μόνο μέρες, μπορεί να παρουσιάσει μία απώλεια χρώματος καθώς προχωρά η αλκοολική ζύμωση, παρόλο που το ανθοκυανικό φορτίο παραμένει σχετικά σταθερό. Η ελάττωση της πυκνότητας του χρώματος εξαρτάται από το φαινολικό φορτίο, το pH και την περιεκτικότητα της αιθανόλης (Jackson 2008).

Έχει αναφερθεί ότι όσο μεγαλύτερη είναι η υποκατάσταση από μεθυλομάδες στον Β δακτύλιο του μορίου της ανθοκυάνης, τόσο υψηλότερη αυτοσυνένωση ανθοκυανών παρουσιάζεται (González-Manzano et al. 2008). Επιπλέον, υποστηρίζεται ότι το μόριο του γλυκοζίτη-3-μαλβιδίνης (malvidin-3-*O*-glucoside) προτιμά να συμμετέχει στην αυτοσυνένωση των ανθοκυανών, παρά να λάβει μέρος στο φαινόμενο σχηματισμού έγχρωμων συμπλόκων με άλλα συστατικά, όσα και αν δοκιμάστηκαν. Παρόλα αυτά, ο *π*-κουμαριλιωμένος γλυκοζίτης της μαλβιδίνης (malvidin-3-*O*-(6''-*O*-*p*-coumaryl)-glucoside) δεν έδειξε καμία ενίσχυση στο χρώμα, και γι' αυτό θεωρείται ότι η *π*-κουμαρική ομάδα αποτρέπει την αυτοσυνένωση των ανθοκυανών (Lambert et al. 2011).

Η αποθήκευση του κρασιού σε χαμηλές θερμοκρασίες ευνοεί την ανάπτυξη του φαινομένου των έγχρωμων συμπλόκων και καθυστερεί την διάσπασή τους. Επειδή η μοριακή συσσωμάτωση συμβαίνει σε μία δυναμική ισορροπία μεταξύ των ελεύθερων ανθοκυανών, στα κόκκινα κρασιά με λίγες χρωστικές και χαμηλό φαινολικό φορτίο παρουσιάζεται αυξημένη διάσταση των

συσσωματωμάτων και μεγαλύτερη απώλεια χρώματος από αυτά που θα μπορούσαν να προσδιορισθούν με βάση το ανθοκυανικό τους φορτίο (Jackson 2008).

4.2.3.2. Πολυμερισμός ανθοκυανών - ταννινών

Τα συστατικά που εκχυλίζονται από τα στέμφυλα, μαζί με τις ανθοκυάνες, συνεισφέρουν, άμεσα ή έμμεσα, στον χρωματισμό του κρασιού. Αυτά τα συστατικά, κυρίως οι κατεχίνες και οι προκυανιδίνες, ξεκινούν να πολυμερίζονται με τις ανθοκυάνες και τις ανθοκυανιδίνες, παράγοντας προϊόντα προσθήκης τύπου T-A ή A-T (T: ταννίνες, A: ανθοκυάνες). Οι κατεχίνες και τα oligομερή τους (προκυανιδίνες) μπορούν επίσης να ενωθούν μεταξύ τους. Αυτό οδηγεί στον σχηματισμό μεγάλων σε μέγεθος συμπυκνωμένων ταννινών, πολύ πιο πολύπλοκων από αυτές που εκχυλίζονται από τα σταφύλια. Αυτά τα μεγάλα πολυμερή είναι λιγότερο επιρρεπή στο να συμπυκνωθούν με ανθοκυάνες, σε σχέση με τις μικρότερες προκυανιδίνες ή κατεχίνες.

Λόγω της ευαισθησίας των ελεύθερων ανθοκυανών στην μη αντιστρεπτή υποβάθμιση, είναι επιθυμητό ο πολυμερισμός αυτός να συμβαίνει γρήγορα κατά την ωρίμανση του κρασιού, αφού προστατεύει τα μόρια των ανθοκυανών από την οξείδωση. Οι παράγοντες που καθυστερούν τον πολυμερισμό ανθοκυανών - φλαβονοειδών, αυξάνουν την πιθανότητα της μη αναστρέψιμης οξείδωσης των ανθοκυανών (και το καφέτισμα). Ένας τέτοιος παράγοντας είναι η προσθήκη θειώδη ανυδρίτη που οδηγεί στον σχηματισμό ενώσεων με τις ανθοκυάνες. Σε αυτή τη περίπτωση, ο πολυμερισμός εμποδίζεται, καθώς αυτή η προσθήκη γίνεται στον ίδιο άνθρακα που συνδέει τις ανθοκυάνες με τα φλαβονοειδή. Ο πολυμερισμός απωθεί το νερό, προστατεύοντας έτσι τις ανθοκυάνες από μία πυρηνόφιλη προσβολή.

Τα σύμπλοκα που σχηματίζονται από τον πολυμερισμό ανθοκυανών - ταννινών είναι σταθερά και διατηρούν το κόκκινο χρώμα των ανθοκυανών. Ένα μεγαλύτερο ποσοστό των ανθοκυανών είναι σε έγχρωμη μορφή (μορφή φλαβυλίου και κατάσταση άνυδρης βάσης υπό τη μορφή κιννόνης) όταν συνδέονται με ταννίνες, παρά όταν είναι ελεύθερες. Για παράδειγμα, το 60% των πολυμερισμένων ανθοκυανών είναι έγχρωμο σε pH 3.4, ενώ μόνο το 20% του αντίστοιχου ποσού των ελεύθερων ανθοκυανών είναι έγχρωμο στο ίδιο pH. Αυτό φανερώνει τον σημαντικό ρόλο που παίζουν το pH και ο πολυμερισμός στο ζωηρό χρώμα των κόκκινων κρασιών. Ο πολυμερισμός είναι, επίσης, σημαντικός και στη γέυση των κόκκινων κρασιών, αφού αυξάνει την διαλυτότητα των φλαβονοειδών πολυμερών (ταννίνες). Επίσης, είναι σημαντικός στη ελάττωση της καθίζησης των ταννινών. Οι μη φλαβονοειδής ταννίνες που εκχυλίζονται από τα δρύινα βαρέλια δεν συμμετέχουν σημαντικά στις αντιδράσεις συμπύκνωσης με ανθοκυάνες. Παρ' όλα αυτά, ευνοούν την σταθερότητα του χρώματος έμμεσα, προστατεύοντας τις ανθοκυάνες και τις φλαβονόλες από την οξείδωση (Jackson 2008, Κουράκου - Δραγώνα 1998).

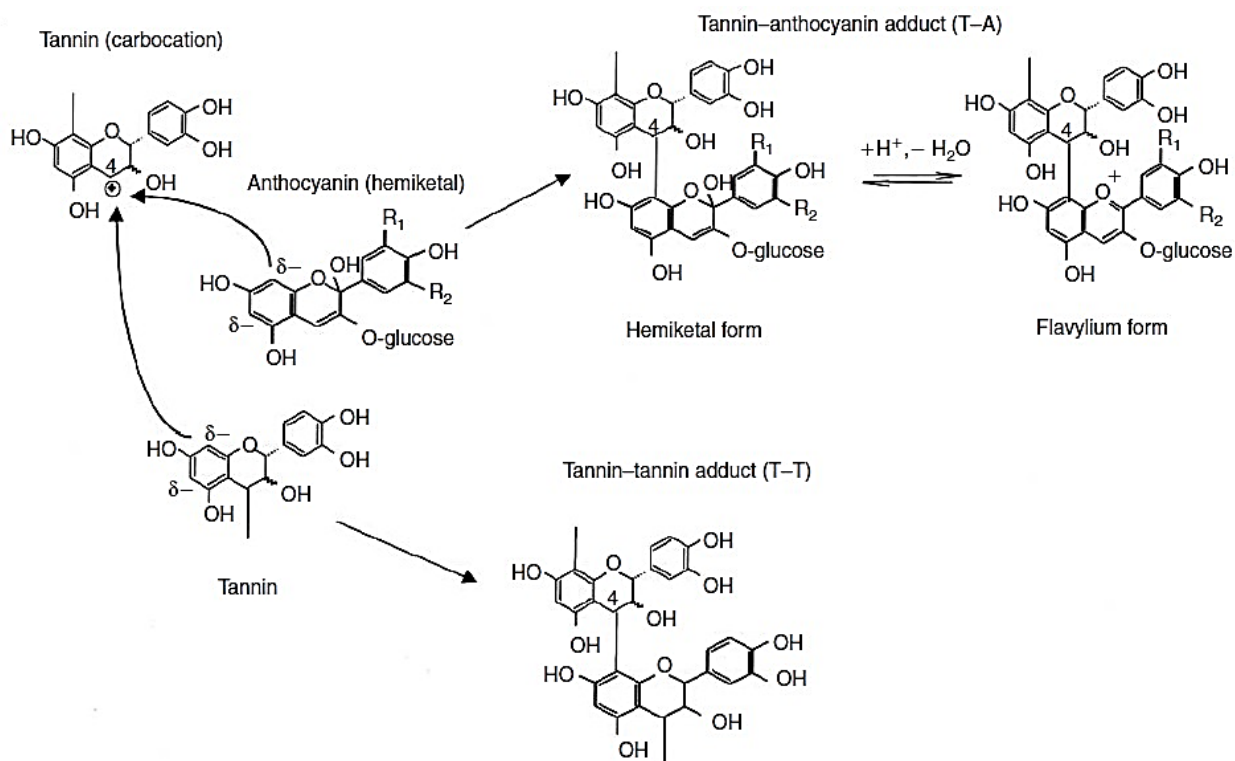
Ο πολυμερισμός μαζί με την οξείδωση μεταβάλλουν το χρώμα των ανθοκυανών, και το κρασί αποκτά ένα κεραμιδί χρώμα. Η οξείδωση των ελεύθερων ανθοκυανών διευκολύνει το σχηματισμό ενώσεων με τις προκυανιδίνες και τις oligομερείς ταννίνες, με συνέπεια την δημιουργία έγχρωμων ενώσεων T-A, που έχουν διαφορετικά χρώματα από τις ελεύθερες

ανθοκυάνες και είναι αρκετά σταθερές στις μεταβολές του pH και στο χρόνο, γεγονός που επιτρέπει στα κόκκινα κρασιά να διατηρήσουν το χρώμα τους κατά την αποθήκευση και την παλαίωση. Ο σχηματισμός των ενώσεων T-A εξαρτάται από τη φύση και την ποσότητα των ανθοκυανών και των ταννινών που θα εκχυλιστούν κατά την οινοποίηση. Το χρώμα των φρέσκων κόκκινων κρασιών είναι, επομένως, στενά εξαρτώμενο από τον πλούτο του φλοιού των ραγών σε ανθοκυάνες, την ωριμότητα των γιγάρτων που εμπλουτίζουν το ζυμούμενο γλεύκος σε προκυανιδίνες, και τη μέθοδο της οινοποίησης που καθορίζει τις συνθήκες εκχύλισης (Κουράκου - Δραγώνα 1998).

Μέσα στις δεξαμενές οινοποίησης δεν ευνοείται ο σχηματισμός ενώσεων T-A λόγω του έντονα αναγωγικού περιβάλλοντος. Όμως, μετά το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης, ευνοείται ο σχηματισμός ενδοφλαβονοειδών ενώσεων μεταξύ των συστατικών που εκχυλίστηκαν. Ο σχηματισμός του συμπλόκου T-A παρεμποδίζεται από τον θειώδη ανυδρίτη, ο οποίος ενώνεται με τις ελεύθερες ανθοκυάνες και από το φως, το οποίο τις καταστρέφει. Αντίθετα, το οξυγόνο, λόγω των οξειδώσεων που προκαλεί, ευνοεί τον σχηματισμό των ενώσεων T-A, και είναι αυτό που καθιστά αναγκαία την παλαίωση των κόκκινων κρασιών σε βαρέλια. Οι συγκεκριμένες αντιδράσεις θα παρουσιαστούν στο υποκεφάλαιο 4.3.3..

Όταν τα κρασιά παραμένουν προς ωρίμανση και παλαίωση σε βαρέλια, με μικρή περιεκτικότητα σε θειώδη ανυδρίτη, επέρχονται συμπυκνώσεις σε ακόμη μεγαλύτερο βαθμό, οπότε οι ιδιότητες των ενώσεων T-A μεταβάλλονται και πλησιάζουν αυτές των συμπυκνωμένων ταννινών. Προς διάκριση των δύο βαθμών πολυμερισμού, οι απλές ενώσεις T-A ονομάζονται συμπυκνωμένες ανθοκυάνες, ενώ οι ενώσεις μεγαλύτερου βαθμού πολυμερισμού, πολυμερισμένες ανθοκυάνες (Κουράκου - Δραγώνα 1998).

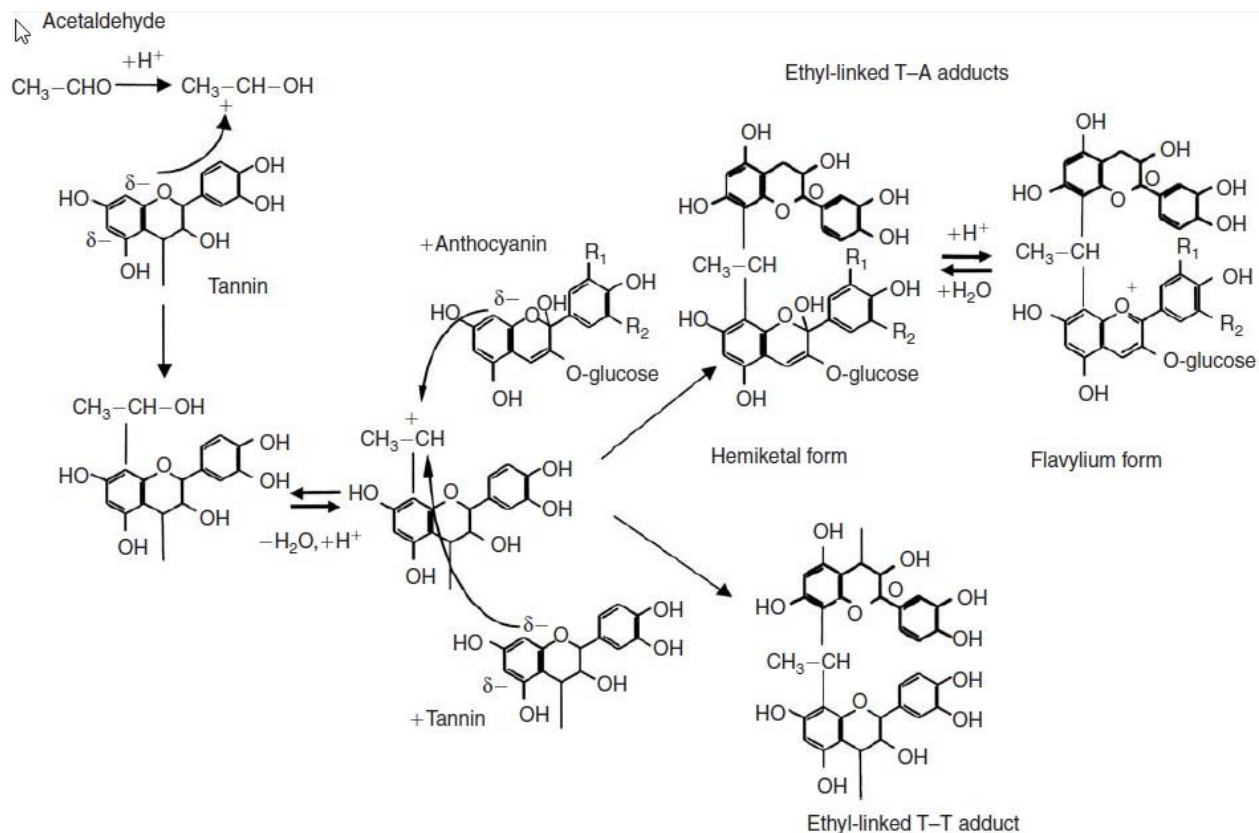
Οι πιο άφθονες, αλλά άχρωμες, ημικεταλικές (πυρηνόφιλες) ανθοκυάνες παράγουν προϊόντα προσθήκης T-A. Αυτά σχηματίζονται καθώς ο C₈ (ή ο C₆) ενός μορίου ανθοκυάνης, ενώνεται με τον ηλεκτρονιόφιλο C₄ μίας τερματικής φλαβονοειδούς μονάδας μίας προκυανιδίνης ή μίας μικρής συμπυκνωμένης ταννίνης (Εικόνα 22). Μέσω της αφυδάτωσης, παράγουν έγχρωμες ενώσεις φλαβυλίου, οι οποίες ενισχύουν το χρώμα. Τέτοια πολυμερή μπορούν να έχουν πάνω από οκτώ φλαβονοειδείς υπομονάδες. Αντίθετα, η αλληλεπίδραση των ηλεκτρονίων μεταξύ του C₄ μίας ηλεκτρονιόφιλης ανθοκυάνης υπό τη μορφή φλαβυλίου και του C₈ (ή C₆) μίας πυρηνόφυλης φλαβαν-3-όλης μίας προκυανιδίνης, ή ενός μορίου κατεχίνης ή επικατεχίνης, σχηματίζει προϊόντα προσθήκης A-T. Η ένωση αυτή αρχικά παράγει άχρωμα σύμπλοκα (ημικετάλες). Η επακόλουθη οξείδωση θεωρείται ότι καταλήγει στην αποκατάσταση της έγχρωμης μορφής του φλαβυλίου. Περαιτέρω δομική αναδιάταξη μπορεί να παράγει κιτρινοπορτοκαλί μορφές ξανθυλίου. Η δομή του ξανθυλίου σχηματίζεται από την αντίδραση της αφυδάτωσης μεταξύ του C₅ μιας ανθοκυάνης και του C₈ ενός φλαβονοειδούς. Έτσι, σχηματίζεται ένας δακτύλιος πυρανίου μεταξύ των δύο αυτών μορίων (Jackson 2008).



Εικόνα 22: Πιθανός μηχανισμός σχηματισμού προϊόντων προσθήκης T-A και T-T

4.2.3.3. Πολυμερισμός ανθοκυανών - ταννινών μέσω ακεταλδεΐδης

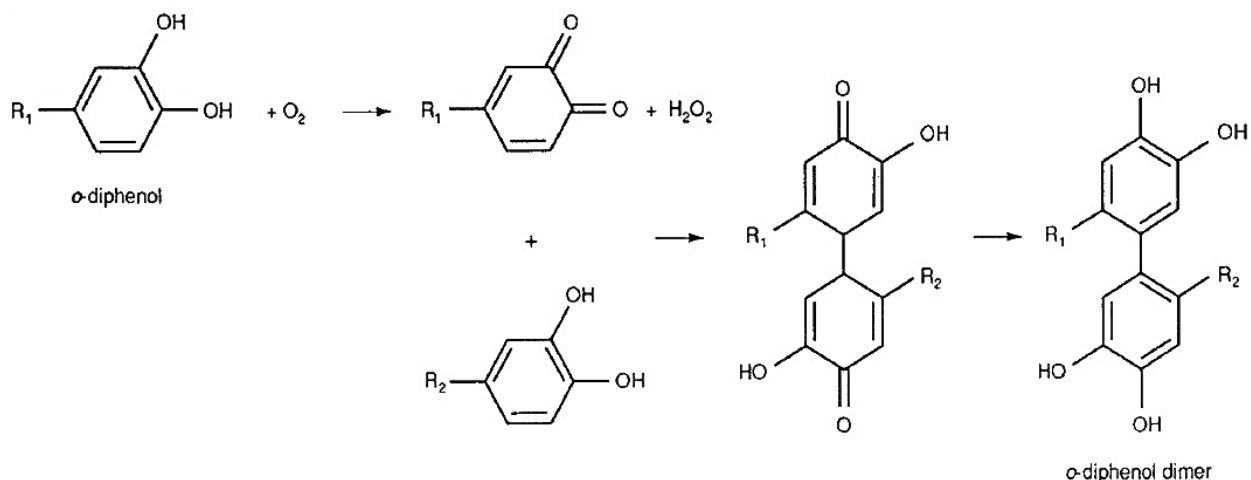
Παρόλο που οι ανθοκυάνες συμπυκνώνονται με φλαβονοειδή, η αντίδραση γίνεται με αργό ρυθμό στο κρασί. Η ένωση αυτή ενισχύεται από την παρουσία της ακεταλδεΐδης. Σε χαμηλά pH, η ακεταλδεΐδη βρίσκεται υπό τη δραστική μορφή του ιόντος καρβονίου (Εικόνα 23). Σε αυτή την κατάσταση, η ακεταλδεΐδη μπορεί να αντιδράσει με τον πυρηνόφιλο (αρνητικά φορτισμένο) C₈ μίας τερματικής μονάδας μία προκυανιδίνης. Κατά την αφυδάτωση, η ομάδα της ακεταλδεΐδης μπορεί να συνδεθεί με τον C₈ μίας ανθοκυάνης στην ημικεταλική κατάσταση. Περαιτέρω αφυδάτωση, μετατρέπει την άχρωμη ημικεταλική μορφή σε έγχρωμη μορφή του φλαβυλίου ή της άνυδρης βάσης κινόνης, ενισχύοντας έτσι το χρώμα. Παρόμοιες συνδέσεις του μορίου ακεταλδεΐδης-προκυανιδίνης οδηγούν στον πολυμερισμό της ομάδας της φλαβαν-3-όλης, δημιουργώντας ενώσεις T-T, είτε μέσω του πυρηνόφιλου C₈ τους, είτε μεταξύ του C₈ του ενός φλαβονοειδούς με τον C₆ του άλλου. Οι αντιδράσεις αυτές παρουσιάζονται στην Εικόνα 23. Παρόλο που οι χαμηλές θερμοκρασίες των κελαριών καθυστερούν τον σχηματισμό των ενώσεων T-T και T-A, είναι επιθυμητές γιατί περιορίζουν τον σχηματισμό υπερβολικά μεγάλων έγχρωμων πολυμερών, τα οποία καθιζάνουν και οδηγούν σε απώλεια του χρώματος (Jackson 2008).



Εικόνα 23: Μηχανισμός αντιδράσεων σχηματισμού προϊόντων T-A και T-T υπό την παρουσία ακεταλδεΐδης

Η ακεταλδεΐδη που παράγεται από τις ζύμες κατά την αλκοολική ζύμωση, είναι σημαντική, αφού σχηματίζονται άμεσα αυτά τα έγχρωμα πολυμερή. Η παρουσία της αιθανόλης και της ακεταλδεΐδης μειώνουν τον φαινόμενο του σχηματισμού των έγχρωμων συμπλόκων (corigmentation), ενώ ευνοούν τον παραπάνω πολυμερισμό που περιλαμβάνει ακεταλδεΐδη.

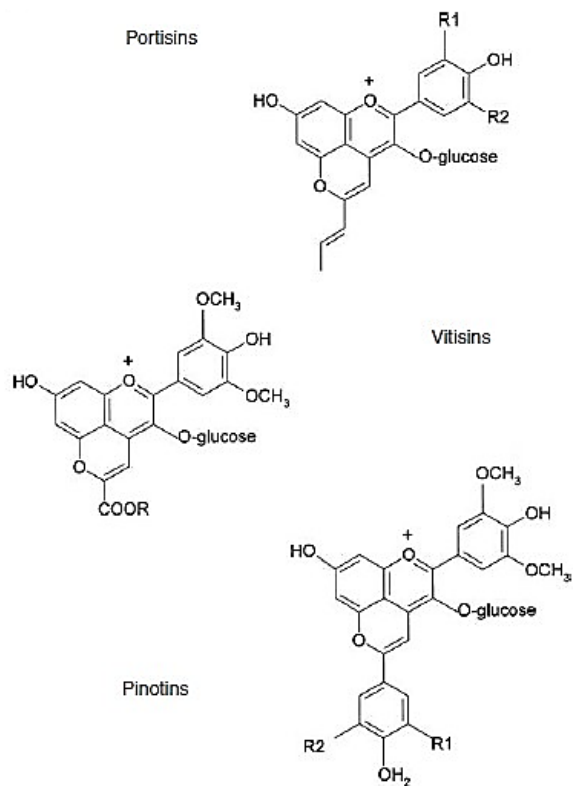
Η πιο δραστική ανθοκυάνη στον σχηματισμό αυτών των πολυμερών είναι η μαλβιδίνη, η πιο συνηθισμένη ανθοκυάνη των σταφυλιών. Ο πολυμερισμός γίνεται πιο γρήγορα από τον σχηματισμό των έγχρωμων συμπλόκων, αλλά απαιτεί την αυτοοξειδωση των φαινολικών του κρασιού, παρουσία οξυγόνου. Αυτό εξηγεί την ενίσχυση και την σταθεροποίηση του χρώματος των κόκκινων κρασιών, όταν αυτά εκτίθενται σε μικρά ποσά οξυγόνου (περίπου 40 mg O_2 /έτος). Κατά τη διάρκεια της αυτοοξειδωσης των *ορθο*-διφαινολών, που καταλύεται από ιόντα χαλκού ή σιδήρου, παράγεται υπεροξειδίο του υδρογόνου και μία *ορθο*-δικινόνη. Η *ορθο*-δικινόνη που παράγεται μπορεί να αντιδράσει με μία *ορθο*-διφαινόλη, ώσπου τελικά να παραχθεί ένα διμερές *ορθο*-διφαινόλης (Εικόνα 23). Το υπεροξειδίο του υδρογόνου που παράγεται ενεργοποιεί την οξείδωση της αιθανόλης σε ακεταλδεΐδη, υπό την παρουσία ιόντων χαλκού και σιδήρου. Στη συνέχεια, η ακεταλδεΐδη ενεργοποιεί τις αντιδράσεις πολυμερισμού ανθοκυανών-ταννινών. Η έκταση αυτών των αντιδράσεων, εξαρτάται από την πρόσληψη του οξυγόνου, την παρουσία του θειώδη ανυδρίτη, και την ποσότητα καθώς και τον τύπο των κατεχινών και των πολυμερών τους, των προκυανιδινών (Jackson 2008).



Εικόνα 24: Αυτοοξειδωση ορθο-διφαινολών για την παραγωγή πολυμερών ορθο-διφαινολών και υπεροξειδίου του υδρογόνου, το οποίο θα ενεργοποιήσει την οξείδωση της αιθανόλης σε ακεταλδεύδη

4.2.3.4. Πυρανοανθοκυάνες

Άλλοι μηχανισμοί της αρχικής σταθεροποίησης του χρώματος περιλαμβάνουν την άμεση αντίδραση μεταξύ της μαλβιδίνης και των παραπροϊόντων των ζυμών, όπως η ακεταλδεύδη και οι βινυλοφαινόλες (π.χ. παράγωγα των κινναμωμικών οξέων). Οι ενώσεις που προκύπτουν ονομάζονται πυρανοανθοκυάνες (Εικόνα 25). Σχηματίζεται ένας επιπλέον δακτύλιος πυρανίου μεταξύ του C₄ και μιας υδροξυλομάδας του C₅ της ανθοκυάνης. Οι ενώσεις αυτές είναι πολύ σταθερές και ανθεκτικές στον αποχρωματισμό του θειώδη ανυδρίτη και συντελούν στην σταθεροποίηση του χρώματος. Εκτός από μερικές πορτισίνες, που είναι μπλε, οι περισσότερες πυρανοανθοκυάνες έχουν κιτρινοπορτοκαλί χρώματα. Πιθανώς, συντελούν στο καστανόξανθο χρώμα που σχετίζεται με την παλαιώση. Οι κύριες μονομερείς ανθοκυάνες που παραμένουν στα παλαιωμένα κρασιά είναι οι βιτισίνες, τα προϊόντα της αντίδρασης μεταξύ της μαλβιδίνης και του πυροσταφυλικού οξέος (βιτισίνες Α), ή της ακεταλδεύδης (βιτισίνες Β). Και αυτές μπορούν να ακυλιωθούν, όπως οι ανθοκυάνες. Σχηματίζονται κατά τα αρχικά στάδια της ζύμωσης. Επίσης, μπορούν να σχηματίσουν πολυμερή με τις ταννίνες. Οι πινοτίνες σχηματίζονται μεταξύ των ανθοκυανών και

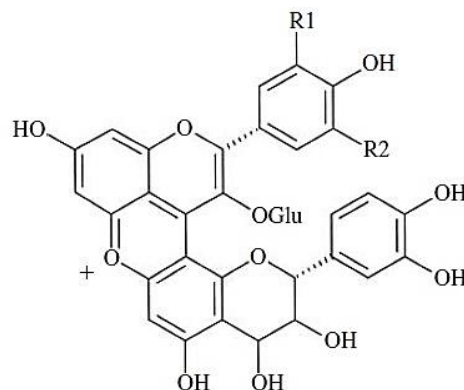


Εικόνα 25: Δομή των τριών κατηγοριών πυρανοανθοκυανών (πορτισίνες, βιτισίνες, πινοτίνες) που έχουν βρεθεί στο κρασί

των παραγώγων του κινναμωμικού οξέος, όπως το καφεϊκό οξύ. Έχουν την τάση να συσσωρεύονται μετά τη ζύμωση. Οι πορτισίνες προέρχονται από τα προϊόντα προσθήκης ανθοκυανών-πυροσταφυλικού οξέος και τις φλαβονόλες, υπό την παρουσία ακεταλδεύδης. Σχηματίζονται καθώς τα αρχικά προϊόντα της αντίδρασης υφίστανται κυκλοποίηση και οξείδωση. Άλλες κιτρινωπές χρωστικές που έχουν απομονωθεί, προέρχονται από τις ανθοκυάνες με ακετοξικό οξύ (Jackson 2008).

4.2.3.5. Προϊόντα ξανθυλίου

Οι ανθοκυάνες και οι φλαβαν-3-όλες μπορούν, επίσης, να ενωθούν με γλυκοζυλικό οξύ, παράγοντας πορτοκαλοκιτρινα προϊόντα ξανθυλίου. Το γλυκοζυλικό οξύ είναι προϊόν της οξείδωσης του τρυγικού οξέος, καταλυόμενη από ιόντα μετάλλων. Τα προϊόντα ξανθυλίου ενώνονται με φλαβανόλες και σχηματίζουν περίπλοκες δομές ταννινών. Τέλος, το γλυκοζυλικό οξύ μπορεί να συμπυκνωθεί με προϊόντα υποβάθμισης των ανθοκυανών (π.χ. φλωρογλυκινόλες) και κατεχίνες, σχηματίζοντας επιπλέον κιτρινωπές χρωστικές (Jackson 2008).



Εικόνα 26: Δομή μορίου ξανθυλίου

4.2.4. Εξέλιξη του χρώματος

Ενώ τα φρέσκα κόκκινα κρασιά παίρνουν το χρώμα τους από τις ελεύθερες ανθοκυάνες, τα παλαιωμένα κρασιά δεν περιέχουν καθόλου ελεύθερες, αλλά πολυμερισμένες. Ένα μέρος τους αποδομήθηκε και ένα άλλο ενώθηκε με ταννίνες. Αν και η ένωση των ανθοκυανών είτε με ανθοκυάνες, είτε με ταννίνες, είτε με άλλες ενώσεις συμβαίνει στα πρώτα στάδια της εξέλιξης του χρώματος, κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης και μετά την ολοκλήρωσή της, η μακροχρόνια σταθερότητα του χρώματος οφείλεται στον επακόλουθο σχηματισμό πολυμερών μεταξύ ανθοκυανών και ταννινών.

Το ποσοστό του πολυμερισμού των ανθοκυανών με τις ταννίνες θεωρείται δείκτης της χημικής ηλικίας του κρασιού. Σε μερικά κρασιά εμφανίζεται υψηλό ποσοστό πολυμερισμού, χωρίς να έχει το κρασί τους οργανοληπτικούς χαρακτήρες του ώριμου και παλαιού κρασιού. Σε τέτοια περίπτωση, το ποσοστό πολυμερισμού υποδηλώνει το πρόωρο γέρασμα, δηλαδή μεγάλη χημική ηλικία που δεν είναι συμβατή με την πραγματική ηλικία του κρασιού. Έτσι, για ένα φρέσκο κρασί με έντονο χρώμα, που θα εξελιχθεί αργά κατά την αποθήκευση, χρειάζεται όχι μόνο να εκχυλιστούν κατά την οινοποίηση πολλές ανθοκυάνες και ταννίνες, αλλά και να αποθηκευτεί το κρασί σε συνθήκες που ευνοούν την ένωση ανθοκυανών και ταννινών, αλλά όχι τον έντονο και γρήγορο πολυμερισμό τους. Για αυτό επιβάλλεται παλαίωση σε δρύινα βαρέλια, απουσία ηλιακού φωτός και χαμηλές θερμοκρασίες. Εάν το φρέσκο κρασί δεν έχει επάρκεια ανθοκυανών ενωμένων

με ταννίνες, το χρώμα του θα έχει την τάση να αποκτήσει γρήγορα καστανοκίτρινες αποχρώσεις, λόγω πολυάριθμων διασπάσεων των ελεύθερων ανθοκυανών. Η προστασία που παρέχουν στις ανθοκυάνες οι ταννίνες, είναι συνάρτηση της ποσότητάς τους. Στην έλλειψη ταννινών οφείλεται το ευοξειδωτο του χρώματος των ροζέ κρασιών, και των κόκκινων κρασιών πρώιμης κατανάλωσης όταν έχουν παρασκευαστεί με τη μέθοδο της ανθρακικής αναεροβίωσης.

Κατά τη διάρκεια της προζυμωτικής εκχύλισης, σε περίπτωση που το γλεύκος δεν προστατεύεται, είναι πιθανό να παρατηρηθεί εν μέρει αποχρωματισμός, εξαιτίας της δράσης ενζύμων, οι οποίες περιλαμβάνουν διασπάσεις και οξειδώσεις. Το ζυμούμενο γλεύκος αποτελεί αναγωγικό περιβάλλον, συνεπώς κατά τη διάρκεια της ζύμωσης δεν μπορούν να πραγματοποιηθούν οξειδώσεις, αλλά αντίθετα, συμβαίνουν αντιδράσεις με τους διάφορους μεταβολίτες των ζυμών, οι οποίες οδηγούν στο σχηματισμό πορτοκαλόχρωμων ενώσεων. Οι άμεσες αντιδράσεις του σχηματισμού του συμπλόκου A-T, επίσης παράγουν άχρωμες ενώσεις, που αντιδρούν όταν γίνεται η αποστράγγιση του κρασιού, μετά την αλκοολική ζύμωση.

Κατά τη διάρκεια της μεταζυμωτικής εκχύλισης, το μέσο εξακολουθεί να είναι κορεσμένο σε διοξείδιο του άνθρακα και έτσι πραγματοποιείται ο άλλος μηχανισμός άμεσης αντίδρασης, δηλαδή συμπλόκων T-A, που οδηγεί στο σχηματισμό άχρωμων ή κόκκινων προϊόντων. Αυτό δεν συμβαίνει στην περίπτωση του αερισμού λόγω μικροοξυγόνωσης, ο οποίος οδηγεί κυρίως σε προϊόντα T-A μέσω αιθυλοδεσμών, που έχουν μωβ χρώμα. Οι σταθερές δομές ταννινών-ανθοκυανών μέσω αιθυλοδεσμών μετατρέπονται με διάφορους ρυθμούς σε πορτοκαλί ενώσεις, μέσω της δημιουργίας πολικών διπλών δεσμών των βινυλοπροκυανιδινών με ανθοκυάνες, προς σχηματισμό συμπλόκων προκυανιδινών-πυρανοανθοκυανών. Ο ρυθμός της μετατροπής αυτής εξαρτάται από την περιεκτικότητα του κρασιού σε φαινολικά συστατικά, από την προέλευση των ταννινών (φλοιοί ή γίγαρτα), και από τις φαινολικές δομές (συνδυασμού ταννινών-ανθοκυανών) που υπάρχουν στο τέλος της περιόδου παλαίωσης. Η παρουσία των πολυσακχαριτών παρεμποδίζει την εξέλιξη της αντίδρασης, η οποία εξαρτάται από τη θερμοκρασία. Επίσης, η μικροοξυγόνωση εμποδίζει τη δημιουργία των αναγωγικών οσμών και βελτιώνει το φρουτώδες άρωμα που γίνεται αντιληπτό μετά την αποστράγγιση (Συμεού 2010).

Όταν τα κρασιά παραμένουν προς ωρίμανση και παλαίωση σε βαρέλια, είναι καθοριστικές οι αλλαγές που γίνονται στο χρώμα των κρασιών. Οι αντιδράσεις με την ακεταλδεϋδη διευκολύνονται, αφού το βαρέλι επιτρέπει τη διείσδυση του οξυγόνου και έτσι το κρασί οξειδώνεται, ενώ παράλληλα απελευθερώνονται ελλαγιταννίνες που δρουν σαν συμπαράγοντες οξειδώσεως. Οι άμεσες αντιδράσεις σχηματισμού συμπλόκων T-A συμβαίνουν, επίσης, όταν η παλαίωση γίνεται σε αεριζόμενες δεξαμενές, και διασφαλίζεται ο ήπιος αερισμός που οδηγεί σε περιορισμένη οξυγόνωση. Τότε οι αντιδράσεις αυτές είναι πολύ αργές, εκτός και αν η θερμοκρασία είναι σχετικά υψηλή (>20 °C). Το χρώμα αυξάνεται λίγο και είναι πιθανή η δημιουργία κίτρινης χροιάς κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού. Το κρασί μπορεί επίσης να πάρει κίτρινες αποχρώσεις και στο βαρέλι, όταν η θερμοκρασία υπερβαίνει τους 20 °C. Όταν η οξείδωση γίνει με μεγάλη ταχύτητα είναι πιθανό να συμβούν αντιδράσεις διάσπασης των ανθοκυανών, με

συνέπεια την απώλεια χρώματος, που πιθανώς να ακολουθείται από το σχηματισμό γλυκοζυλικού οξέος και κίτρινων ξανθυλίων. Το τελικό αποτέλεσμα εξαρτάται από τις σχετικές ποσότητες των ανθοκυανών και των ταννινών του κρασιού.

Κατά τη διάρκεια της παλαίωσης σε φιάλη, η οποία χαρακτηρίζεται από πλήρη έλλειψη οξυγόνου, το χρώμα εξελίσσεται πολύ γρήγορα σε κεραμιδί και πορτοκαλί. Αυτή η τροπή εξαρτάται κυρίως από την περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά. Μια μακρά περίοδος παλαίωσης σε φιάλη περιλαμβάνει διάφορες αντιδράσεις οι οποίες συνεχίζονται μέχρι την ολοκλήρωση της εξέλιξης του κρασιού. Οι αντιδράσεις αυτές προκαλούν πολυμερισμό των ταννινών και των ανθοκυανών. Είναι επίσης πιθανό να σχηματιστούν μικκύλια τα οποία γίνονται υδρόφοβα και καθιζάνουν, ακόμα και αν οι πολυμερισμένες ταννίνες έχουν μέγεθος μικρότερο από 100 Å. Αυτά τα ασταθή κolloειδή παρατίθενται σε στοιβάδες, οι οποίες περιβάλλουν τα πλευρικά τοιχώματα των φιαλών. Εκτός από τις ταννίνες και τις ανθοκυάνες, κάλιο και σίδηρος είναι παρόντα, όπως και νιτρικά, και σε ορισμένες περιπτώσεις μικρές ποσότητες πολυσακχαριτών.

Εάν ένα φρέσκο κρασί τοποθετηθεί στο ψυγείο αμέσως μετά την ολοκλήρωση της μηλογαλακτικής ζύμωσης, γρήγορα θα αποκτήσει θολερότητα και θα σχηματιστεί ίζημα. Η εμφάνιση αυτού του ιζήματος είναι τελείως διαφορετική από αυτού που προκύπτει σε φιάλες παλαιωμένου κρασιού. Πρόκειται για ίζημα ζελατινώδες και έντονα λαμπερό κόκκινο με χαρακτηριστική στιλπνότητα. Είναι παρόμοιο με τα υπολείμματα που παραμένουν στα βαρέλια και τις δεξαμενές. Η σύνθεση αυτού του ιζήματος είναι σχετικά σταθερή: τρυγικά, ανθοκυάνες, ταννίνες και πολυσακχαρίτες. Η κατακρήμνιση του όξινου τρυγικού καλίου είναι γνωστό φαινόμενο. Η φυσικοχημική μεταβολή που συμβαίνει στο κρασί κατά την παλαίωση σε βαρέλι και σε φιάλη έγκειται στο σχηματισμό αυτής της κolloειδούς χρωστικής ουσίας, κυρίως κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού και στην κατακρήμνισή της κατά τη διάρκεια του χειμώνα. Το χαρακτηριστικό αυτό το έχουν όλα τα κρασιά, ορισμένα από αυτά σε μεγαλύτερο βαθμό, ειδικά όταν οι οινοποιητικές μέθοδοι προάγουν την έντονη εκχύλιση. Τα κρασιά έχουν επίσης περισσότερες κolloειδείς χρωστικές εάν τα σταφύλια από τα οποία προέρχονται έχουν προσβληθεί από σήψη, έχουν υπερθερμανθεί κατά τη διάρκεια ζύμωσης σε υψηλές θερμοκρασίες, ή έχουν υποστεί μηχανική κατεργασία (έντονο σπάσιμο, άντληση, ανακάτεμα κ.λπ.). Όλα αυτά οδηγούν σε αναγκαστική εκχύλιση είτε μη υδρολυόμενων πολυσακχαριτών από τους φλοιούς των σταφυλιών, είτε εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών από τους μύκητες. Αυτά τα κolloειδή είναι σχετικά ασταθή, ανάλογα με το μέγεθος του μορίου τους. Σχηματίζουν μια κolloειδή βάση για τις χρωστικές ουσίες και χρωματίζονται από τα φαινολικά συστατικά κατά την κατακρήμνιση. Ο βαθμός κατακρήμνισης επίσης εξαρτάται από την περιεκτικότητα του κρασιού σε αιθανόλη και τη θερμοκρασία αποθήκευσης (Συμεού 2010).

4.3. Μετρήσεις χρώματος και χρωματικοί δείκτες

Η εκτίμηση του χρώματος στα λευκά κρασιά γίνεται με τη μέτρηση της απορρόφησης στα 420 nm, που είναι το μήκος κύματος στο οποίο μετράται το κίτρινο χρώμα. Η ένδειξη στα 420 nm των λευκών κρασιών δείχνει το βαθμό οξειδωσής τους, όσο πιο οξειδωμένο είναι ένα λευκό κρασί, τόσο μεγαλύτερη είναι η απορρόφηση σε αυτό το μήκος κύματος (Συμεού 2010).

Το φάσμα των κόκκινων κρασιών παρουσιάζει ένα μέγιστο στα 520 nm, το οποίο ελαττώνεται με την παλαίωση, ενώ στα 420 nm παρουσιάζεται ένα ελάχιστο, που κατά την παλαίωση παραμένει σταθερό ή αυξάνεται. Το μέγιστο της απορρόφησης που παρουσιάζουν τα νέα κόκκινα κρασιά στα 520 nm οφείλεται στο καθαρό ερυθρό χρώμα των ελεύθερων ανθοκυανών υπό τη μορφή του φλαβυλίου. Με την πάροδο του χρόνου οι ανθοκυάνες καθιζάνουν ή σχηματίζουν σύμπλοκα με τις ταννίνες, τα οποία έχουν χρώμα καστανέρυθρο, οπότε επέρχεται μείωση της απορρόφησης σε αυτό το μήκος κύματος. Η απορρόφηση στα 420 nm, χαρακτηριστικό μήκος κύματος του κίτρινου χρώματος, οφείλεται κυρίως στις διάφορες μορφές ταννινών, το χρώμα των οποίων επικρατεί στα παλαιωμένα κρασιά.

Η ένταση του χρώματος και η απόχρωση, όπως ορίστηκαν από τον Sudrau (1958), λαμβάνουν υπόψη τους μόνο τη συνεισφορά του κόκκινου και του κίτρινου χρώματος. Τα αποτελέσματα αυτής της μερικής ανάλυσης λοιπόν δεν είναι δυνατό να αντικατοπτρίζουν το σύνολο της οπτικής αντίληψης του χρώματος του κρασιού. Η εφαρμογή του διεθνούς συστήματος εκτίμησης χρώματος CIELAB παρουσιάζει πλεονεκτήματα, αλλά το αποτέλεσμα εξακολουθεί να είναι δύσκολο στην ερμηνεία του για τους οινοπαραγωγούς.

Η επικρατούσα προσέγγιση στην ανάλυση του χρώματος γίνεται με τη μέθοδο Glories (1984) και περιλαμβάνει μετρήσεις της οπτικής πυκνότητας στα 420, στα 520, αλλά και στα 620 nm, προκειμένου να περιληφθεί και το μπλε χρώμα των νέων κόκκινων κρασιών, που οφείλεται στις ανθοκυάνες όταν αυτές βρίσκονται στη μορφή της άνυδρης βάσης.

Πιθανώς εξαιτίας της κολλοειδούς κατάστασης των χρωστικών ενώσεων δεν υπάρχει άμεση αναλογία μεταξύ της απορρόφησης και της διάλυσης. Συνεπώς, οι φασματοφωτομετρικές μετρήσεις θα πρέπει να πραγματοποιούνται σε κυψελίδα πάχους 1 mm, με τη χρήση αδιάλυτου κρασιού. Με τον τρόπο αυτό υπολογίζονται οι τιμές που περιγράφουν το χρώμα του κρασιού.

Η χρωματική ένταση (CI) αντιπροσωπεύει την ποσότητα του χρώματος και παρουσιάζει μεγάλη διαφοροποίηση μεταξύ των διάφορων ποικιλιών. Προκύπτει από το άθροισμα των οπτικών πυκνοτήτων στα 420, 520 και 620 nm. Τιμές έντασης από 0-6 χαρακτηρίζουν ανοιχτόχρωμα κρασιά, από 6-10 μέτρια κόκκινα κρασιά και από 10 και πάνω βαθιά κόκκινα κρασιά.

Η απόχρωση (T) αντιπροσωπεύει την εξέλιξη του χρώματος προς το πορτοκαλί. Τα νέα κρασιά παρουσιάζουν τιμές απόχρωσης της τάξης του 0.5-0.7, οι οποίες αυξάνονται με την παλαίωση, φθάνοντας στα ανώτατα όρια που κυμαίνονται στο 1.2-1.3. Η τιμή της απόχρωσης προκύπτει από το πηλίκο των οπτικών πυκνοτήτων στα 420 προς τα 520 nm (Συμεού 2010).

5. Υλικά και μέθοδοι

5.1. Διαδικασίες οινοποιήσεων και σχεδιασμός πειραμάτων

5.1.1. Διαδικασίες οινοποιήσεων

Στη παρούσα εργασία μελετήθηκαν δύο λευκά κρασιά της ίδιας ποικιλίας (Μοσχοφίλερο) και δύο κόκκινα (Merlot και Αγιωργίτικο). Στη μία λευκή οινοποίηση και στις δύο ερυθρές τα στεμφύλα παρέμειναν στη δεξαμενή οινοποίησης (οινοποιητής) για όσο χρονικό διάστημα κρίθηκε αναγκαίο, οπότε και πραγματοποιήθηκε εκχύλιση των φαινολικών συστατικών. Κατά τη διάρκεια της παραμονής των στεμφύλων στη δεξαμενή λαμβάνονταν δείγματα, τα οποία αποτελούνταν μόνο από γλεύκος, χωρίς την παρουσία των στεμφύλων. Τα δείγματα των λευκών κρασιών καθώς και του Merlot προήλθαν από το οινοποιείο της οικογένειας Παναγόπουλου, το οποίο εδρεύει στην περιοχή της Μαντινείας στην Αρκαδία, ενώ τα δείγματα του Αγιωργίτικου ελήφθησαν από το τμήμα Οινολογίας και Τεχνολογίας Ποτών του Α.Τ.Ε.Ι. Αθηνών. Η διαδικασία κάθε οινοποίησης, καθώς και κάποια χαρακτηριστικά του κρασιού που προέκυψε, αναφέρονται στη συνέχεια. Όλες οι δειγματοληψίες κατά τη διάρκεια της εκχύλισης γίνονταν μετά την ανάδευση του σταφυλοπολτού. Δείγματα ελήφθησαν σε τακτά χρονικά διαστήματα μέχρι το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης. Όλες οι δειγματοληψίες ήταν διπλές.

5.1.1.1. Κλασική οινοποίηση ποικιλίας Μοσχοφίλερου

Μετά την αποβοστρύχωση και την έκθλιψη των ραγών του σταφυλιού, ο σταφυλοπολτός οδηγήθηκε στο πνευματικό πιεστήριο, απ' όπου λήφθηκε ο πρόρρωγος και οι τρεις πρώτες πιέσεις. Το γλεύκος συλλέχθηκε σε δεξαμενή χωρητικότητας 60 hL, η οποία συμπληρώθηκε την επόμενη μέρα. Στο γλεύκος προστέθηκαν 5 g/hL θειώδους ανυδρίτη (SO₂) και η θερμοκρασία ζύμωσης του ρυθμίστηκε στους 17 °C. Το γλεύκος εμβολιάστηκε με 16.7 g/hL ζύμης BLASTOSEL TERROIR [Perdomini, San Martino Buon Albergo, Italy] και έγινε προσθήκη 16.7 g/hL θρεπτικών ACTIBIOL της ίδιας εταιρίας. Μετά από 23 ημέρες, αφού τελείωσε η αλκοολική ζύμωση, έγινε η μετάγγιση για την απομάκρυνση της οινολάσπης, προστέθηκαν 5 g/hL SO₂ και αποθηκεύτηκε σε ανοξειδωτή δεξαμενή. Η ολική οξύτητά του φρέσκου κρασιού ήταν 7.43 g/L (εκφρασμένη σε τρυγικό οξύ), το pH του 3.23, και ο αλκοολικός του τίτλος 11.8% vol.

5.1.1.2. Οινοποίηση ποικιλίας Μοσχοφίλερου με προζυμωτική εκχύλιση

Η διαδικασία ξεκίνησε με την εισαγωγή των σταφυλιών στον αποβοστρυχωτή για την αποβοστρύχωση και την έκθλιψη των ραγών τους. Ο σταφυλοπολτός που προέκυψε (περίπου 45 hL) εισήλθε στον οινοποιητή και ακολούθησε η προσθήκη 5 g/hL SO₂. Για την επίτευξη της προζυμωτικής εκχύλισης, ο σταφυλοπολτός παρέμεινε στον οινοποιητή για 6 ώρες στους 10 °C, όπου και αναδευόταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Στις 6 ώρες εκχύλισης παρατηρήθηκε μία ελαφρά ερυθρωπή χροιά στο γλεύκος, γεγονός που υποδηλώνει την έναρξη εκχύλισης ανθοκυανών από τους φλοιούς της ράγας του Μοσχοφίλερου. Για το λόγο αυτό, η εκχύλιση σταμάτησε και ο σταφυλοπολτός μεταφέρθηκε στο πιεστήριο, απ' όπου και λήφθηκε μόνο γλεύκος εκροής (περίπου 30 hL). Στο γλεύκος προστέθηκαν επιπλέον 2.2 g/hL SO₂ και η

θερμοκρασία ζύμωσής του ρυθμίστηκε στους 17 °C. Η δεξαμενή εμβολιάστηκε με 16.7 g/hL ζύμης BLASTOSEL TERROIR [Perdomini, San Martino Buon Albergo, Italy] και έγινε προσθήκη 16.7 g/hL θρεπτικών ACTIBIOL της ίδιας εταιρίας. Μετά από 25 ημέρες, αφού τελείωσε η αλκοολική ζύμωση, έγινε η μετάγγιση του κρασιού για την απομάκρυνση της οινολάσπης, προστέθηκαν 5 g/hL SO₂ και το κρασί αποθηκεύτηκε σε ανοξειδωτή δεξαμενή. Η ολική οξύτητά του φρέσκου κρασιού ήταν 7.58 g/L (εκφρασμένη σε τρυγικό οξύ), το pH του 3.27, και ο αλκοολικός του τίτλος 12.4% vol.

5.1.1.3. Ερυθρή οινοποίηση ποικιλίας Merlot

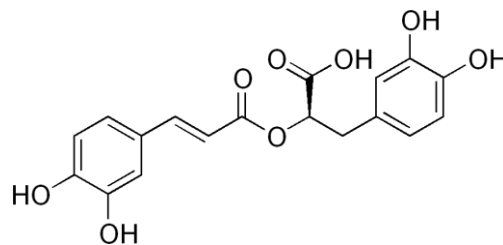
Μετά την αποβοστρύχωση και την έκθλιψη των ραγών του σταφυλιού στον αποβοστρυχωτή, ο σταφυλοπολτός (περίπου 30 hL) εισήλθε στον οινοποιητή, όπου προστέθηκαν 5 g/hL SO₂. Καθ' όλη τη παραμονή του σταφυλοπολτού στον οινοποιητή, γινόταν διαβροχή της στερεάς φάσης του σταφυλοπολτού, όταν ήταν αναγκαίο, μέσω του πιάτου διαβροχής, για την καλύτερη επαφή των στεμφύλων με το γλεύκος. Το γλεύκος εμβολιάστηκε με 16.7 g/hL ζύμης BLASTOSEL GRAND CRU [Perdomini, San Martino Buon Albergo, Italy] και έγινε προσθήκη 16.7 g/hL θρεπτικών ACTIBIOL της ίδιας εταιρίας. Η εκχύλιση διήρκησε 5 ημέρες και πραγματοποιήθηκε στους 18 °C. Ύστερα, απομακρύνθηκαν τα στέμφυλα από το γλεύκος, και το γλεύκος εκροής συλλέχθηκε σε ανοξειδωτή δεξαμενή χωρητικότητας 15 hL, όπου δεν ήταν εφικτή η ρύθμιση της θερμοκρασίας ζύμωσης. Μετά από την πάροδο 22 ημερών, αφού τελείωσε η αλκοολική ζύμωση, έγινε η απολάσπωση, το κρασί θειώθηκε με 6.5 g/hL SO₂ και αποθηκεύτηκε σε ανοξειδωτή δεξαμενή. Δεν πραγματοποιήθηκε ελεγχόμενη μηλογαλακτική ζύμωση. Η ολική οξύτητά του φρέσκου κρασιού ήταν 7.7 g/L (εκφρασμένη σε τρυγικό οξύ), το pH του 3.38, και ο αλκοολικός του τίτλος 12.8% vol. Η οξύτητά του ρυθμίστηκε, ύστερα από προσθήκη όξινου ανθρακικού καλίου, στα 5.3 g/L και το pH του προέκυψε 3.63. Σε αυτό το κρασί δεν πραγματοποιήθηκε μηλογαλακτική ζύμωση, και επίσης δεν προστέθηκαν ούτε πηκτινολυτικά ένζυμα κατά την εκχύλιση ούτε οινολογικές ταννίνες.

5.1.1.4. Ερυθρή οινοποίηση ποικιλίας Αγιωργίτικου

Μετά την αποβοστρύχωση και την έκθλιψη των ραγών του σταφυλιού στον αποβοστρυχωτή, ο σταφυλοπολτός εισήλθε στον οινοποιητή όπου και προστέθηκαν 6 g/hL SO₂. Η περιεκτικότητα του γλεύκους σε σάκχαρα ήταν 12.4 Baumè. Ακολούθησε ο εμβολιασμός με 25 g/hL με τη ζύμη Lalvin Rhône2323 της εταιρίας Laffort και η προσθήκη αμμωνιακών αλάτων Vitamine 2 10 g/L. Επίσης, προστέθηκαν ταννίνες Tannin VR supnâ 20 g/hL της εταιρίας Laffort και Oak powder 200 g/hL. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν πηκτινολυτικά 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.

5.1.2. Προσθήκη εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών σε φρέσκο κρασί

Την πρώτη ύλη αποτέλεσε φρέσκο κόκκινο κρασί (περίπου 1.5 με 2 μήνες μετά το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης) της ποικιλίας Merlot. Σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης ήταν η προσθήκη εκχυλισμάτων δύο διαφορετικών αρωματικών φυτών σε φρέσκο κρασί, ώστε να μελετηθεί η επίδραση των συστατικών των εκχυλισμάτων στο φαινόμενο του σχηματισμού έγχρωμων συμπλόκων (copigmentation), μεταξύ ανθοκυανών και άλλων ενώσεων (cofactors). Χρησιμοποιήθηκαν δύο αρωματικά φυτά, η *Satureja thymbra* (θρούμπι) και η *Origanum vulgare* ssp. *Hirtum* (ρίγανη) λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε κινναμωμικά οξέα, κυρίως ροσμαρινικό οξύ (Εικόνα 27), αλλά και φλαβονοειδή συστατικά. Και οι δύο αυτές κατηγορίες φαινολικών συστατικών βιβλιογραφικά αποτελούν συστατικά τα οποία μπορούν να συμμετάσχουν στο φαινόμενο σχηματισμού έγχρωμων συμπλόκων (He et al. 2012). Τα εκχυλίσματα παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων, στα πλαίσια άλλων διπλωματικών και η σύστασή τους δίνεται και σχολιάζεται στο επόμενο κεφάλαιο.



Εικόνα 27: Ροσμαρινικό οξύ

Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν τρία δοκιμαστικά πειράματα ώστε να μελετηθεί η επίδραση της συγκέντρωσης των ανθοκυανών στο φαινόμενο σχηματισμού έγχρωμων συμπλόκων, καθώς και η επίδραση πρόσθετων συστατικών σε αυτό το φαινόμενο. Έτσι, παρασκευάστηκε ρυθμιστικό διάλυμα 0.25% όξινου τρυγικού καλίου ($\text{KC}_4\text{H}_5\text{O}_6$), περιεκτικότητας 12.5% (v/v) σε αιθανόλη και ρυθμίστηκε το pH του στο 3.6 με προσθήκη τρυγικού οξέος ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$). Μέσα σε αυτό, προστέθηκαν αποξηραμένοι φλοιοί ράγας σταφυλιού της ελληνικής ερυθρής ποικιλίας Μαυροκουντούρα (*Vitis vinifera*). Το διάλυμα εκτέθηκε για 5 min σε υπερήχους, για την γρήγορη εκχύλιση των ανθοκυανών, ενώ ακολούθησε φυγοκέντρωση για την απομάκρυνση των στερεών μερών. Για τη μελέτη της επίδρασης της συγκέντρωσης των ανθοκυανών στο φαινόμενο σχηματισμού έγχρωμων συμπλόκων, παρασκευάστηκαν εκχυλίσματα φλοιών διαφορετικών συγκεντρώσεων ανθοκυανών (από 95 έως 950 ppm, όπως μετρήθηκαν με την φασματοφωτομετρική μέθοδο), αλλά με σταθερή περιεκτικότητα ροσμαρινικού οξέος ίση με 672 ppm. Για την μελέτη των πρόσθετων συστατικών στο φαινόμενο του σχηματισμού έγχρωμων συμπλόκων, προστέθηκαν ροσμαρινικό οξύ και εκχύλισμα ρίγανης σε εκχυλίσματα φλοιών. Κατά την προσθήκη του ροσμαρινικού οξέος παρασκευάστηκαν διαλύματα εκχυλίσματος φλοιών με συγκέντρωση ανθοκυανών 123.3 ± 1.6 ppm και συγκέντρωση καθαρού ροσμαρινικού οξέος από 0 έως 350 ppm. Κατά την προσθήκη του αιθανολικού εκχυλίσματος της ρίγανης, παρασκευάστηκαν διαλύματα εκχυλίσματος φλοιών με περιεκτικότητα σε ανθοκυανές 172.5 ± 1.6 ppm, αλλά με διαφορετική συγκέντρωση σε εκχύλισμα ρίγανης από 0 έως 490 ppm. Η προσθήκη του εκχυλίσματος της ρίγανης έγινε με βάση την περιεκτικότητά του σε ολικά φαινολικά εκφρασμένα σε ppm GAE. Το αιθανολικό εκχύλισμα του αρωματικού φυτού προστέθηκε, αφού πρώτα είχε εξατμιστεί όλος ο διαλύτης, καθώς η αιθανόλη αποτελεί παράγοντα που επηρεάζει το φαινόμενο του σχηματισμού έγχρωμων συμπλόκων (González-Manzano et al. 2008, Hermosín-

Gutiérrez 2003). Θα ακολουθήσει αναλυτικότερη περιγραφή της διαδικασίας προσθήκης του εκχυλίσματος του αρωματικού φυτού στο κρασί παρακάτω.

Στη συνέχεια, ενσωματώθηκαν στο φρέσκο κρασί εκχυλίσματα της *Satureja thymbra*. Αρχικά, ενσωματώθηκε το υδατικό εκχύλισμα από θρούμπι, το οποίο παραλήφθηκε ως υπόλειμμα μετά την απόσταξη του φυτού, για την παραλαβή του ελαίου. Το εκχύλισμα αυτό λυοφιλώθηκε, ώστε να απομείνει ξηρή σκόνη και να προστεθεί στο κρασί. Στη συνέχεια, ενσωματώθηκε στο κρασί το αιθανολικό εκχύλισμα από θρούμπι. Το εκχύλισμα αυτό είχε πράσινο χρώμα, άρα κρίθηκε απαραίτητη η διαβίβασή του μέσα από στήλη ενεργού άνθρακα Bond Elute Carbon (250 mg, 6 mL, Agilent Technologies, Santa Clara, California) για απομάκρυνση των χλωροφυλλών. Η στήλη ξεπλενόταν με καθαρή αιθανόλη συχνά, ώστε να ανακτηθούν τυχόν φαινόλες που είχαν κρατηθεί. Έπειτα, ενσωματώθηκε στο κρασί αιθανολικό εκχύλισμα ρίγανης, ακολουθώντας την ίδια διαδικασία.

Τελικά, για τον εμπλουτισμό του κρασιού και την μελέτη του φαινομένου του σχηματισμού έγχρωμων συμπλόκων κατά την αποθήκευση επιλέχθηκαν τα δύο αιθανολικά εκχυλίσματα των αρωματικών φυτών (θρούμπι και ρίγανη). Η προσθήκη έγινε με βάση τα ολικά φαινολικά των εκχυλισμάτων. Για να επιτευχθεί αυτό, στο άνευ χλωροφυλλών αιθανολικό εκχύλισμα, μετά την εξάτμιση του διαλύτη υπό κενό, προστέθηκε συγκεκριμένη ποσότητα φρέσκου κρασιού, ώστε το τελικό κρασί να είναι εμπλουτισμένο κατά 700 ppm ολικών φαινολικών, εκφρασμένων σε ισοδύναμα ppm γαλλικού οξέος (GAE).

Για να εξαχθούν σωστά συμπεράσματα από αυτή τη μελέτη, κρίθηκε αναγκαία η ύπαρξη και ενός κρασιού εμπλουτισμένου με μία πρότυπη ουσία, η οποία περιέχεται στο θρούμπι και στην ρίγανη. Έτσι, επιλέχθηκε το ροσμαρινικό οξύ και έγινε προσθήκη 709.7 ppm καθαρού ροσμαρινικού οξέος. Τα τρία αυτά εμπλουτισμένα κρασιά που παρασκευάστηκαν, μαζί με το αρχικό φρέσκο κρασί (control) αποτελούν τις 4 σειρές δειγμάτων. Αποθηκεύτηκαν σε συσκευασίες πολυστρωματικού υλικού συσκευασίας (OPP 20 μm/ink/adhesive/PET MET 12 μm/adhesive//PE 75 μm STC) ανά 25 mL, σε ατμόσφαιρα CO₂-N₂ σε αναλογία 1:1.

5.2. 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)
- Συσκευή Λυοφιλίωσης (Freeze Dry): Christ, Alpha 1-4 LD plus
- Φυγόκεντρος: Thermo Scientific, Heraeus Megafuge 16R Centrifuge
- Λουτρό Υπερήχων (Sonication): Elma, S30H Elmasonic

- Περιστροφικός Εξατμιστής Κενού (Rotavapor) Büchi, RE 111 με ενσωματωμένο υδρόλουτρο Büchi 461 της Büchi Laboratories Technik
- Φασματοφωτόμετρο: HITACHI U29000
- Χρωματομέτρο: Konica Minolta, CR-200 JAPAN
- LC-MS: Varian 500 MS Ion Trap Spectrometer, Varian
- Συσκευασία σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (MAP): Boss M. Typ NT42N

5.3. Αναλυτικές μέθοδοι

5.3.1. Προσδιορισμός ολικών φαινολικών και επιμέρους ομάδων

5.3.1.1. Μέθοδος 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 μ L κατάλληλα αραιωμένου δείγματος κρασιού/γλεύκου προστίθενται σε 7.9 mL απιονισμένου νερού. Ακολουθεί η προσθήκη 500 μ L 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 Na_2CO_3 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 μ L 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 ppm 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 ppm GAE).

Η καμπύλη αναφοράς του γαλλικού οξέος έχει εξίσωση $\text{ABS} = 0.0012 \cdot C - 0.0044$ και $R^2 = 0.9982$, όπου C η συγκέντρωση του διαλύματος σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος και ABS η αντίστοιχη απορρόφηση. Η καμπύλη αναφοράς έχει ακρίβεια για απορροφήσεις από 0.050 έως 0.600.

5.3.1.2. Φασματοφωτομετρική μέθοδος

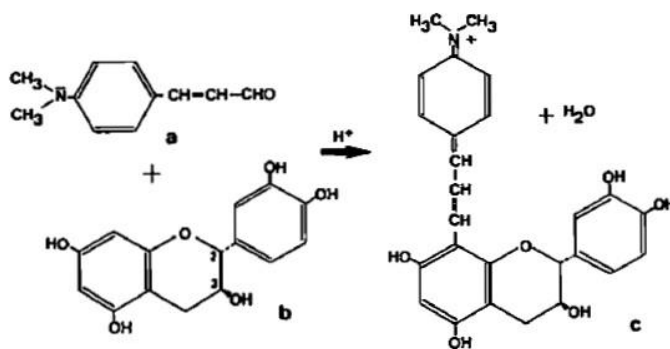
Οι ολικές ανθοκυάνες, οι φλαβονόλες και οι τρυγικοί εστέρες προσδιορίστηκαν με φασματομετρία UV-VIS, έπειτα από ρύθμιση του pH, στα αντίστοιχα μέγιστα απορρόφησης των χαρακτηριστικών ομάδων (Cliff 2007).

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 ppm μονογλυκοζιτη-3-μαλβιδίνης (mν-3-glc), που προκύπτουν από την καμπύλη αναφοράς, η χάραξη της οποίας γίνεται με διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων (25 - 50 - 100 - 150 - 200 ppm Mν-3-glc). Οι φλαβονόλες έχουν μέγιστο απορρόφησης τα 360 nm και εκφράζονται ως ισοδύναμα ppm κερκετίνης (quercetin), με καμπύλη αναφοράς διαλυμάτων γνωστών συγκεντρώσεων (50 - 100 - 150 - 200 - 250 ppm quercetin). Οι τρυγικοί εστέρες έχουν μέγιστο απορρόφησης τα 320 nm και εκφράζονται ως ισοδύναμα ppm καφεϊκού οξέος (caffeic acid), με καμπύλη αναφοράς διαλυμάτων γνωστών συγκεντρώσεων (10 - 20 - 40 - 60 - 80 - 100 ppm caffeic acid).

Η καμπύλη αναφοράς του μονογλυκοζιτη-3-μαλβιδίνης έχει εξίσωση $\text{ABS} = 0.0013 \cdot C - 0.0078$ και $R^2 = 0.9998$ και ακρίβεια για απορροφήσεις από 0.025 έως 0.270. Η καμπύλη αναφοράς της κερκετίνης έχει εξίσωση $\text{ABS} = 0.003 \cdot C + 0.0147$ και $R^2 = 0.9985$ και ακρίβεια για απορροφήσεις από 0.150 έως 0.750. Η καμπύλη αναφοράς του καφεϊκού οξέος έχει εξίσωση $\text{ABS} = 0.0047 \cdot C - 0.0003$ και $R^2 = 0.9999$ και ακρίβεια για απορροφήσεις από 0.050 έως 0.500.

5.3.2. Προσδιορισμός φλαβαν-3-ολών

Οι ολικές φλαβαν-3-όλες προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της *p*-dimethylaminocinnamaldehyde (DMACA). Η συγκεκριμένη μέθοδος, έχει ένα σημαντικό πλεονέκτημα σε σχέση με την κλασσική μέθοδο της βανιλίνης, αφού δεν έχει παρεμβολές από τις ανθοκυάνες. Επιπλέον, παρέχει υψηλή ευαισθησία και εκλεκτικότητα. Η αντίδραση γίνεται στον Α δακτύλιο των κατεχινών όπως φαίνεται στην Εικόνα 28 (Arnous 2002).



Εικόνα 28: Αντίδραση συμπύκνωσης του αντιδραστήριου DMACA (a) με (+)-κατεχίνη (b) και προϊόν την έγχρωμη ένωση (c)

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 ppm 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 ppm catechin). Η καμπύλη αναφοράς της κατεχίνης έχει εξίσωση $ABS = 0.0434 \cdot C + 0.0368$ και $R^2 = 0.993$ και ακρίβεια για απορροφήσεις από 0.050 έως 0.700.

5.3.3. Προσδιορισμός συμπλοκοποιημένων ανθοκυανών

Η μέθοδος αυτή προσδιορίζει το ποσοστό του χρώματος που οφείλεται στα έγχρωμα σύμπλοκα, στις πολυμερισμένες και τις ελεύθερες ανθοκυάνες. Σύμφωνα με τη μέθοδο, ετοιμάζονται 3 δείγματα. Το πρώτο δείγμα είναι κρασί αραιωμένο με ρυθμιστικό, το δεύτερο περιέχει κρασί με περίσσεια SO_2 , και το τρίτο περίσσεια ακεταλδεϋδης. Όταν αραιώνεται το κρασί με κάποιο πρότυπο ρυθμιστικό, τα φαινόμενα συμπλοκοποίησης παύουν να υφίστανται, και τα συστατικά του συμπλόκου επανέρχονται στην ελεύθερη μορφή τους. Επομένως, με την απορρόφηση του αραιωμένου κρασιού (A^{20}) μετριέται το χρώμα που οφείλεται στις ελεύθερες και πολυμερισμένες ανθοκυάνες, χωρίς να υπάρχουν έγχρωμα σύμπλοκα. Ο θειώδης ανυδρίτης αποχρωματίζει και τις ελεύθερες ανθοκυάνες και τα έγχρωμα σύμπλοκα. Μόνο οι πολυμερισμένες μπορούν να αντισταθούν σε αυτή την αλλαγή χρώματος. Επομένως, με την απορρόφηση του κρασιού με περίσσεια θειώδη ανυδρίτη (A^{SO_2}) μετριέται το χρώμα που οφείλεται μόνο στις πολυμερισμένες ανθοκυάνες. Κατά τη προσθήκη ακεταλδεϋδης στο κρασί, η ακεταλδεϋδη δεσμεύει το διοξειδίο του θείου, και έτσι αποδεσμεύονται όλες οι ανθοκυάνες, και οι ελεύθερες και οι συμπλοκοποιημένες. Άρα, με αυτή την απορρόφηση (A^{acet}) μετριέται το ολικό χρώμα του κρασιού, που οφείλεται στις ελεύθερες, συμπλοκοποιημένες και πολυμερισμένες ανθοκυάνες.

Το μέρος του χρώματος που οφείλεται στα έγχρωμα σύμπλοκα είναι $(A^{acet}-A^{20})/A^{acet}$. Δηλαδή, με αυτόν τον τρόπο υπολογίζεται η ενίσχυση του χρώματος που προκαλεί το σύμπλοκο σε σχέση με τις ίδιες ανθοκυάνες αν ήταν ελεύθερες. Το χρώμα που οφείλεται στις ελεύθερες ανθοκυάνες, είναι $(A^{20}-A^{SO_2})/A^{acet}$, και αυτό που οφείλεται στις πολυμερισμένες είναι A^{SO_2}/A^{acet} . Επίσης, εκτιμάται και ο παράγοντας συμπλοκοποίησης, που εκφράζει την περιεκτικότητα των συστατικών που συμπλοκοποιούνται με τις ανθοκυάνες στο κρασί, και υπολογίζεται από τον μέσο όρο των απορροφήσεων στα 365 nm των δειγμάτων με ακεταλδεϋδη και με αραιωμένο κρασί. (Boulton 2001).

Η μέθοδος αυτή απαιτεί την ρύθμιση του pH στο 3.6. Το κρασί είχε ήδη pH ίσο με 3.6, άρα δεν έγινε κάποια επιπλέον ενέργεια. Αρχικά το κρασί πρέπει να φιλτράρεται με φίλτρο μεγέθους πόρων 0.45 μm. Επειδή τα εμπλουτισμένα κρασιά περιείχαν αιωρήματα, το πέρασμα μέσα από το φίλτρο, εκτός του ότι ήταν δύσκολο, κατακρατούσε και ένα ποσό ανθοκυανών. Άρα, το κρασί φιλτραριζόταν με απλό διηθητικό χαρτί, και το αρχικό διήθημα απομακρυνόταν. Η πειραματική διαδικασία περιείχε την παρασκευή τριών δειγμάτων. Στο πρώτο δείγμα περιέχονται 100 μL κρασιού και 1900 μL ρυθμιστικού διαλύματος (0.25% όξινο τρυγικό κάλιο σε 12% αιθανολικό διάλυμα σε pH 3.6.). Φωτομετράται στα 520 nm και στα 365 nm σε κυψελίδα πάχους 10 mm. Στο δεύτερο δείγμα περιέχονται 160 μL διαλύματος 5% SO_2 και 2mL κρασιού. Φωτομετράται στα 520 nm σε κυψελίδα 10 mm ή 1 mm, ανάλογα με την απορρόφηση. Στο τρίτο δείγμα περιέχονται 20μL διαλύματος 10% ακεταλδεϋδης και 2 mL κρασιού. Αφήνεται σε ηρεμία για 45 min και ύστερα

μετρίεται η απορρόφηση στα 520nm και 365 nm με κυψελίδα πάχους 1mm. Ως τυφλό δείγμα, χρησιμοποιείται αιθανολικό διάλυμα 12.5% v/v.

5.3.4. Ανάλυση φαινολικών ενώσεων μέσω HPLC

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. 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. Όσον αφορά την ποσοτικοποίηση στον ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων έγινε για τις ανθοκυάνες στα 520 nm σε ισοδύναμα γλυκοζίτη-3 της μαλβιδίνης, για τις φλαβονόλες στα 360 nm σε ισοδύναμα κερκετίνης και για τα κινναμωμικά οξέα σε 320 nm σε ισοδύναμα καφεϊκού οξέος.

5.3.5. Προσδιορισμός χρώματος

5.3.5.1. Φασματοφωτομετρική μέθοδος

Σύμφωνα με τη μέθοδο μετρίεται η απορρόφηση του κρασιού στα 420, 520 και 620 nm. Επειδή δεν υπάρχει κάποια συγκεκριμένη αναλογία μεταξύ του χρώματος των κρασιών και της αραιώσης, 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).

Από τις τρεις αυτές απορροφήσεις προκύπτουν οι δείκτες:

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

$$CI = OD\ 420 + OD\ 520 + OD\ 620$$

- Απόχρωση (T), που δείχνει την πορεία του χρώματος προς το πορτοκαλί

$$T = \frac{OD\ 420}{OD\ 520}$$

- Σύνθεση χρώματος, που είναι τα ποσοστά των τριών χρωμάτων στο κρασί (σε άθροισμα 100%)
- 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 του δείκτη αυτού δίνεται από τον τύπο:

$$dA\% = \left(1 - \frac{OD\ 420 + OD\ 620}{2 \cdot OD\ 520}\right) \cdot 100$$

5.3.5.2. Προσδιορισμός μέσω χρωματόμετρου CIELAB

Οι μετρήσεις του χρώματος έγιναν με το χρωματόμετρο CR-200 της Konica Minolta. Το χρώμα των κρασιών μετρήσαν σε γυάλινα δισκία διαμέτρου περίπου 3 cm και ύψους περίπου 1 cm, όπου γεμίζονταν με 4 mL κρασιού. Στο χρωματόμετρο κάθε φορά γινόταν βαθμονόμηση στο λευκό χρώμα. Με βάση της παραμέτρους L^* , a^* και b^* που προέκυψαν, υπολογίστηκαν τα μεγέθη:

ΔE^* : η ολική μεταβολή του χρώματος, υπολογίζεται από τον παρακάτω τύπο και εκφράζεται σε μονάδες CIELAB.

$$\Delta E^* = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}}$$

h^* : η χροιά (hue angle), η οποία μετριέται σε μοίρες και υπολογίζεται από τον τύπο:

$$h^* = \tan^{-1}\left(\frac{b^*}{a^*}\right), \text{ για } a^*, b^* > 0$$

6. Αποτελέσματα – Συζήτηση

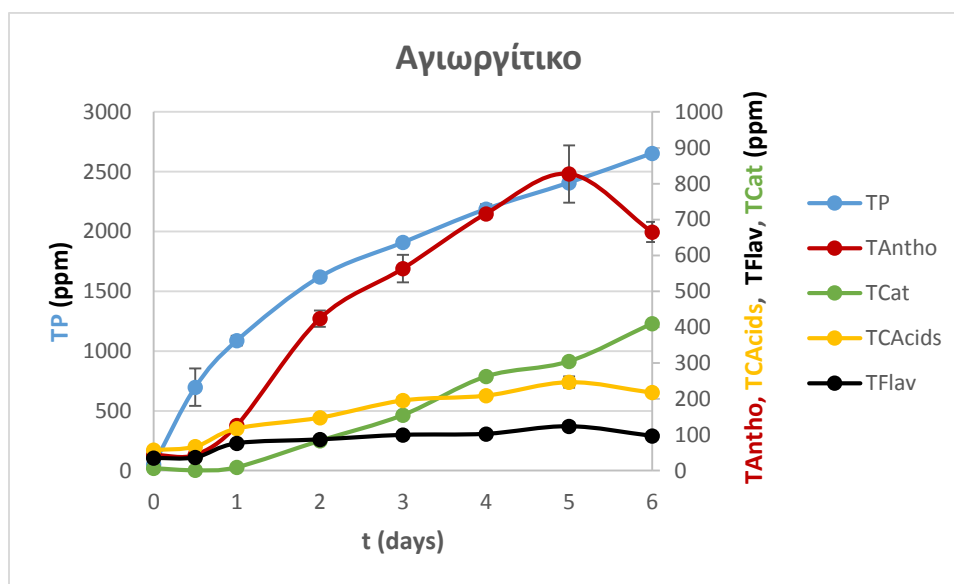
6.1. Α' Μέρος: Μεταβολές κατά την οινοποίηση

6.1.1. Εκχύλιση φαινολικών ενώσεων

Στο παρόν κεφάλαιο θα παρουσιαστούν και θα σχολιασθούν τα αποτελέσματα της εκχύλισης των επιμέρους φαινολικών ομάδων, καθώς και των ολικών φαινολών, από τα στέμφυλα προς το γλεύκος, για όλες τις οινοποιήσεις. Η εκχύλιση (παραμονή των στεμφύλων στο γλεύκος) στην ποικιλία του Αγιωργίτικου διήρκησε 6 ημέρες, στην ποικιλία Merlot 5 ημέρες, ενώ στη λευκή ποικιλία του Μοσχοφίλερου η προζυμωτική κρυσταλλοποίηση διήρκησε 6 ώρες.

6.1.1.1. Αγιωργίτικο

Στο Διάγραμμα 1 παρουσιάζεται η εκχύλιση των επιμέρους φαινολικών ομάδων (ανθοκυάνες, φλαβαν-3-όλες, τρυγικοί εστέρες των κινναμωμικών οξέων και φλαβονόλες) καθώς και των ολικών φαινολικών κατά την ερυθρή οινοποίηση της ποικιλίας Αγιωργίτικο. Η εκχύλιση διήρκησε 6 ημέρες, χωρίς την δυνατότητα ρύθμισης της θερμοκρασίας, ενώ υπήρξε προσθήκη πηκτινολυτικών ενζύμων.



Διάγραμμα 1: Εκχύλιση επιμέρους φαινολικών ομάδων και ολικών φαινολικών κατά την ερυθρή οινοποίηση της ποικιλίας Αγιωργίτικο (TP: ολικό φαινολικό φορτίο (ισοδύναμο γαλλικού οξέος), TAntho: ανθοκυάνες (ισοδύναμο γλυκοζίτη-3 μαλβιδίνης), TCat: φλαβαν-3-όλες (ισοδύναμο κατεχίνης), TCAcids: τρυγικοί εστέρες (ισοδύναμο καφεϊκού οξέος), TFlav: φλαβονόλες (ισοδύναμο κερκετίνης))

Η εκχύλιση των πολυφαινολών κατά την οινοποίηση επηρεάζεται πρωταρχικά από την χρονική διάρκεια της διεργασίας. Έτσι, η μέγιστη συγκέντρωση των ολικών φαινολικών παρατηρήθηκε την 6^η ημέρα, δηλαδή στο τέλος της εκχύλισης, και ήταν ίση με 2654 ± 6 ppm.

Προφανώς, η συγκέντρωση των ολικών φαινολών είναι συνάρτηση της εκχύλισης των επιμέρους φαινολικών ομάδων. Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 1 οι ανθοκυάνες εκχυλίζονται άμεσα, κατά τις πρώτες κιόλας ώρες της οινοποίησης μετά την έκθλιψη, αφού είναι ευδιάλυτες και σε υδατικά διαλύματα και βρίσκονται αποκλειστικά στα χυμοτόπια των κυττάρων των φλοιών, στις τρεις με τέσσερις εξωτερικές σειρές κυττάρων, από όπου διαχέονται εύκολα στο γλεύκος, αμέσως μόλις υποστούν πλασμόλυση τα κύτταρα (Κουράκου - Δραγώνα 1998). Η μέγιστη συγκέντρωσή τους παρατηρήθηκε την 5^η ημέρα και ισούταν με 827 ± 80 ppm. Η απότομη μείωσή τους την 6^η ημέρα, ίσως δικαιολογείται από το γεγονός ότι το δείγμα αυτής της ημέρας λήφθηκε μετά το διαχωρισμό των στεμφύλων από το γλεύκος, και άρα παρακρατήθηκε ένα ποσοστό των εκχυλισμένων ανθοκυανών από τα στέμφυλα. Ίσως, επίσης, να οφείλεται σε φαινόμενα που συμβαίνουν ταυτόχρονα με την εκχύλιση. Ένα μέρος των ανθοκυανών υποβαθμίζεται λόγω των αντιδράσεων υδρόλυσης και οξειδωσης που λαμβάνουν χώρα, άλλα μόρια σχηματίζουν σύμπλοκα με φαινολικά συστατικά, τα οποία καθιζάνουν και ένα σημαντικό μέρος απορροφάται από τους ζυμομήκυτες (Puértolas et al. 2011).

Αντίστοιχο προφίλ εκχύλισης με τις ανθοκυάνες, εμφάνισαν τα κινναμωμικά οξέα και οι τρυγικοί εστέρες τους, με την περιεκτικότητά τους στο γλεύκος να είναι εν γένει μικρότερη από αυτή των ανθοκυανών. Η εκχύλισή τους ξεκίνησε από την πρώτη κιόλας ημέρα της οινοποίησης και η μέγιστη περιεκτικότητα παρατηρήθηκε την 5^η ημέρα στα 246.8 ± 15.6 ppm.

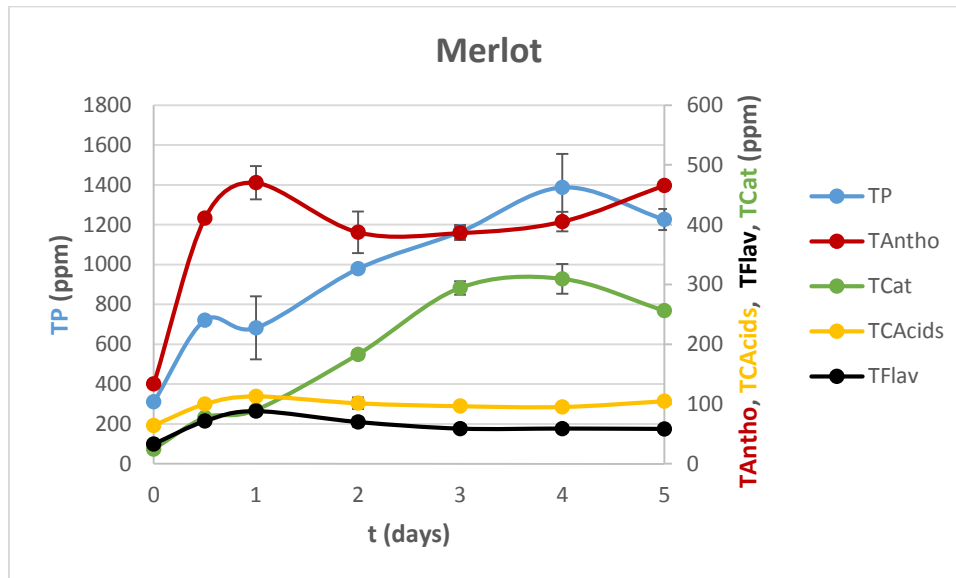
Οι φλαβονόλες βρίσκονται σε μικρότερες ακόμα περιεκτικότητες σε σχέση με τις άλλες φαινολικές ομάδες στο γλεύκος, αλλά εκχυλίζονται και αυτές γρήγορα. Συνεισφέρουν στην πικρή γεύση των κόκκινων κρασιών και στην σταθεροποίηση, αλλά και την ενίσχυση του χρώματός τους. Παρόλο που οι φλαβονόλες συντίθενται κυρίως στους φλοιούς, περιέχονται επίσης και στη σάρκα των ραγών (Figueiredo-González et al. 2012). Στη μέγιστη συγκέντρωσή τους έφτασαν την 5^η ημέρα στα 123.5 ± 11.4 ppm.

Τέλος, παρατηρήθηκε μία υστέρηση στην εκχύλιση των φλαβαν-3-ολών και των πολυμερών τους των προκυανιδινών. 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. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι η αύξηση της περιεκτικότητας της αιθανόλης κατά την εξέλιξη της αλκοολικής ζύμωσης συντελεί στην καλύτερη εκχύλισή τους (Cheynier 2006). Η εκχύλισή τους ξεκίνησε τη 2^η ημέρα και στη μέγιστη συγκέντρωσή τους στο γλεύκος έφτασαν την 6^η ημέρα, στο τέλος της εκχύλισης, στα 410.3 ± 3.3 ppm.

Η χρονική υστέρηση της εκχύλισης των φλαβαν-3-ολών επιβεβαιώνεται αν ληφθεί υπόψη ότι τη 2^η ημέρα της εκχύλισης έχει εκχυλιστεί το 48.5% των ανθοκυανών, το 47.8% των κινναμωμικών οξέων, το 58.5% των φλαβονολών και μόνο το 20% των φλαβαν-3-ολών.

6.1.1.2. Merlot

Η εκχύλιση των επιμέρους φαινολικών ομάδων (ανθοκυάνες, φλαβαν-3-όλες, τρυγικοί εστέρες των κινναμωμικών οξέων και φλαβονόλες) καθώς και των ολικών φαινολικών κατά την ερυθρή οινοποίηση της ποικιλίας Merlot παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 2. Η εκχύλιση διήρκησε 5 ημέρες, σε θερμοκρασία 18 °C, χωρίς προσθήκη πηκτινολυτικών ενζύμων.



Διάγραμμα 2: Εκχύλιση επιμέρους φαινολικών ομάδων και ολικών φαινολικών κατά την ερυθρή οινοποίηση της ποικιλίας Merlot (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 μέγιστη συγκέντρωση των ολικών φαινολικών παρατηρήθηκε την 4^η ημέρα, δηλαδή προς τέλος της εκχύλισης, και ήταν ίση με 1387 ± 168 ppm.

Οι ανθοκυάνες, και σε αυτή την οινοποίηση εκχυλίστηκαν άμεσα, και μάλιστα την 1^η κιόλας ημέρα έφτασαν στη μέγιστη συγκέντρωσή τους, στα 470.2 ± 27.7 ppm. Το γεγονός ότι η ποικιλία του Merlot εκχυλίζει τόσο γρήγορα τις ανθοκυάνες της, αποδίδεται στη μορφολογία κυρίως του καρπού της και συγκεκριμένα στη μικρής διαμέτρου ράγα, με λεπτό φλοιό (Ortega - Regules et al. 2007). Μελέτες που έχουν διεξαχθεί έχουν επιβεβαιώσει την ταχύτερη εκχύλιση των ανθοκυανών της ποικιλίας Merlot σε σχέση με άλλες ποικιλίες. Συγκεκριμένα, η συγκέντρωση των ανθοκυανών της ποικιλίας Merlot φτάνει γρηγορότερα σε μέγιστο σε σχέση με την ποικιλία Cabernet Sauvignon (González - Neves et al. 2007, Συμεού 2010). Επιπλέον, κατά την οινοποίηση της ποικιλίας Merlot που πραγματοποιήθηκε στη Ελλάδα, παρατηρήθηκε ότι το ολικό φορτίο σε ανθοκυάνες φτάνει στη μέγιστη τιμή του την 2^η ημέρα της εκχύλισης (Bimpilas et al. 2015), ενώ σε μία ισπανική οινοποίηση την 3^η ημέρα (Puértolas et al. 2011). Μετά την 1^η ημέρα της εκχύλισης, οι ανθοκυάνες ξεκινούν και μειώνονται, ενώ στη συνέχεια αυξάνονται πάλι. Αυτό ίσως οφείλεται σε φαινόμενα που συμβαίνουν ταυτόχρονα με την εκχύλιση, όπως ήδη προαναφέρθηκε στο υποκεφάλαιο 6.1.1.1..

Αντίστοιχο προφίλ εκχύλισης με τις ανθοκυάνες, εμφάνισαν τα κινναμωμικά οξέα και οι τρυγικοί εστέρες τους, με τη μέγιστη περιεκτικότητά τους να παρατηρείται την 1^η ημέρα στα 112.9 ± 5.6 ppm. Στη συνέχεια, η συγκέντρωσή τους παραμένει πρακτικά σταθερή. Σύμφωνα με τους Puértolas et al. (2011) οι εστέρες των κινναμωμικών οξέων φτάνουν στη μέγιστη τιμή τους την 3^η κιόλας ημέρα της εκχύλισης.

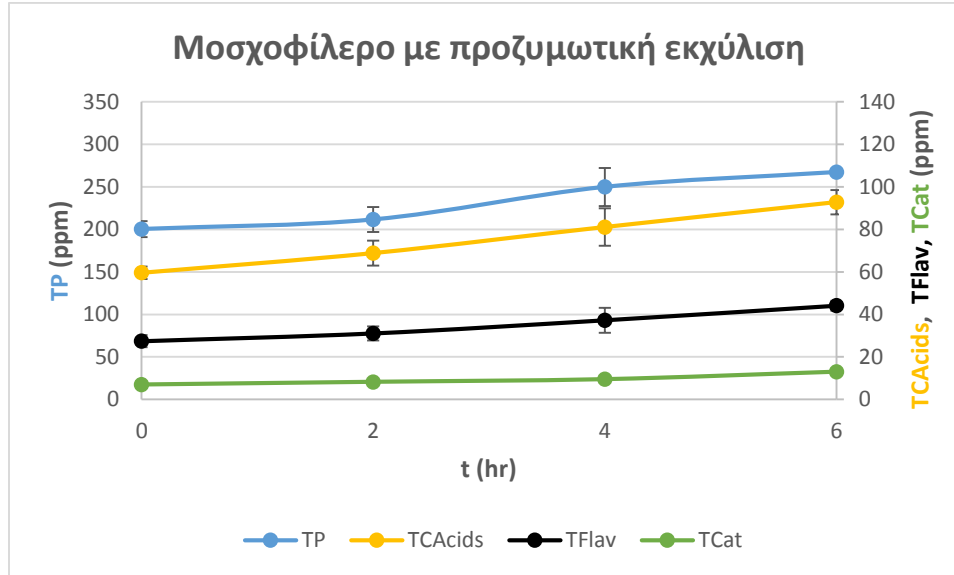
Οι φλαβονόλες εκχυλίστηκαν γρήγορα και την 1^η κιόλας ημέρα έφτασαν στη μέγιστη συγκέντρωσή τους στα 88.1 ± 7.1 ppm. Σύμφωνα με την έρευνα των Bimpilas et al. (2015), η ποικιλία Merlot παρουσιάζει μέγιστη συγκέντρωση φλαβονολών την 2^η ημέρα της εκχύλισης. Μετά την πρώτη μέρα, η συγκέντρωση των φλαβονολών παρέμεινε σχετικά σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια της εκχύλισης.

Τέλος, παρατηρήθηκε χρονική υστέρηση στην εκχύλιση των φλαβαν-3-ολών και των πολυμερών τους των προκυανιδινών. Η εκχύλισή τους ξεκίνησε την δεύτερη ημέρα και στη μέγιστη συγκέντρωσή τους στο γλεύκος έφτασαν την 4^η ημέρα, προς το τέλος της εκχύλισης, στα 309.3 ± 24.8 ppm.

Η χρονική υστέρηση της εκχύλισης των φλαβαν-3-ολών επιβεβαιώνεται αν ληφθεί υπόψη ότι την πρώτη ημέρα της εκχύλισης που έχουν παρουσιάσει μέγιστο όλες οι άλλες ομάδες, αυτές έχουν εκχυλιστεί μόνο κατά 23%.

6.1.1.3. Μοσχοφίλερο

Η εκχύλιση στη λευκή ποικιλία Μοσχοφίλερο διήρκησε μόνο 6 ώρες, σε θερμοκρασία 10 °C, καθώς το γλεύκος είχε ξεκινήσει να αποκτά μία ερυθρή χροιά, λόγω της εκχύλισης των ανθοκυανών του χαρακτηριστικού χρώματος φλοιού της ράγας του Μοσχοφίλερου. Στο Διάγραμμα 3 παρουσιάζεται η εκχύλιση των επιμέρους φαινολικών ομάδων (τρυγικοί εστέρες των κινναμωμικών οξέων, φλαβονόλες και φλαβαν-3-όλες) καθώς και των ολικών φαινολικών κατά την λευκή οινοποίηση με προζυμωτική κρυσεκχύλιση της ποικιλίας του Μοσχοφίλερου.



Διάγραμμα 3: Εκχύλιση επιμέρους φαινολικών ομάδων και ολικών φαινολικών κατά την προζυμωτική κρυσεκχύλιση της ποικιλίας Μοσχοφίλερο (TP: ολικό φαινολικό φορτίο (ισοδύναμα γαλλικού οξέος), TCat: φλαβαν-3-όλες (ισοδύναμα κατεχίνης), TCAcids: τρυγικοί εστέρες (ισοδύναμα καφεϊκού οξέος), TFlav: φλαβονόλες (ισοδύναμα κερκετίνης))

Όπως παρατηρείται υπάρχει αύξηση σε όλες τις επιμέρους φαινολικές ομάδες, καθ' όλη τη διάρκεια της προζυμωτικής κρυσεκχύλισης. Αυξάνονται τα κινναμωμικά οξέα και οι φλαβονόλες αφού είναι υδατοδιαλυτά συστατικά και βρίσκονται στους φλοιούς των ραγών. Οι φλαβαν-3-όλες που εκχυλίστηκαν θεωρείται ότι είναι προκυανιδίνες των φλοιών, οι οποίες παραλαμβάνονται σχετικά γρήγορα, λόγω της θέσης τους και λόγω της υψηλότερης διαλυτότητας στο νερό, σε αντίθεση με τις προκυανιδίνες των γιγάρτων, οι οποίες διαχέονται με μικρότερο ρυθμό, ανάλογα με το στάδιο ωριμότητας των γιγάρτων και παρουσιάζουν μία υστέρηση, καθώς η εκχύλισή τους ξεκινά όταν αυξάνεται η περιεκτικότητα της αιθανόλης στο ζυμούμενο γλεύκος (Cheynier 2006).

Το ολικό φαινολικό φορτίο, μετά τις 6 ώρες προζυμωτικής εκχύλισης στους 10 °C, προέκυψε ίσο με 267.4 ± 0.6 ppm, τα κινναμωμικά οξέα και οι τρυγικοί τους εστέρες 92.8 ± 5.7 ppm, οι φλαβονόλες 44.1 ± 2.4 ppm, ενώ οι φλαβαν-3-όλες διατηρήθηκαν σε χαμηλά επίπεδα της τάξης των 13 ppm, αφού εκχυλίστηκαν μόνο εκείνες των φλοιών, που βρίσκονται σε σημαντικά χαμηλότερη συγκέντρωση από αυτές των γιγάρτων. Επομένως, κατά τη διάρκεια της προζυμωτικής εκχύλισης, υπήρξε αύξηση των τρυγικών εστέρων των κινναμωμικών οξέων κατά

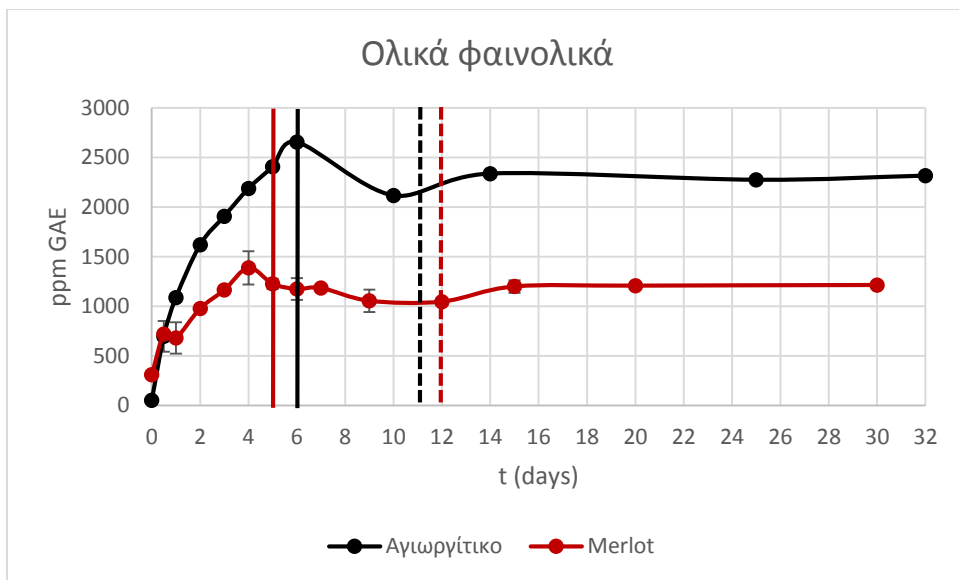
55.7%, των φλαβονολών κατά 60.8% και των φλαβαν-3-ολών κατά 86.6%. Η αύξηση των ολικών φαινολικών ανήλθε στο 33.5%, η οποία ίσως έχει απόκλιση από την πραγματική τιμή, καθώς η μέθοδος μέτρησής τους έχει παρεμβολές από τα ανάγοντα σάκχαρα, τα οποία βρίσκονται σε μεγάλη συγκέντρωση. Οι αυξήσεις αυτές των επιμέρους φαινολικών ομάδων ενδέχεται να είναι ακόμη μεγαλύτερες αφού το δείγμα στο χρόνο μηδέν λήφθηκε μετά την αποβοστρύχωση και το σπάσιμο όλων των σταφυλιών (περίπου μία ώρα μετά την έναρξη της διεργασίας), που ήδη είχε αρχίσει η εκχύλιση των φαινολικών συστατικών. Για την εξαγωγή πιο έγκυρων αποτελεσμάτων για την επίδραση της προζυμωτικής εκχύλισης στη σύσταση του γλεύκους και του κρασιού, θα συγκριθεί η διεργασία αυτή με την κλασική λευκή οινοποίηση στο υποκεφάλαιο 6.1.2.2.

6.1.2. Εξέλιξη φαινολικών ενώσεων κατά τη ζύμωση - σύγκριση ποικιλιών και διεργασιών

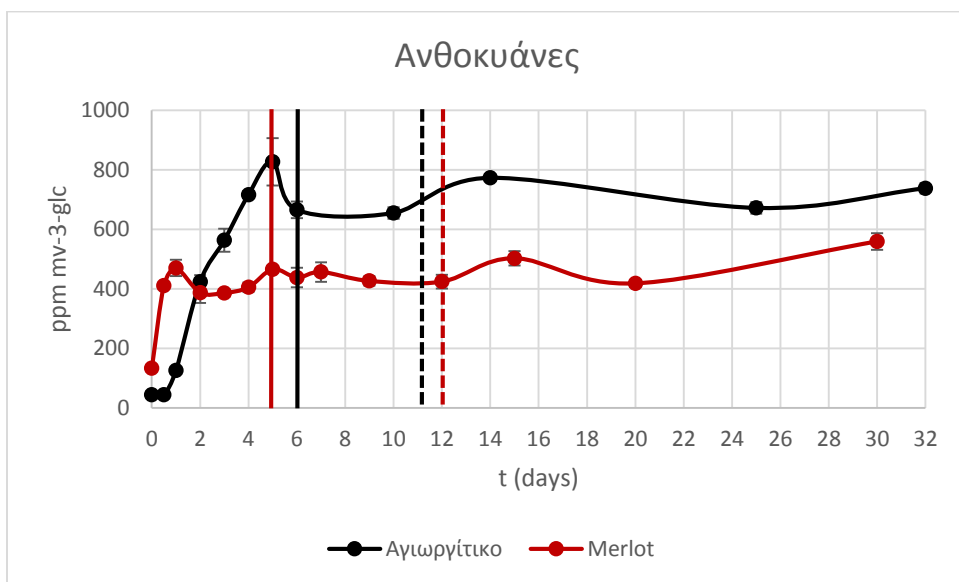
Στη συνέχεια θα παρουσιασθούν και θα σχολιασθούν οι μεταβολές των επιμέρους φαινολικών ομάδων των γλευκών/κρασιών κατά τη ζύμωση και θα γίνει προσπάθεια να συγκριθούν τα κόκκινα κρασιά διαφορετικής ποικιλίας, αλλά και τα λευκά με προζυμωτική εκχύλιση ή χωρίς.

6.1.2.1. Κόκκινα κρασιά

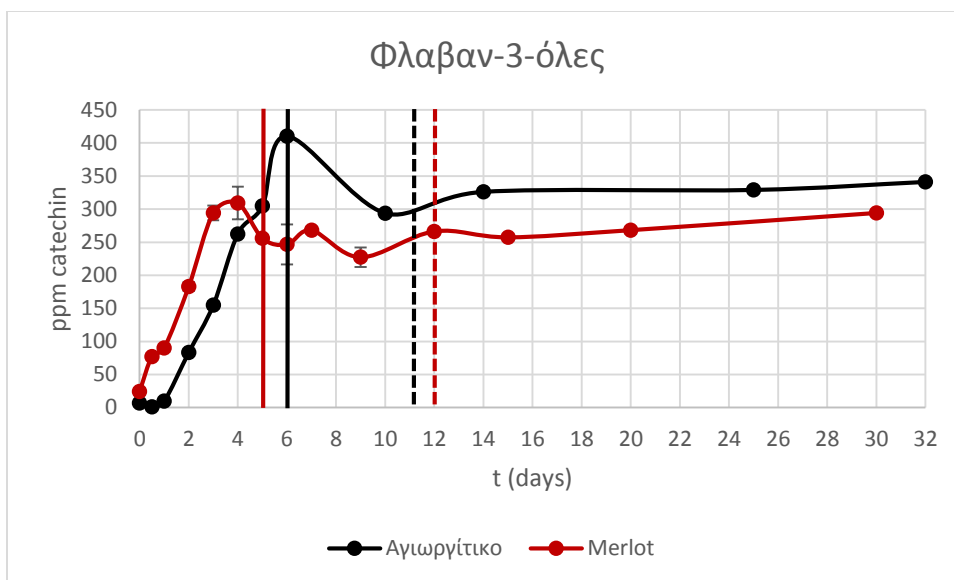
Στα Διαγράμματα 4, 5, 6, 7 και 8 που ακολουθούν φαίνεται η μεταβολή των ολικών φαινολικών, αλλά και των επιμέρους ομάδων, των ανθοκυανών, των φλαβαν-3-ολών, των τρυγικών εστέρων των κινναμωμικών οξέων και των φλαβονολών, αντίστοιχα, κατά την οινοποίηση των δύο ερυθρών ποικιλιών, του Αγιωργίτικου και του Merlot. Με συνεχή κατακόρυφη γραμμή στα διαγράμματα ορίζεται το τέλος της εκχύλισης, η οποία στο Αγιωργίτικο διήρκησε μία ημέρα περισσότερο από αυτή του Merlot. Με διακεκομμένη γραμμή ορίζεται το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης, η οποία προσδιορίστηκε στο Αγιωργίτικο την 11^η και στο Merlot τη 12^η ημέρα. Μετά το τέλος της ζύμωσης, τα κρασιά διατηρήθηκαν σε δεξαμενή για ωρίμανση μέχρι τη συσκευασία, και συνεχίσθηκαν οι δειγματοληψίες μέχρι τις 30-32 ημέρες για να προσδιορισθούν τυχόν αλλαγές των φαινολικών συστατικών στο φρέσκο κρασί.



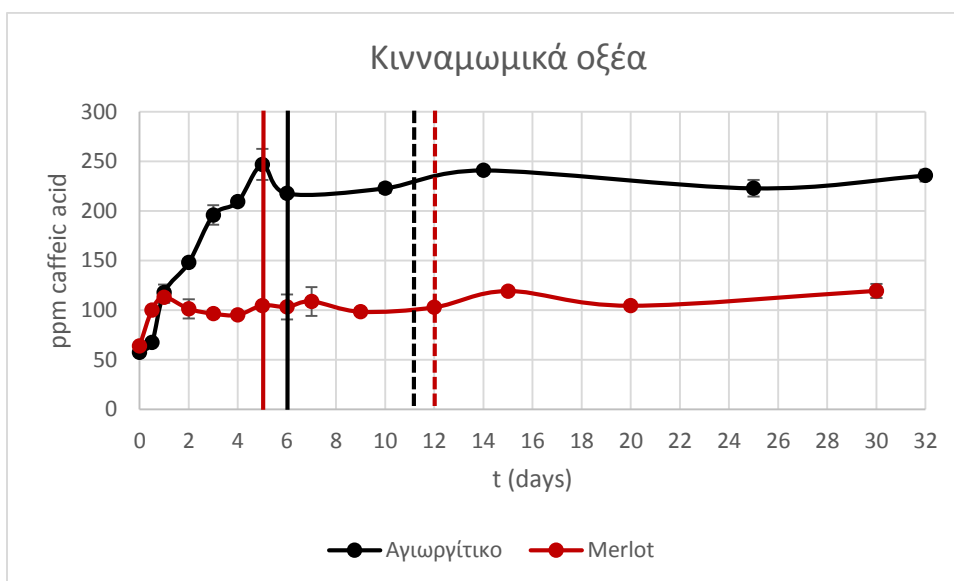
Διάγραμμα 4: Εκχύλιση και εξέλιξη των ολικών φαινολικών (εκφρασμένων σε ισοδύναμα ppm γαλλικού οξέος / GAE) κατά τη ζύμωση των ερυθρών ποικιλιών (συνεχόμενες γραμμές: τέλος εκχύλισης, διακεκομμένες: τέλος ζύμωσης για τις αντίστοιχες (χρωματικά) ποικιλίες)



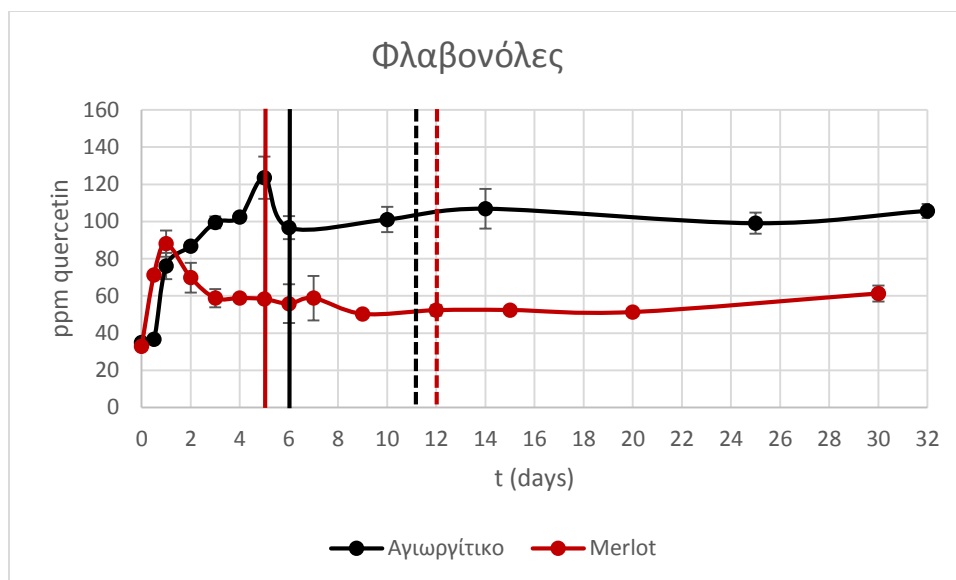
Διάγραμμα 5: Εκχύλιση και εξέλιξη των ολικών ανθοκυανών (εκφρασμένων σε ισοδύναμα ppm γλυκοζίτη-3 της μαλβιδίνης / mv-3-glc) κατά τη ζύμωση των ερυθρών ποικιλιών (συνεχόμενες γραμμές: τέλος εκχύλισης, διακεκομμένες: τέλος ζύμωσης για τις αντίστοιχες (χρωματικά) ποικιλίες)



Διάγραμμα 6: Εκχύλιση και εξέλιξη των ολικών φλαβαν-3-ολών (εκφρασμένων σε ισοδύναμα ppm κατεχίνης / catechin) κατά τη ζύμωση των ερυθρών ποικιλιών (συνεχόμενες γραμμές: τέλος εκχύλισης, διακεκομμένες: τέλος ζύμωσης για τις αντίστοιχες (χρωματικά) ποικιλίες)



Διάγραμμα 7: Εκχύλιση και εξέλιξη των τρυγικών εστέρων των κινναμωμικών οξέων (εκφρασμένων σε ισοδύναμα ppm καφεϊκού οξέος / caffeic acid) κατά τη ζύμωση των ερυθρών ποικιλιών (συνεχόμενες γραμμές: τέλος εκχύλισης, διακεκομμένες: τέλος ζύμωσης για τις αντίστοιχες (χρωματικά) ποικιλίες)



Διάγραμμα 8: Εκχύλιση και εξέλιξη των ολικών φλαβονολών (εκφρασμένων σε ισοδύναμα ppm κερκετίνης / quercetin) κατά τη ζύμωση των ερυθρών ποικιλιών (συνεχόμενες γραμμές: τέλος εκχύλισης, διακεκομμένες: τέλος ζύμωσης για τις αντίστοιχες (χρωματικά) ποικιλίες)

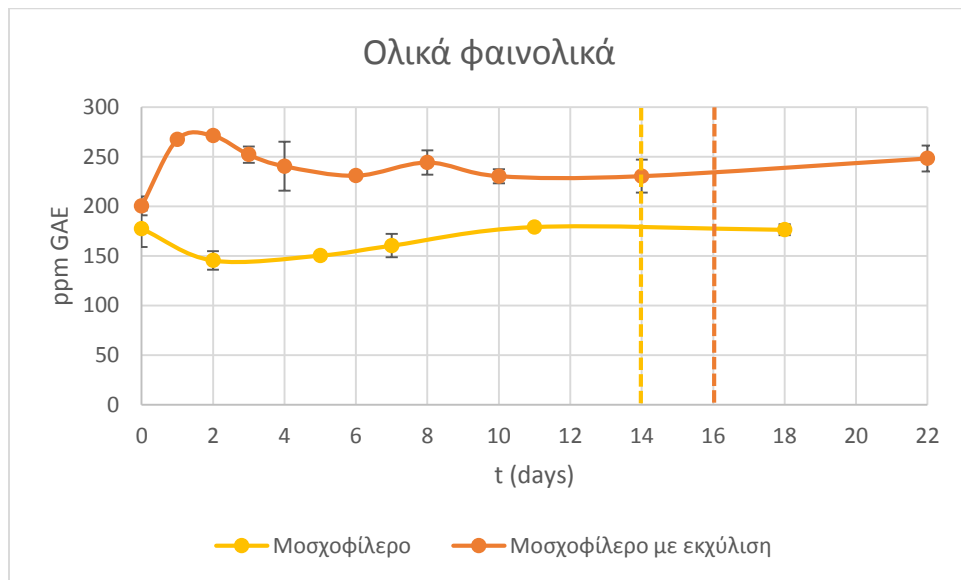
Και στις δύο ποικιλίες που μελετήθηκαν, αφού οι συγκεντρώσεις των επιμέρους φαινολικών ομάδων φτάσουν σε ένα μέγιστο, στη συνέχεια αρχίζουν και μειώνονται, εκτός των κινναμωμικών οξέων (Διάγραμμα 7) που διατηρούνται σταθερά. Το φαινόμενο αυτό ίσως οφείλεται στον πολυμερισμό, την οξείδωση και στην καθίζηση αυτών των συστατικών (Puértolas et al. 2011). Βέβαια, μετά το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης, οι συγκεντρώσεις των επιμέρους φαινολικών ομάδων, αλλά και των ολικών φαινολικών παρέμειναν πρακτικά σταθερές. Την ίδια συμπεριφορά, δηλαδή τη μείωση της συγκέντρωσης των φαινολικών ομάδων από το τέλος της εκχύλισης μέχρι και το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης, παρατήρησαν και οι Mazza et al. (1999) κατά την οινοποίηση της ποικιλίας Merlot.

Σε όλες τις επιμέρους φαινολικές ομάδες η ποικιλία Merlot παρουσίασε πιο γρήγορα μέγιστο, κατά την εκχύλιση, σε σχέση με το Αγιωργίτικο, αν και είχαν χρησιμοποιηθεί πηκτινολυτικά ένζυμα μόνο κατά την οινοποίηση του Αγιωργίτικου. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται και σύμφωνα με την Συμεού (2010) κατά την σύγκριση των δύο αυτών ποικιλιών.

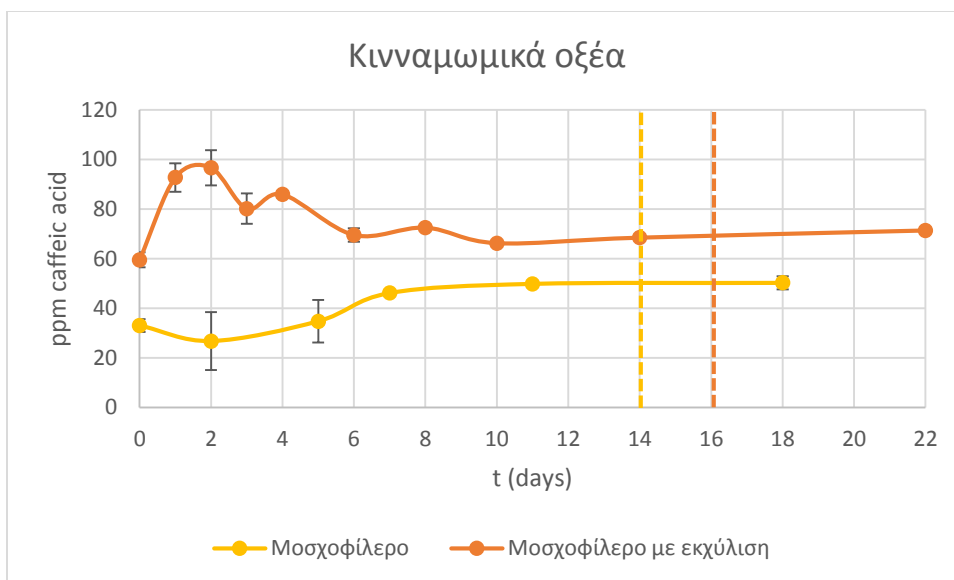
Τα ολικά φαινολικά και οι ανθοκυάνες βρίσκονται σε σημαντικά μεγαλύτερη περιεκτικότητα στο φρέσκο κρασί ποικιλίας Αγιωργίτικου, σε σχέση με το Merlot. Αυτό μπορεί πρωτίστως να οφείλεται στα χαρακτηριστικά της κάθε ποικιλίας την συγκεκριμένη χρονιά συγκομιδής, και αφετέρου στη χρήση πηκτινολυτικών ενζύμων κατά την εκχύλιση της ποικιλίας του Αγιωργίτικου, που όπως έχει αποδειχθεί ενισχύουν την εκχύλιση των ανθοκυανών και των ολικών φαινολικών και μειώνουν το χρόνο που απαιτείται για να φτάσει η συγκέντρωσή τους στο μέγιστο (Segade et al. 2015). Επίσης, το Αγιωργίτικο έχει ελαφρώς μεγαλύτερη συγκέντρωση σε φλαβονόλες και τρυγικούς εστέρες των κινναμωμικών οξέων, ενώ οι φλαβαν-3-όλες και τα πολυμερή τους κυμαίνονται σχεδόν στα ίδια επίπεδα.

6.1.2.2. Λευκά κρασιά

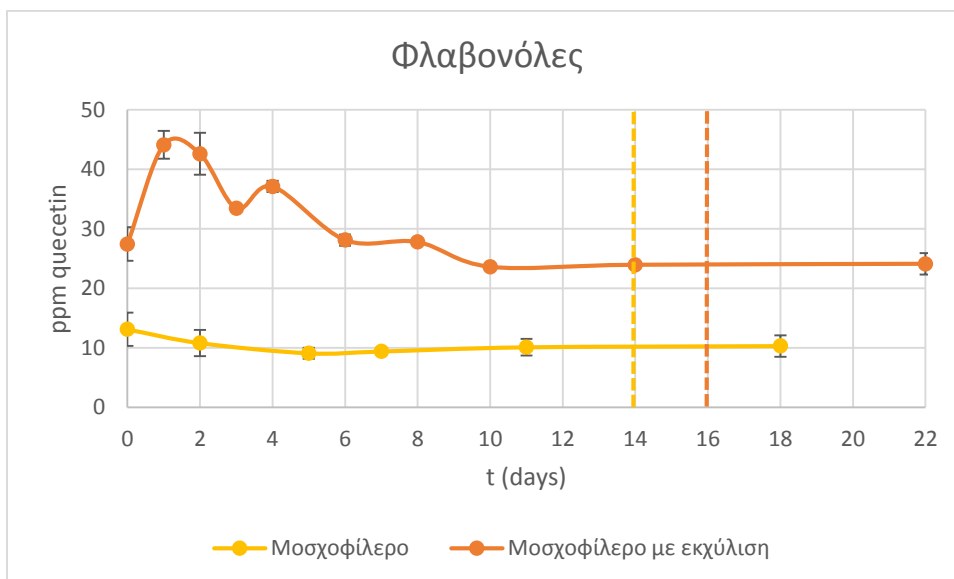
Στα Διαγράμματα 9, 10, 11 και 12 που ακολουθούν φαίνεται η μεταβολή των ολικών φαινολικών, αλλά και των επιμέρους ομάδων, των τρυγικών εστέρων των κινναμωμικών οξέων, των φλαβονολών και των φλαβαν-3-ολών, αντίστοιχα, κατά την οινοποίηση της λευκής ποικιλίας Μοσχοφίλερου με δύο διαφορετικούς τρόπους: με την κλασική λευκή οινοποίηση ή με προζυμωτική κρυοεκχύλιση 6 ωρών, στους 10° C. Οι περαιτέρω συνθήκες οινοποίησης, καθώς και η πρώτη ύλη, ήταν οι ίδιες. Με διακεκομμένη γραμμή ορίζεται το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης, η οποία προσδιορίστηκε στο Μοσχοφίλερο χωρίς προζυμωτική εκχύλιση την 14^η και σε αυτό με προζυμωτική εκχύλιση την 16^η ημέρα. Οι δειγματοληψίες συνεχίστηκαν μέχρι την 18-22^η ημέρα, ενώ το φρέσκο κρασί διατηρείτο σε δεξαμενή.



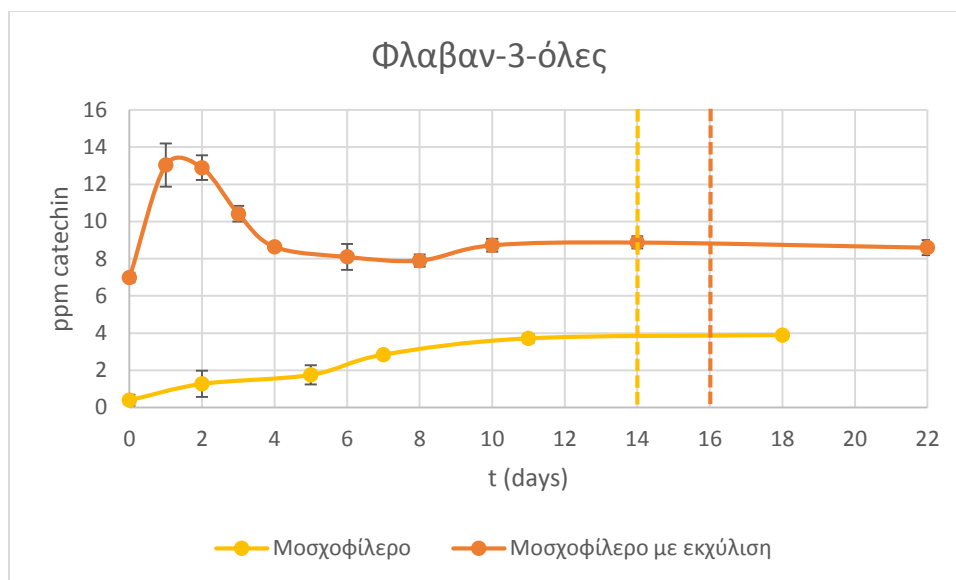
Διάγραμμα 9: Εξέλιξη των ολικών φαινολικών (εκφρασμένων σε ισοδύναμα ppm γαλλικού οξέος /GAE) κατά τη ζύμωση της ποικιλίας του Μοσχοφίλερου (διακεκομμένες γραμμές: τέλος ζύμωσης για τα αντίστοιχα (χρωματικά) κρασιά)



Διάγραμμα 10: Εξέλιξη των τρυγικών εστέρων των κινναμωμικών οξέων (εκφρασμένων σε ισοδύναμα ppm καφεϊκού οξέος /caffeic acid) κατά τη ζύμωση της ποικιλίας του Μοσχοφίλερου (διακεκομμένες γραμμές: τέλος ζύμωσης για τα αντίστοιχα (χρωματικά) κρασιά)



Διάγραμμα 11: Εξέλιξη των ολικών φλαβονολών (εκφρασμένων σε ισοδύναμα ppm κερκετίνης /quercetin) κατά τη ζύμωση της ποικιλίας του Μοσχοφίλερου (διακεκομμένες γραμμές: τέλος ζύμωσης για τα αντίστοιχα (χρωματικά) κρασιά)



Διάγραμμα 12: Εξέλιξη των ολικών φλαβαν-3-ολών (εκφρασμένων σε ισοδύναμα ppm κατεχίνης /catechin) κατά τη ζύμωση της ποικιλίας του Μοσχοφίλερου (διακεκομμένες γραμμές: τέλος ζύμωσης για τα αντίστοιχα (χρωματικά) κρασιά)

Κατά τη διάρκεια της λευκής οινοποίησης χωρίς προζυμωτική εκχύλιση, παρατηρήθηκε ότι η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών, καθώς και των επιμέρους φαινολικών ομάδων, παρέμεινε σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης. Το γεγονός αυτό είναι αναμενόμενο αφού δεν υπήρξε επαφή των στεμφύλων με το γλεύκος, και ως εκ τούτου δεν πραγματοποιήθηκε εκχύλιση των φαινολικών συστατικών από τους φλοιούς των ραγών στο γλεύκος.

Αντίθετα, στην οινοποίηση με προζυμωτική εκχύλιση, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών κατά την εκχύλιση, όπως ήδη αναφέρθηκε (6.1.1), φαινόμενο το οποίο αναφέρεται και από άλλους ερευνητές (Hernanz et al. 2007, Gómez-Míguez et al. 2007). Η συγκέντρωση όμως των φαινολικών ενώσεων μειώθηκε κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης. Συγκεκριμένα, χάθηκε το 7% των ολικών φαινολικών, το 23% των κινναμωμικών οξέων, το 45% των φλαβονολών και το 18% των φλαβαν-3-ολών, που είχαν εκχυλιστεί. Η μείωση παρατηρείται κυρίως στις φλαβονόλες. Παρόμοιες αναφορές έχουν γίνει στο παρελθόν, όπου αναφέρεται η μείωση του φαινολικού φορτίου κατά τη διάρκεια της μετέπειτα οινοποίησης, η οποία μπορεί να φτάσει και το 26% σε κρασιά μεγάλης διάρκειας εκχύλισης (πάνω από 12 ώρες) και παρατηρείται κυρίως στις φλαβανοειδής φαινόλες (Gómez-Míguez et al. 2007).

Όπως φαίνεται η προζυμωτική κρυοεκχύλιση στην λευκή οινοποίηση προσφέρει ένα αυξημένο φαινολικό φορτίο στο κρασί. Έτσι, το φρέσκο κρασί που προέκυψε μετά την κλασική λευκή οινοποίηση είχε ολικά φαινολικά 176.3 ± 5.4 ppm, ενώ αυτό μετά την οινοποίηση με προζυμωτική κρυοεκχύλιση 248.2 ± 13.1 ppm. Είχε, δηλαδή, κατά 41% υψηλότερο φαινολικό φορτίο. Όσον αφορά τις επιμέρους φαινολικές ομάδες, οι τρυγικοί εστέρες των κινναμωμικών οξέων αυξήθηκαν κατά 42% (από 50.3 ± 2.6 σε 71.4 ± 1.3) και οι φλαβονόλες κατά 134% (από 10.3 ± 1.8 σε 24.1 ± 1.8). Η συγκέντρωση των φλαβαν-3-ολών παρέμεινε σε πολύ χαμηλά επίπεδα, αν και η αύξησή της ήταν 121% (από 3.9 ± 0.1 σε 8.6 ± 0.4).

6.1.3. Προσδιορισμός φαινολικών ενώσεων στα κόκκινα κρασιά με HPLC-σύγκριση ποικιλιών

Επειδή η φασματοφωτομετρική μέθοδος προσδιορισμού των φαινολικών ομάδων δεν παρέχει κάποια ένδειξη για τις επιμέρους ενώσεις της κάθε ομάδας, τα φρέσκα κρασιά αναλύθηκαν μέσω της μεθόδου υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης HPLC σε σύνδεση με συστοιχία φωτοδιόδων (DAD) και ταυτοποιήθηκαν οι επιμέρους ενώσεις με φασματόμετρο μάζας ESI-MS/MS. Στους Πίνακες 4, 5 και 6 φαίνονται οι επιμέρους ανθοκυάνες, φλαβονόλες και φαινολικά οξέα των φρέσκων κόκκινων κρασιών, αντίστοιχα.

Πίνακας 4: Επιμέρους ανθοκυάνες των φρέσκων κρασιών των ποικιλιών Αγιωργίτικο και Merlot

Ανθοκυάνες	Αγιωργίτικο	Merlot
γλυκοζίτης-3 της δελφινιδίνης	24.6	19.0
γλυκοζίτης-3 της κυανιδίνης	-	Ίχνη
γλυκοζίτης-3 της πετουνιδίνης	36.5	28.7
γλυκοζίτης-3 της παιονιδίνης	25.1	22.2
γλυκοζίτης-3 της μαλβιδίνης	443.4	203.2
Σύνολο γλυκοζυλιωμένων ανθοκυανών	529.6	273.1
ακετυλιωμένος γλυκοζίτης-3 της δελφινιδίνης	-	8.4
ακετυλιωμένος γλυκοζίτης-3 της κυανιδίνης	-	Ίχνη
ακετυλιωμένος γλυκοζίτης-3 της πετουνιδίνης	-	11.0
ακετυλιωμένος γλυκοζίτης-3 της παιονιδίνης	12.0	16.6
ακετυλιωμένος γλυκοζίτης-3 της μαλβιδίνης	35.8	61.5
Σύνολο ακετυλιωμένων ανθοκυανών	47.8	97.5
κουμαριλιωμένος γλυκοζίτης-3 της πετουνιδίνης	-	9.2
κουμαριλιωμένος γλυκοζίτης-3 της παιονιδίνης	13.1	11.8
<i>trans</i> -κουμαριλιωμένος γλυκοζίτης-3 της μαλβιδίνης	65.3	27.3
<i>cis</i> -κουμαριλιωμένος γλυκοζίτης-3 της μαλβιδίνης	12.9	-
Σύνολο κουμαριλιωμένων ανθοκυανών	91.3	48.3
καφεΐλιωμένος γλυκοζίτης-3 της μαλβιδίνης	-	Ίχνη

Όπως παρατηρείται στον Πίνακα 4, η μαλβιδίνη είναι η κυρίαρχη ανθοκυάνη σε όλες της μορφές της, καθώς η συγκέντρωσή της είναι υψηλότερη από τις άλλες. Ταυτοποιήθηκαν οι γλυκοζίτες και οι ακετυλιωμένοι γλυκοζίτες και των πέντε ανθοκυανών, οι κουμαριλιωμένοι γλυκοζίτες της πετουνιδίνης, της παιονιδίνης και της μαλβιδίνης, καθώς και ο καφεΐλιωμένος γλυκοζίτης της μαλβιδίνης. Επιπλέον, το κρασί της ποικιλίας Αγιωργίτικου, σε αντίθεση με αυτό του Merlot, έχει υψηλότερη περιεκτικότητα σε κουμαριλιωμένες ανθοκυάνες σε σχέση με τις ακετυλιωμένες. Τέλος, φαίνεται ότι το Merlot έχει πιο πολύπλοκο προφίλ ανθοκυανών από το Αγιωργίτικο, καθώς περιέχει περισσότερες επιμέρους ανθοκυάνες. Συγκεκριμένα, στο φρέσκο κρασί της ποικιλίας Merlot ταυτοποιήθηκαν 14 επιμέρους ανθοκυάνες και σε αυτό του Αγιωργίτικου 9.

Πίνακας 5: Επιμέρους φλαβονόλες των φρέσκων κρασιών των ποικιλιών Αγιωργίτικο και Merlot

Φλαβονόλες	Αγιωργίτικο	Merlot
μυρισετίνη	2.3	2.8
κερκετίνη	6.3	1.9
γλυκοζίτης-3 της μυρισετίνης	10.2	2.6
γλυκοζίτης-3 της κερκετίνης	5.7	2.9
γλυκοζίτης-3 της λαρικιτρίνης	3.2	1.5
γλυκοζίτης-3 της σιρινγκετίνης	4.1	1.8
γλυκοζίτης-3 της ισοραμετίνης	1.7	-
γλυκουρονίδιο-3 της μυρισετίνης	-	1.0
γλυκουρονίδιο-3 της κερκετίνης	6.6	1.7

Όπως παρατηρείται στον Πίνακα 5, η μυρισετίνη και η κερκετίνη είναι οι κυρίαρχες φλαβονόλες, και μάλιστα έχουν ταυτοποιηθεί οι γλυκοζίτες τους καθώς και τα γλυκουρονιδιά τους. Επίσης, ταυτοποιήθηκαν οι γλυκοζίτες της λαρικιτρίνης, της σιρινγκετίνης, καθώς και της ισοραμετίνης. Τέλος, φαίνεται ότι τα δύο κρασιά παρουσίασαν παρόμοιο προφίλ φλαβονολών.

Πίνακας 6: Επιμέρους φαινολικά οξέα των φρέσκων κρασιών των ποικιλιών Αγιωργίτικο και Merlot

Φαινολικά οξέα	Αγιωργίτικο	Merlot
καφταρικό οξύ	48.6	11.1
κουταρικό οξύ	23.8	3.6
καφεϊκό οξύ	Ίχνη	Ίχνη
π-κουμαρικό οξύ	Ίχνη	Ίχνη

Όπως παρατηρείται στον Πίνακα 6, ταυτοποιήθηκαν το καφεϊκό και το π-κουμαρικό οξύ, καθώς και οι τρυγικοί εστέρες τους, καφταρικό και κουταρικό οξύ. Τα ελεύθερα οξέα βρέθηκαν σε ίχνη στο φρέσκο κρασί. Τέλος, φαίνεται ότι τα δύο κρασιά παρουσίασαν παρόμοιο προφίλ φαινολικών οξέων.

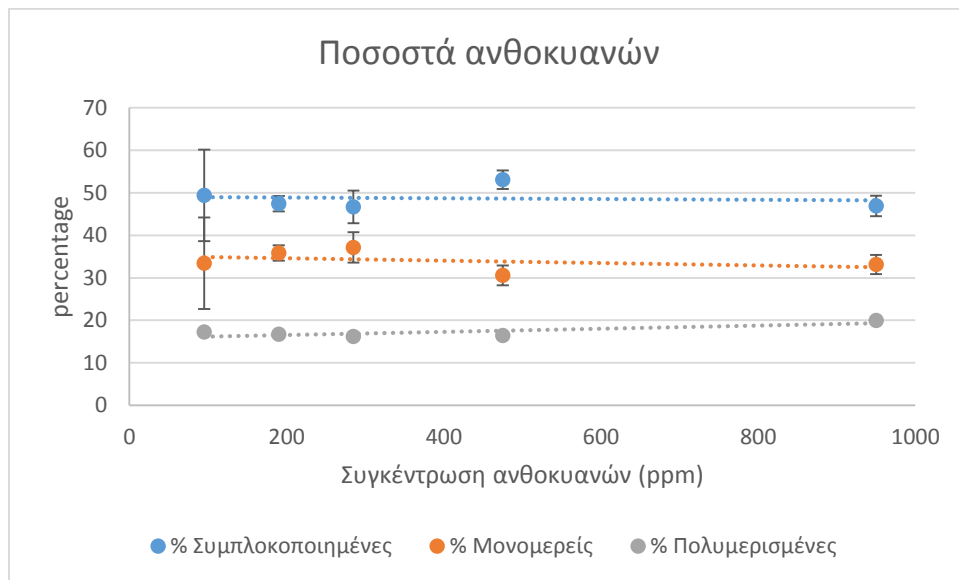
6.2. Β' Μέρος: Μεταβολές κατά την αποθήκευση του φρέσκου κρασιού και μελέτη βελτίωσης χρώματος με συμπλοκοποίηση

6.2.1. Δοκιμαστικά πειράματα μελέτης του φαινομένου του σχηματισμού έγχρωμων συμπλόκων σε εκχυλίσματα φλοιών

Τα δοκιμαστικά πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε εκχυλίσματα φλοιών της ελληνικής ερυθρής ποικιλίας της Μαυροκουντούρας. Σε αυτά τα εκχυλίσματα μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης των ανθοκυανών στο σχηματισμό έγχρωμων συμπλόκων με ροσμαρινικό οξύ. Επίσης, μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του ροσμαρινικού οξέος και του εκχυλίσματος ρίγανης στο σχηματισμό έγχρωμων συμπλόκων.

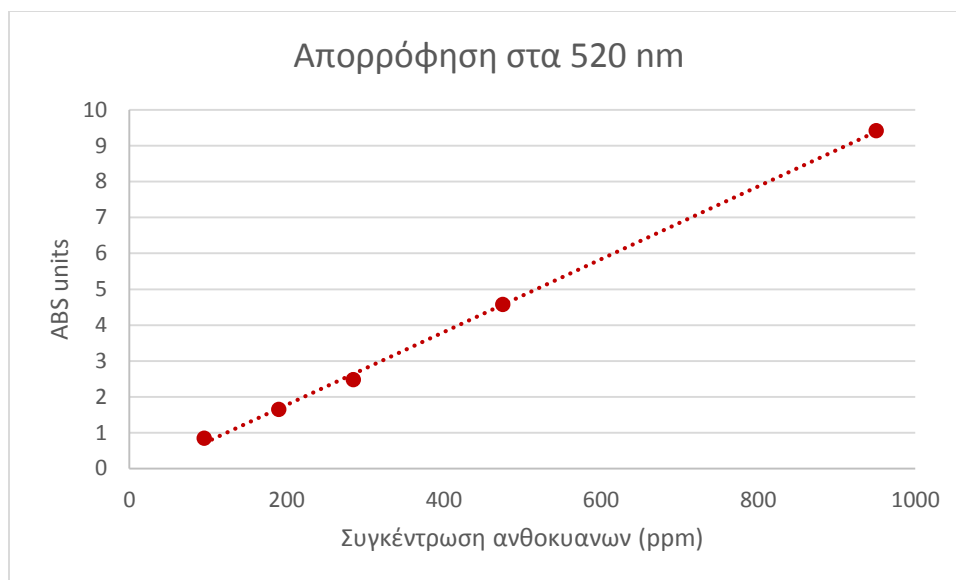
6.2.1.1. Μελέτη της επίδρασης της συγκέντρωσης ανθοκυανών στο φαινόμενο σχηματισμού έγχρωμων συμπλόκων

Για την επίδραση της περιεκτικότητας των ανθοκυανών στο φαινόμενο σχηματισμού έγχρωμων συμπλόκων μελετήθηκαν ως προς το χρώμα, αλλά και ως προς το ποσοστό των συμπλοκοποιημένων ανθοκυανών, διαλύματα που περιείχαν εκχυλίσματα φλοιών διαφόρων συγκεντρώσεων ανθοκυανών, αλλά με σταθερή περιεκτικότητα σε ροσμαρινικό οξύ ίση με 672 ppm. Οι συγκεντρώσεις των ανθοκυανών κυμάνθηκαν από 100 έως 960 ppm, ώστε ο λόγος του πρόσθετου συστατικού προς τις ανθοκυανές να έχει ευρεία διακύμανση. Συγκεκριμένα ο λόγος ppm ροσμαρινικού οξέος /ppm ανθοκυανών πήρε τιμές από 0.7 έως 7. Στο Διάγραμμα 13, φαίνονται τα ποσοστά των συμπλοκοποιημένων, των μονομερών (ελεύθερων) και των πολυμερισμένων ανθοκυανών αυτών των εκχυλισμάτων.



Διάγραμμα 13: Ποσοστό των συμπλοκοποιημένων, των μονομερών και των πολυμερισμένων ανθοκυανών στα διαλύματα των εκχυλισμάτων φλοιών διαφορετικών συγκεντρώσεων σε ανθοκυανές, αλλά σταθερής περιεκτικότητας σε καθαρό ροσμαρινικό οξύ (672 ppm)

Όπως παρατηρείται, η συγκέντρωση των ανθοκυανών δεν επηρεάζει την έκταση του φαινομένου του σχηματισμού έγχρωμων συμπλόκων, καθώς το ποσοστό των συμπλοκοποιημένων ανθοκυανών παραμένει σταθερό (περίπου 50%) για όλες τις μελετούμενες συγκεντρώσεις. Το γεγονός αυτό μπορεί να επιβεβαιωθεί από το Διάγραμμα 14, όπου φαίνεται η απορρόφηση των εκχυλισμάτων στα 520 nm (κόκκινο χρώμα).



Διάγραμμα 14: Απορρόφηση διαλυμάτων εκχυλισμάτων διαφορετικών συγκεντρώσεων ανθοκυανών, αλλά σταθερής περιεκτικότητας σε καθαρό ροσμαρινικό οξύ στα 520 nm

Όπως παρατηρείται η απορρόφηση στα 520 nm αυξάνεται γραμμικά με τη συγκέντρωση των ανθοκυανών των διαλυμάτων και μάλιστα η εξίσωση της ευθείας που προκύπτει έχει συντελεστή προσδιορισμού R^2 ίσο με 0.999. Στην περίπτωση, που η συγκέντρωση των ανθοκυανών θα επηρέαζε την έκταση του φαινομένου σχηματισμού έγχρωμων συμπλόκων, η καμπύλη που θα προέκυπτε δεν θα ήταν γραμμική αλλά υπερβολική, λόγω της αυξημένης απορρόφησης που θα προκαλούσε το υψηλότερο ποσοστό συμπλόκων στις υψηλότερες συγκεντρώσεις ανθοκυανών. Εδώ, όμως, είναι γραμμική, επομένως τα διαλύματα έχουν ίδιο ποσοστό συμπλοκοποιημένων ανθοκυανών, το οποίο δεν επηρεάζεται από την συγκέντρωση των ανθοκυανών στα εμπλουτισμένα εκχυλίσματα.

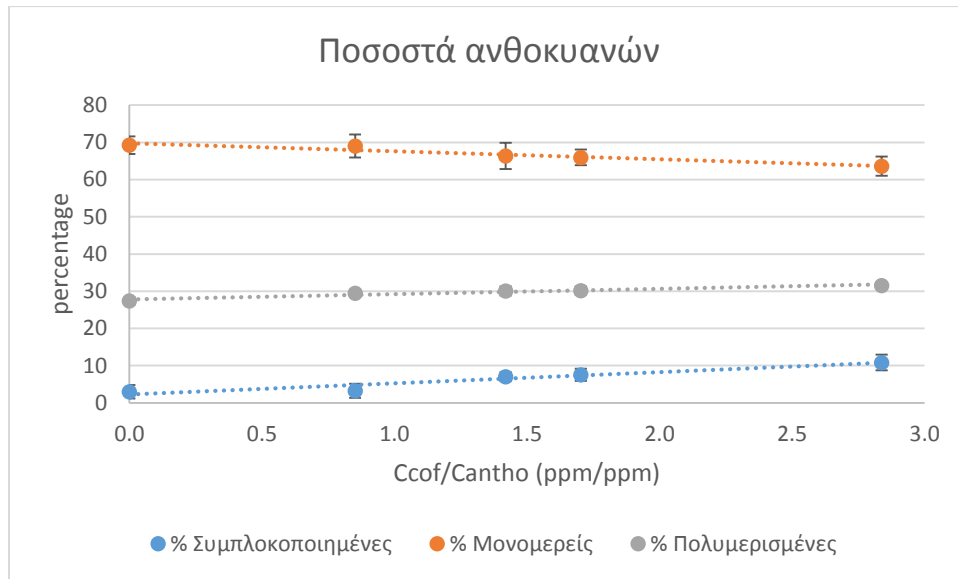
6.2.1.2. Μελέτη της επίδρασης της συγκέντρωσης πρόσθετων συστατικών στο φαινόμενο σχηματισμού έγχρωμων συμπλόκων

Για την επίδραση της συγκέντρωσης πρόσθετων συστατικών στο φαινόμενο σχηματισμού έγχρωμων συμπλόκων μελετήθηκαν ως προς το χρώμα, αλλά και ως προς το ποσοστό των συμπλοκοποιημένων ανθοκυανών, διαλύματα εκχυλισμάτων φλοιών συγκεκριμένης συγκέντρωσης ανθοκυανών, αλλά με διαφορετική περιεκτικότητα σε πρόσθετα. Ως πρόσθετα χρησιμοποιήθηκαν καθαρό ροσμαρινικό οξύ και αιθανολικό εκχύλισμα ρίγανης.

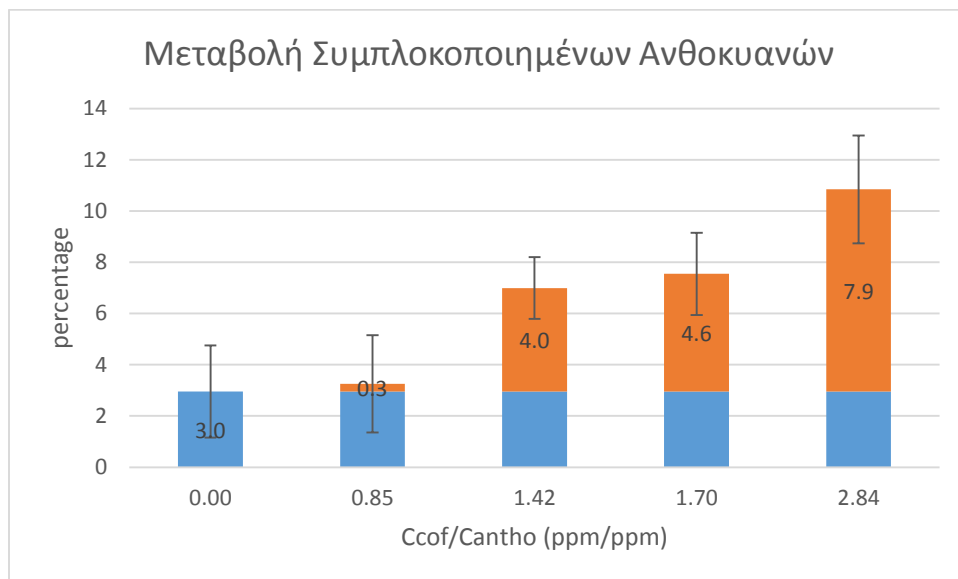
6.2.1.2.1. Προσθήκη ροσμαρινικού οξέος

Η μελέτη της επίδρασης του ροσμαρινικού οξέος στο φαινόμενο σχηματισμού έγχρωμων συμπλόκων πραγματοποιήθηκε σε εκχυλίσματα φλοιών με περιεκτικότητα σε ανθοκυανές 123.3 ± 1.6 ppm και συγκέντρωση ροσμαρινικού οξέος από 0 έως 350 ppm. Βάση αυτών, υπολογίστηκε ο λόγος ppm ροσμαρινικού οξέος/ppm ανθοκυανών (Ccof/Cantho), ο οποίος πήρε τιμές από 0 έως 2.84, όπως φαίνεται και στα Διαγράμματα 15 και 16. Στο Διάγραμμα 15 φαίνονται τα ποσοστά των συμπλοκοποιημένων, των μονομερών και των πολυμερισμένων ανθοκυανών των

εκχυλισμάτων με διαφορετικές συγκεντρώσεις πρόσθετου ροσμαρινικού οξέος, ενώ, αναλυτικότερα, στο Διάγραμμα 16 η μεταβολή των συμπλοκοποιημένων ανθοκυανών σε σχέση με το εκχύλισμα χωρίς πρόσθετα συστατικά.



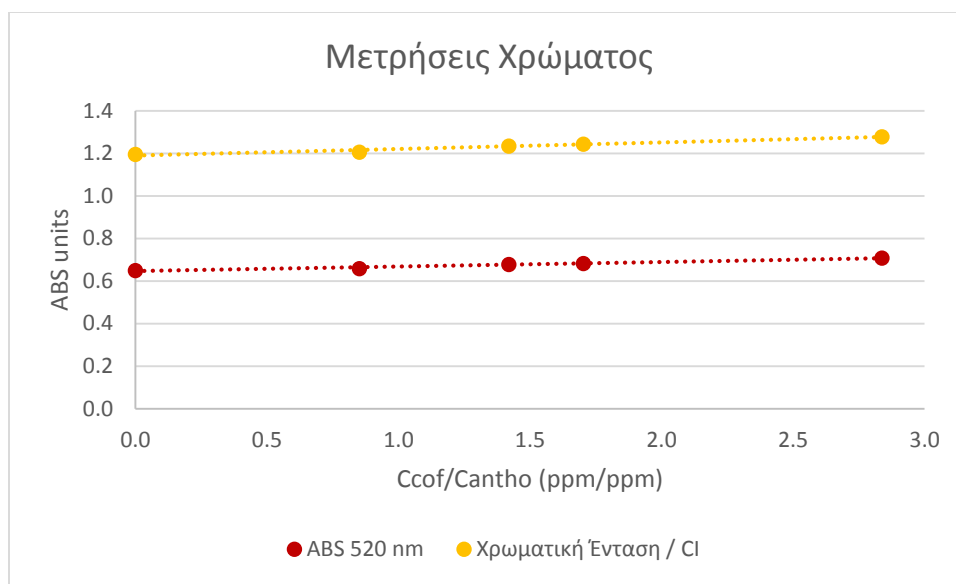
Διάγραμμα 15: Ποσοστό των συμπλοκοποιημένων, των μονομερών και των πολυμερισμένων ανθοκυανών σε διαλύματα εκχυλισμάτων φλοιών με συγκέντρωση ανθοκυανών 123.3 ppm και διαφορετικών συγκεντρώσεων σε πρόσθετο ροσμαρινικό οξύ από 0 έως 350 ppm (Ccof/Cantho: ppm ροσμαρινικού οξέος / ppm ανθοκυανών)



Διάγραμμα 16: Μεταβολή των συμπλοκοποιημένων ανθοκυανών στα εμπλουτισμένα εκχυλίσματα φλοιών (μπλε χρώμα: ποσοστό των συμπλοκοποιημένων ανθοκυανών στο εκχύλισμα φλοιών χωρίς πρόσθετο ροσμαρινικό οξύ, πορτοκαλί χρώμα: ποσοστιαία αύξηση των συμπλοκοποιημένων ανθοκυανών με την προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων ροσμαρινικού οξέος)

Φαίνεται πως το φαινόμενο του σχηματισμού έγχρωμων συμπλόκων αυξάνεται με την αύξηση του πρόσθετου ροσμαρινικού οξέος και μάλιστα σχεδόν γραμμικά ($R^2=0.92$). Παρατηρείται η αναμενόμενη μείωση στο ποσοστό των ελεύθερων ανθοκυανών, αφού είναι αυτές που μπορούν να σχηματίσουν με το ροσμαρινικό οξύ έγχρωμα σύμπλοκα. Επιπλέον, παρατηρείται μία μικρή αύξηση στο ποσοστό των πολυμερισμένων ανθοκυανών, η οποία βρίσκεται εντός των σφαλμάτων της μεθόδου.

Στη συνέχεια, στο Διάγραμμα 17, φαίνεται η μεταβολή της χρωματικής έντασης (CI) των εκχυλισμάτων των φλοιών για τις διαφορετικές περιεκτικότητες σε ροσμαρινικό οξύ, καθώς και η αντίστοιχη απορρόφηση στα 520 nm.



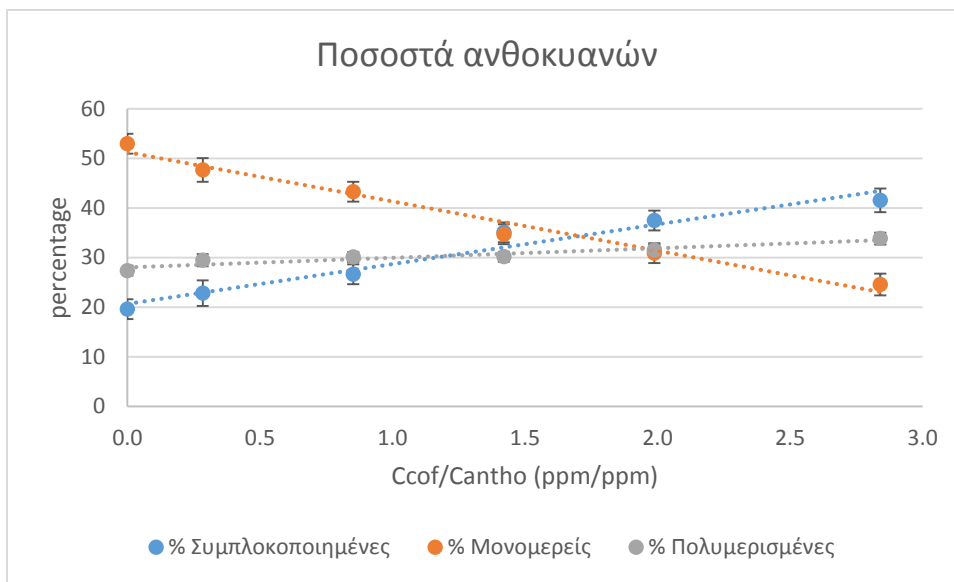
Διάγραμμα 17: Απορρόφηση στα 520 nm των διαφορετικών (ως προς την περιεκτικότητα σε ροσμαρινικό οξύ) διαλυμάτων των εκχυλισμάτων των φλοιών και η αντίστοιχη χρωματική ένταση

Όπως φαίνεται η απορρόφηση στα 520 nm (μήκος κύματος ενδεικτικό για το κόκκινο χρώμα) αυξάνεται γραμμικά ($R^2=0.977$) με την αύξηση της συγκέντρωσης του ροσμαρινικού οξέος, γεγονός αναμενόμενο, καθώς η αύξηση της απορρόφησης σε αυτό το μήκος κύματος αποτελεί απόδειξη της αυξοχρωμικής επίδρασης του φαινομένου του σχηματισμού έγχρωμων συμπλόκων. Επίσης, αυξάνεται και η χρωματική ένταση γραμμικά, και μάλιστα η αύξηση είναι της ίδιας τάξης με αυτή της απορρόφησης στα 520 nm (κλίση ευθείας = 0.031 για χρωματική ένταση έναντι 0.021 για απορρόφηση στα 520 nm). Αυτό σημαίνει ότι η προσθήκη ροσμαρινικού οξέος δεν επηρεάζει αισθητά ούτε την απορρόφηση στα 420 nm, ούτε αυτή στα 620 nm.

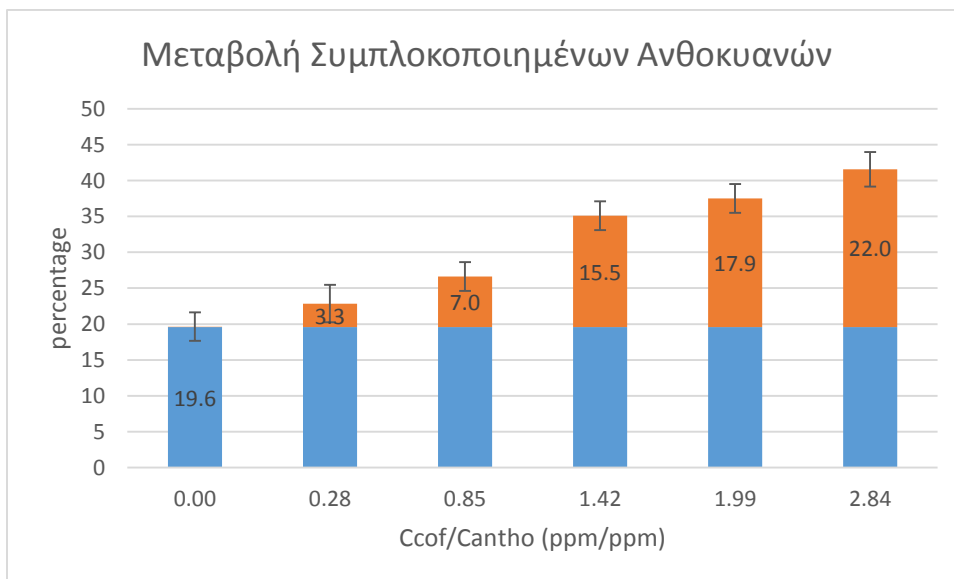
6.2.1.2.2. Προσθήκη αιθανολικού εκχυλίσματος ρίγανης

Η μελέτη της επίδρασης του εκχυλίσματος της ρίγανης στο φαινόμενο σχηματισμού έγχρωμων συμπλόκων πραγματοποιήθηκε σε εκχυλίσματα φλοιών με περιεκτικότητα σε ανθοκυανές 172.5 ± 1.6 ppm και συγκέντρωση αιθανολικού εκχυλίσματος ρίγανης από 0 έως 490 ppm (εκφρασμένη σε ppm ισοδύναμων γαλλικού οξέος). Βάση αυτών, υπολογίστηκε ο λόγος ppm εκχυλίσματος ρίγανης/ppm ανθοκυανών (Ccof/Cantho), ο οποίος πήρε τιμές από 0 έως 2.84, όπως

φαίνεται και στα Διαγράμματα 18 και 19. Στο Διάγραμμα 18 φαίνονται τα ποσοστά των συμπλοκοποιημένων, των μονομερών και των πολυμερισμένων ανθοκυανών των εκχυλισμάτων με διαφορετικές συγκεντρώσεις πρόσθετου εκχυλίσματος ρίγανης, ενώ, αναλυτικότερα, στο Διάγραμμα 19 η μεταβολή των συμπλοκοποιημένων ανθοκυανών σε σχέση με το εκχύλισμα χωρίς πρόσθετα συστατικά.



Διάγραμμα 18: Ποσοστό των συμπλοκοποιημένων, των μονομερών και των πολυμερισμένων ανθοκυανών σε διαλύματα εκχυλισμάτων φλοιών με συγκέντρωση ανθοκυανών 172.5 ppm και διαφορετικών συγκεντρώσεων σε πρόσθετο εκχύλισμα ρίγανης από 0 έως 490 ppm (Ccof/Cantho: ppm πρόσθετου εκχυλίσματος ρίγανης / ppm ανθοκυανών)

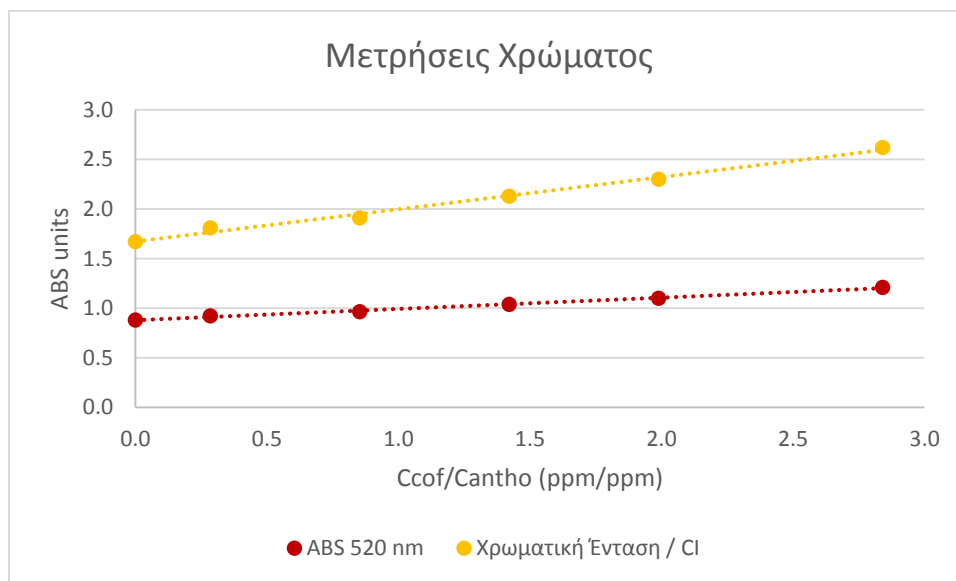


Διάγραμμα 19: Μεταβολή των συμπλοκοποιημένων ανθοκυανών στα εμπλουτισμένα εκχύλισματα φλοιών (μπλε χρώμα: ποσοστό των συμπλοκοποιημένων ανθοκυανών στο εκχύλισμα φλοιών χωρίς πρόσθετο εκχύλισμα ρίγανης, πορτοκαλί χρώμα: ποσοστιαία αύξηση των συμπλοκοποιημένων ανθοκυανών με την προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων εκχυλίσματος ρίγανης)

Φαίνεται, και σε αυτή την περίπτωση, πως το φαινόμενο του σχηματισμού έγχρωμων συμπλόκων αυξάνεται με την αύξηση του πρόσθετου εκχυλίσματος και μάλιστα γραμμικά ($R^2=0.96$). Παρατηρείται, και πάλι, η αναμενόμενη μείωση στο ποσοστό των ελεύθερων ανθοκυανών, αφού είναι αυτές που μπορούν να σχηματίσουν, με τα συστατικά του εκχυλίσματος της ρίγανης, έγχρωμα σύμπλοκα. Επιπλέον, παρατηρείται μία μικρή αύξηση στο ποσοστό των πολυμερισμένων ανθοκυανών, η οποία όμως βρίσκεται μέσα στα σφάλματα της μεθόδου.

Πρέπει να σημειωθεί ότι υπάρχει μεγάλη διαφορά στο ποσοστό των συμπλοκοποιημένων ανθοκυανών στο εκχύλισμα χωρίς πρόσθετα, ανάμεσα σε αυτό το πείραμα και στο προηγούμενο με το ροσμαρινικό οξύ (19.6% και 3% αντίστοιχα). Η διαφορά αυτή δεν ήταν αναμενόμενη καθώς έχει αποδειχθεί παραπάνω ότι για συγκεντρώσεις άνω των 95 ppm ανθοκυανών, το ποσοστό των συμπλοκοποιημένων ανθοκυανών δεν επηρεάζεται. Παρόλα αυτά, η διαφορά αυτή μπορεί να αποδοθεί στο ότι τα εκχυλίσματα των φλοιών που χρησιμοποιήθηκαν στα δύο αυτά πειράματα, ήταν ναί μεν της ίδιας ποικιλίας, αλλά από διαφορετικές παρτίδες και μάλλον στο εκχύλισμα αυτό που προστέθηκε το ροσμαρινικό οξύ, δεν είχαν εκχυλιστεί τόσα πολλά συστατικά που μπορούν να συμπλοκοποιηθούν με τις ανθοκυάνες. Επιπλέον, επειδή η περιεκτικότητα των ανθοκυανών στο εμπλουτισμένο με ροσμαρινικό οξύ εκχύλισμα ήταν χαμηλότερη, υπάρχουν και κάποια επιπλέον σφάλματα στα αποτελέσματα, λόγω των χαμηλών απορροφήσεων στο φασματοφωτόμετρο.

Στη συνέχεια, στο Διάγραμμα 20, φαίνεται η μεταβολή της χρωματικής έντασης (CI) των εκχυλισμάτων των φλοιών για τις διαφορετικές περιεκτικότητες σε εκχύλισμα ρίγανης, καθώς και η αντίστοιχη απορρόφηση στα 520 nm.



Διάγραμμα 20: Απορρόφηση στα 520 nm των διαφορετικών (ως προς την περιεκτικότητα σε πρόσθετο εκχύλισμα ρίγανης) διαλυμάτων των εκχυλισμάτων των φλοιών και η αντίστοιχη χρωματική ένταση

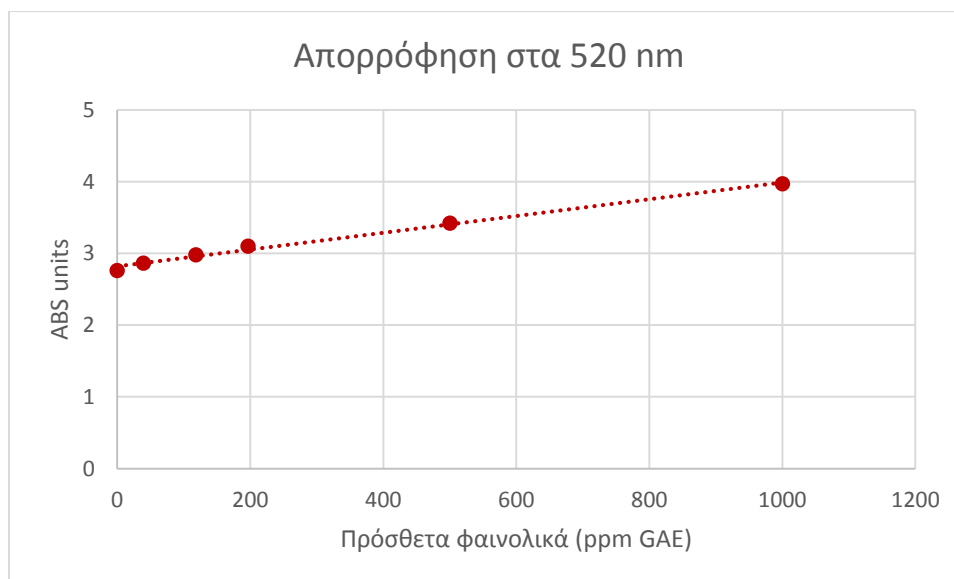
Όπως φαίνεται η απορρόφηση στα 520 nm αυξάνεται γραμμικά ($R^2=0.995$) με την αύξηση της συγκέντρωσης του πρόσθετου εκχυλίσματος ρίγανης, γεγονός αναμενόμενο, καθώς η αύξηση της απορρόφησης σε αυτό το μήκος κύματος αποτελεί απόδειξη της αυξοχρωμικής επίδρασης του

φαινομένου του σχηματισμού έγχρωμων συμπλόκων. Επίσης, η χρωματική ένταση αυξάνεται και αυτή γραμμικά, και μάλιστα πιο έντονα (κλίση ευθείας = 0.325 έναντι 0.114), καθώς η προσθήκη εκχυλίσματος ρίγανης αυξάνει αισθητά και την απορρόφηση στα 420 nm, λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς του σε συστατικά που έχουν υψηλή απορρόφηση σε αυτό το μήκος κύματος.

6.2.2. Εμπλουτισμός του κρασιού με συστατικά που σχηματίζουν έγχρωμα σύμπλοκα με τις ανθοκυάνες

Για τον εμπλουτισμό του κρασιού με συστατικά που σχηματίζουν έγχρωμα σύμπλοκα με τις ανθοκυάνες χρησιμοποιήθηκαν το υδατικό και το αιθανολικό εκχύλισμα από θρούμπι, το αιθανολικό εκχύλισμα από ρίγανη και καθαρό ροσμαρινικό οξύ. Το φρέσκο κρασί που χρησιμοποιήθηκε σε αυτό το πείραμα είχε συγκέντρωση ανθοκυανών 508 ± 5.3 ppm, όπως αυτή προσδιορίστηκε μέσω της φασματοφωτομετρικής μεθόδου.

Η ενσωμάτωση στο κρασί του υδατικού εκχυλίσματος από θρούμπι έγινε με βάση τα ολικά φαινολικά της σκόνης που προέκυψε μετά τη λυοφιλίωση. Μέσω της μεθόδου Folin - Ciocalteu η συγκέντρωσή τους στο ξηρό εκχύλισμα υπολογίστηκε ίση με 196696 ppm GAE. Στο Διάγραμμα 21 φαίνεται η απορρόφηση στα 520 nm των κρασιών με διαφορετικές συγκεντρώσεις σε εκχύλισμα από θρούμπι, εκφρασμένες ως ppm ολικών φαινολικών (TP).



Διάγραμμα 21: Απορρόφηση στα 520 nm των κρασιών με διαφορετικές συγκεντρώσεις σε πρόσθετο υδατικό εκχύλισμα από θρούμπι (προσθήκη ως προς ολικά φαινολικά - ppm GAE)

Η απορρόφηση στα 520 nm, όπως φαίνεται, αυξάνεται γραμμικά ($R^2=0.993$) με την αύξηση της συγκέντρωσης του υδατικού εκχυλίσματος στο κρασί. Όμως, παρατηρήθηκε ότι με την επαναδιαλυτοποίησή της σκόνης αυτής σε αιθανολικό διάλυμα 12.5% (v/v), προέκυψε διάλυμα καστανέρυθρου χρώματος, το οποίο είχε σημαντική απορρόφηση στα 520 nm, και άρα δεν μπορεί να θεωρηθεί ότι αυτή η αύξηση που παρατηρείται σε αυτό το μήκος κύματος οφείλεται μόνο στην

αυξοχρωμική επίδραση του φαινομένου του σχηματισμού έγχρωμων συμπλόκων. Στη συνέχεια, η σκόνη αυτή της λυοφιλίωσης προστέθηκε σε καθαρή αιθανόλη, ώστε να ανακτηθούν κάποια φαινολικά συστατικά και όχι τα συστατικά εκείνα που έχουν απορρόφηση στα 520 nm. Το αποτέλεσμα ήταν σχεδόν όλη η σκόνη να μείνει ως ίζημα στο διάλυμα, και το αιώρημα να παραμένει διάφανο. Τα ολικά φαινολικά του παραπάνω διαλύματος μετρήθηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο Folin – Ciocalteu, και φάνηκε ότι μόνο το 2.5% των ολικών φαινολικών είχε ανακτηθεί με αυτόν τον τρόπο. Έτσι, το υδατικό εκχύλισμα από το θρούμπι απορρίφθηκε για την ενσωμάτωση σε κρασί και την μελέτη του φαινομένου του σχηματισμού έγχρωμων συμπλόκων κατά την αποθήκευσή το κρασιού.

Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε αιθανολικό εκχύλισμα από θρούμπι, από το οποίο απομακρύνθηκαν οι χλωροφύλλες. Το εκχύλισμα, μετά τη διαβίβασή του από την στήλη του ενεργού άνθρακα, είχε κίτρινο χρώμα και η απορρόφησή του στα 520 nm ήταν μηδενική. Επίσης, υπολογίστηκε, σύμφωνα με τη μέθοδο Folin - Ciocalteu ότι με αυτό τον τρόπο ανακτήθηκε το 79.2% των ολικών φαινολικών.

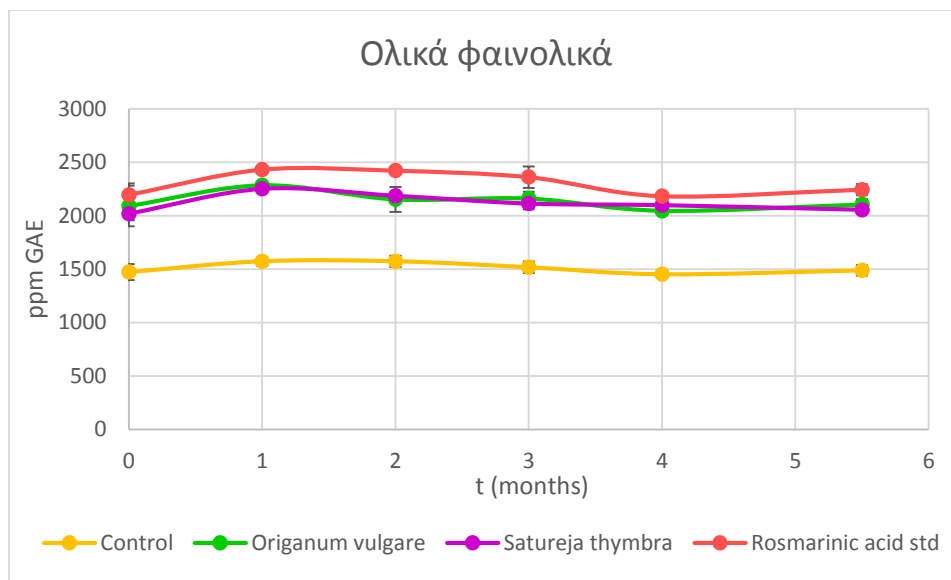
Τελικά, συσκευάστηκαν εμπλουτισμένα κρασιά με αιθανολικό εκχύλισμα από θρούμπι, από ρίγανη και με ροσμαρινικό οξύ. Στον Πίνακα 7 που ακολουθεί φαίνονται οι συγκεντρώσεις μερικών συστατικών των δύο αιθανολικών εκχυλισμάτων στο κρασί, όπως αυτά προέκυψαν μετά την ενσωμάτωσή τους. Τα ολικά φαινολικά προσδιορίστηκαν μέσω της μεθόδου Folin-Ciocalteu, ενώ όλα τα υπόλοιπα μέσω της HPLC.

Πίνακας 7: Σύσταση των αιθανολικών εκχυλισμάτων του θρούμπι και της ρίγανης στο κρασί (ολικά φαινολικά: ισοδύναμα γαλλικού οξέος, ροσμαρινικό-λιθοσπερμικό-σαλβιανολικό οξύ: ισοδύναμα ροσμαρινικού οξέος, λουτεολίνη: ισοδύναμα κερκετίνης)

	Origanum vulgare	Satureja thymbra
Ολικά φαινολικά	645 ± 90 ppm	628 ± 86 ppm
Ροσμαρινικό οξύ	417.6 ± 3 ppm	333 ± 2 ppm
Λιθοσπερμικό οξύ	35.2 ± 0.6 ppm	57.8 ± 0.8 ppm
Σαλβιανολικό οξύ	36.2 ± 0.5 ppm	91.3 ± 1.3 ppm
Μη ταυτοποιημένο σύνθετο φαινολικό οξύ	26.5 ± 0.3 ppm	-
Σύνολο κινναμωμικών οξέων	515.5 ppm	482.1 ppm
Λουτεολίνη	16.9 ± 0.2 ppm	13.3 ± 0.2 ppm

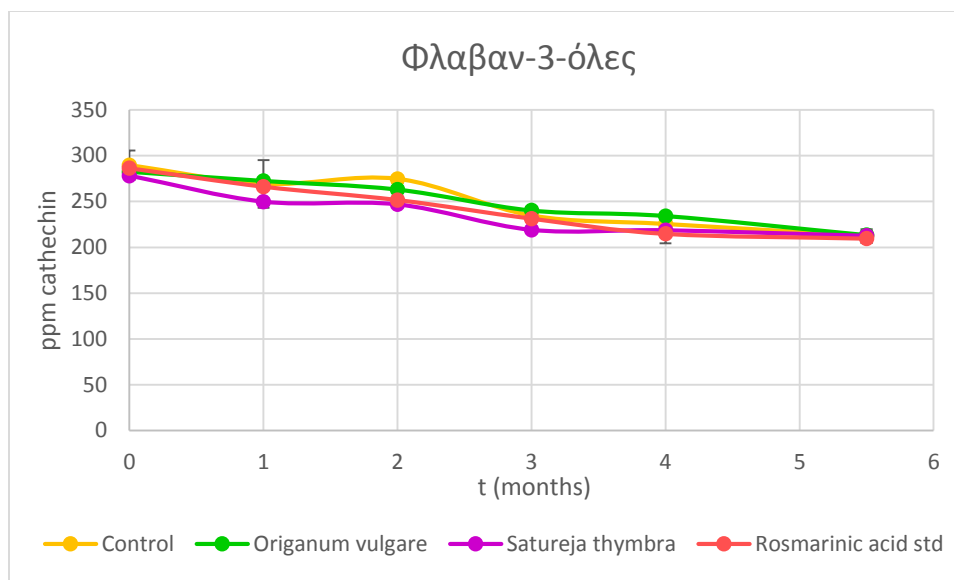
Παρατηρείται ότι τα δύο εκχυλίσματα έχουν σχεδόν την ίδια περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά στο κρασί και μάλιστα τα κινναμωμικά οξέα αποτελούν το 80% των ολικών φαινολικών του εκχυλίσματος της ρίγανης και το 77% αυτών του εκχυλίσματος από θρούμπι. Το υπόλοιπο ποσοστό αποτελείται από φλαβονόλες και φλαβόνες, κυρίως λουτεολίνη. Το ροσμαρινικό οξύ είναι το κύριο κινναμωμικό οξύ των δύο εκχυλισμάτων, καταλαμβάνοντας το 81% των κινναμωμικών οξέων στο εκχύλισμα της ρίγανης και το 69% στο εκχύλισμα του θρούμπι. Επομένως, αν λάβουμε υπόψη ότι στο εμπλουτισμένο κρασί με ροσμαρινικό οξύ περιέχει 709.7 ppm ροσμαρινικού οξέος (100%), τότε το εμπλουτισμένο κρασί με εκχύλισμα ρίγανης περιέχει 59% και αυτό με εκχύλισμα από θρούμπι 47% ροσμαρινικό οξύ.

Παρακάτω θα παρουσιαστούν τα αποτελέσματα για την συμπεριφορά των τριών εμπλουτισμένων κρασιών, αλλά και του κρασιού αναφοράς, κατά την αποθήκευσή τους σε ατμόσφαιρα CO₂-N₂ σε αναλογία 1:1. Σε όλα τα διαγράμματα το κρασί αναφοράς, χωρίς την προσθήκη συστατικών, αναφέρεται ως Control, το εμπλουτισμένο με εκχύλισμα ρίγανης κρασί ως *Origanum vulgare*, το εμπλουτισμένο με εκχύλισμα από θρούμπι *Satureja thymbra* και αυτό με πρόσθετο ροσμαρινικό οξύ *Rosmarinic acid std.* Στο Διάγραμμα 22, φαίνεται η περιεκτικότητα του δείγματος αναφοράς και των εμπλουτισμένων κρασιών σε ολικά φαινολικά και οι μεταβολές τους σε διάστημα αποθήκευσης 5.5 μηνών.



Διάγραμμα 22: Περιεκτικότητα των κρασιών σε ολικά φαινολικά εκφρασμένη σε ppm ισοδύναμων γαλλικού οξέος σε συνάρτηση με τον χρόνο

Όπως φαίνεται τα ολικά φαινολικά παραμένουν πρακτικά σταθερά σε αυτό το χρονικό διάστημα, εφόσον οι αντιδράσεις που συμβαίνουν κατά την αποθήκευση του κρασιού είναι κυρίως αντιδράσεις πολυμερισμού και όχι οξειδωσης. Συγκεκριμένα, ενώ το κρασί αναφοράς περιέχει 1554 ± 51 ppm, το εμπλουτισμένο κρασί με εκχύλισμα ρίγανης περιέχει 2199 ± 74 ppm (αύξηση κατά 645 ± 90), με εκχύλισμα θρούμπι 2182 ± 69 ppm (αύξηση κατά 628 ± 86) και με ροσμαρινικό οξύ 2305 ± 112 ppm (αύξηση κατά 751 ± 123 ppm). Επομένως, όντως πραγματοποιήθηκε εμπλουτισμός του κρασιού σε ολικά φαινολικά κατά περίπου 700 ppm. Ύστερα από την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων με one-way ANOVA ($p < 0.05$) και δοκιμή Duncan, λαμβάνοντας υπόψη τις διπλές δειγματοληψίες, τα τρία εμπλουτισμένα κρασιά δεν εμφάνισαν σημαντικές διαφορές όσο αναφορά το φαινολικό τους φορτίο, και ξεχώρισαν από το κρασί αναφοράς. Στο Διάγραμμα 23 φαίνεται η συγκέντρωση των 4 κρασιών σε φλαβαν-3-όλες σε συνάρτηση με τον χρόνο αποθήκευσης.



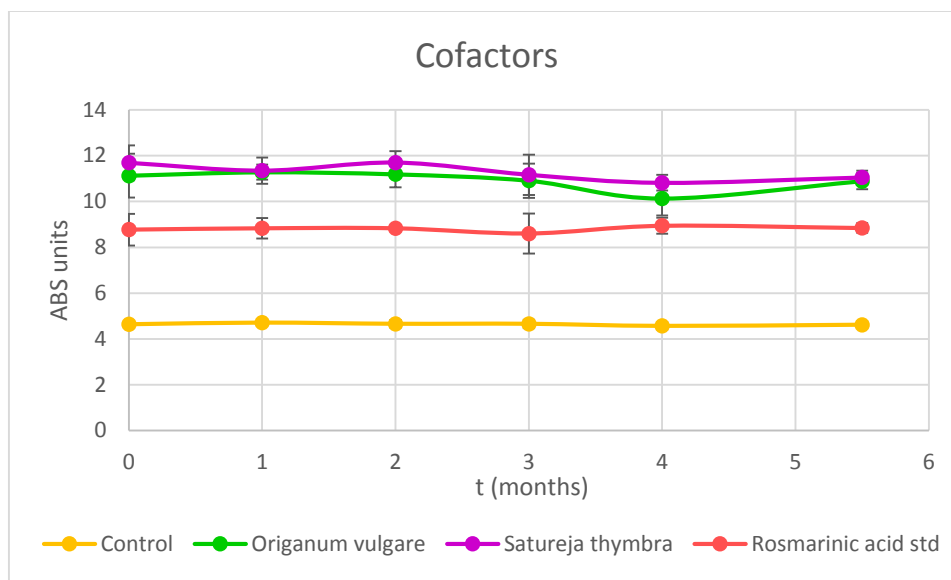
Διάγραμμα 23: Περιεκτικότητα των κρασιών σε φλαβαν-3-όλες εκφρασμένη σε ppm ισοδύναμων κατεχίνης σε συνάρτηση με τον χρόνο αποθήκευσης

Παρατηρείται ότι τα εμπλουτισμένα κρασιά δεν παρουσιάζουν υψηλότερο φορτίο φλαβαν-3-ολών, και άρα τα εκχυλίσματα δεν περιείχαν τέτοια συστατικά. Η μικρή μείωσή τους που παρατηρείται κατά τη πάροδο του χρόνου μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι ένα μέρος τους οξειδώθηκε, το οποίο μάλλον είναι ασήμαντο σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Διαγράμματος 22 (όπου τα ολικά φαινολικά παραμένουν σταθερά με το χρόνο), αλλά κυρίως οφείλεται στο ότι η μέθοδος DMACA εμφανίζει αρνητική απόκλιση από την πραγματικότητα καθώς αυξάνεται ο πολυμερισμός των προκυανιδινών (Delcour & Varebeke 1985).

6.2.2.1. Εξέλιξη φαινομένου συμπλοκοποίησης ανθοκυανών

Για την μελέτη της εξέλιξης του φαινομένου σχηματισμού έγχρωμων συμπλόκων κατά τη διάρκεια των 5.5 μηνών της αποθήκευσης των τεσσάρων σειρών κρασιών μετρήθηκαν τα ποσοστά των συμπλοκοποιημένων, των μονομερών και των πολυμερισμένων ανθοκυανών ανά τακτά χρονικά διαστήματα.

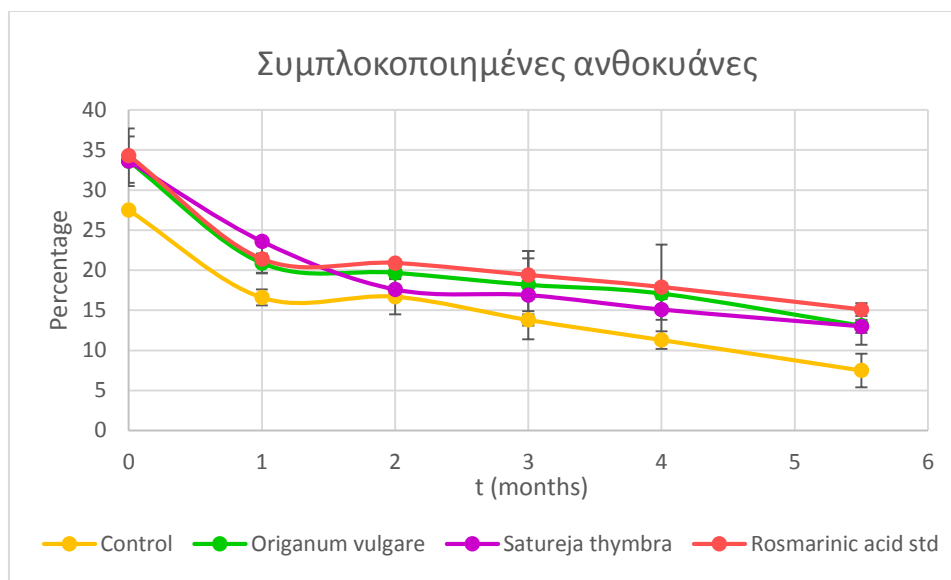
Στο Διάγραμμα 24 φαίνεται το περιεχόμενο των κρασιών σε συστατικά (cofactors), όπως φαινολικά οξέα και φλαβονόλες, που μπορούν να σχηματίσουν έγχρωμα σύμπλοκα, μέσω του αντίστοιχου φαινομένου, με τις ανθοκυάνες, και έχουν απορρόφηση στα 365 nm, όπως προσδιορίστηκε από τη μέθοδο του Boulton (2001). Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε μονάδες απορρόφησης, και άρα δεν γίνεται ποσοτικός προσδιορισμός.



Διάγραμμα 24: Περιεχόμενο των κρασιών σε συστατικά που μπορούν να σχηματίσουν έγχρωμα σύμπλοκα με τις ανθοκυάνες σε συνάρτηση με τον χρόνο αποθήκευσης

Όπως παρατηρείται η ποσότητα των συστατικών αυτών παραμένει σταθερή με τον χρόνο και συγκεκριμένα, ενώ το κρασί αναφοράς περιέχει 4.64 ± 0.05 , το κρασί με πρόσθετο ροσμαρινικό οξύ περιέχει 8.8 ± 0.27 , με ρίγανη 10.92 ± 0.25 και με θρούμπι 11.3 ± 0.23 . Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων αυτών με one-way ANOVA ($p < 0.05$) και δοκιμή Duncan, ξεχώρισε τα εμπλουτισμένα κρασιά των δύο εκχυλισμάτων από αυτό του ροσμαρινικού οξέος, και τα τρία αυτά από το κρασί αναφοράς. Η μεγαλύτερη τιμή που παρουσίασαν τα δύο εμπλουτισμένα με εκχυλίσματα αρωματικών φυτών κρασιά σε σχέση με αυτό του ροσμαρινικού οξέος οφείλεται στο γεγονός ότι τα φαινολικά συστατικά αυτά που περιέχονται στα εκχυλίσματα των δύο αρωματικών φυτών έχουν υψηλότερη απορρόφηση στα 365 nm σε σχέση με το ροσμαρινικό οξύ. Συγκεκριμένα, τα εκχυλίσματα περιέχουν επιπλέον φλαβονόλες, οι οποίες έχουν μέγιστο απορρόφησης στα 360 nm, ενώ τα κινναμωμικά οξέα στα 320 nm.

Στη συνέχεια, παρατίθεται το Διάγραμμα 25, όπου παρουσιάζεται το ποσοστό των συμπλοκοποιημένων ανθοκυανών των κρασιών και η εξέλιξή τους σε συνάρτηση με τον χρόνο αποθήκευσης.



Διάγραμμα 25: Ποσοστό των συμπλοκοποιημένων ανθοκυανών του κρασιού σε συνάρτηση με τον χρόνο αποθήκευσης

Με την προσθήκη των εκχυλισμάτων ή του ροσμαρινικού οξέος στο φρέσκο κρασί παρατηρήθηκε αύξηση των συμπλοκοποιημένων ανθοκυανών κατά 6.1% και 6.8% αντίστοιχα. Αυτή η μικρή διαφορά είναι εντός των σφαλμάτων της μεθόδου, και μάλιστα η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων με one-way ANOVA ($p < 0.05$) και δοκιμή Duncan έδειξε ότι δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των εμπλουτισμένων κρασιών και ξεχώρισε το κρασί αναφοράς από αυτά. Το ροσμαρινικό οξύ, το οποίο είναι το 59% των συστατικών που περιέχονται στο εκχύλισμα της ρίγανης και το 47% στο εκχύλισμα από θρούμπι, είναι ένα σύνθετο φαινολικό οξύ που σχηματίζει έγχρωμα σύμπλοκα με τις ανθοκυάνες, και μάλιστα σε έρευνα που έχει διεξαχθεί, έδειξε την υψηλότερη ενίσχυση του φαινομένου σχηματισμού έγχρωμων συμπλόκων σε σχέση με άλλα φαινολικά οξέα που χρησιμοποιήθηκαν (σιναιπικό και φερουλικό οξύ) (Maarit Rein 2005). Τα πρόσθετα εκχυλίσματα των αρωματικών φυτών ενίσχυσαν το φαινόμενο του σχηματισμού έγχρωμων συμπλόκων όσο και το πρόσθετο ροσμαρινικό οξύ, παρά τη μικρότερη περιεκτικότητά τους σε ροσμαρινικό οξύ, και επομένως μερικά από τα υπόλοιπα φαινολικά που περιέχονταν στα εκχυλίσματα, σχημάτισαν και αυτά έγχρωμα σύμπλοκα. Πράγματι, μέσα στα συστατικά που μπορούν να ενωθούν με τις ανθοκυάνες, μέσω του φαινομένου των έγχρωμων συμπλόκων, περιέχονται τα κινναμωμικά οξέα καθώς και οι φλαβονόλες, των οποίων η περιεκτικότητα φτάνει το 20% στα εκχυλίσματα (He et al. 2012).

Κατά την αποθήκευση παρατηρείται μία απότομη μείωση των συμπλοκοποιημένων ανθοκυανών κατά τον πρώτο μήνα, ενώ στην συνέχεια η μείωση συνεχίζεται αλλά με πολύ μικρότερο ρυθμό. Αυτή η αρχική μείωση, εν μέρει, μπορεί να οφείλεται στο ότι ένα μέρος των θειωδών του κρασιού αποδεδεσμεύτηκε από τις ανθοκυάνες στην συγκεκριμένη ατμόσφαιρα αποθήκευσης, αυξάνοντας έτσι την απορρόφηση του αραιωμένου κρασιού A^{20} , και συνεπώς μειώνοντας το λόγο $(A^{acet} - A^{20}) / A^{acet}$, που αντιπροσωπεύει το ποσοστό των συμπλοκοποιημένων ανθοκυανών του κρασιού. Πράγματι, στο ίδιο κρασί με το κρασί αναφοράς, το οποίο όμως ήταν

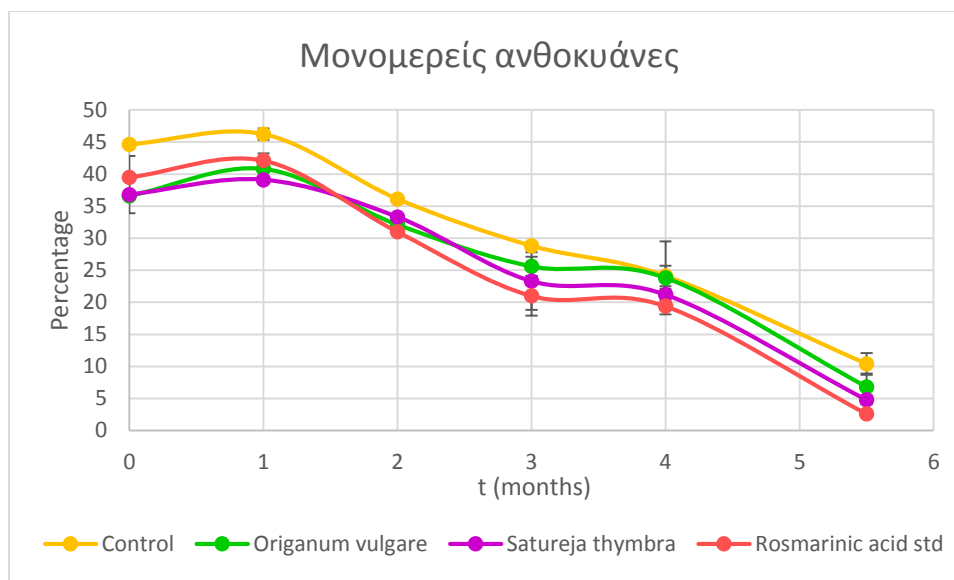
αποθηκευμένο απουσία κάποιου αερίου (σε μεταλλικό ασκό κρασιού), οι συμπλοκοποιημένες ανθοκυάνες στο τέλος του πρώτου μήνα αποθήκευσης μειώθηκαν κατά περίπου 4%, ενώ στην περίπτωση του κρασιού αναφοράς μειώθηκαν κατά 10.9%.

Αν δεν ληφθεί υπόψη ο πρώτος μήνας αποθήκευσης, λόγω της παραπάνω παρατήρησης, οι συμπλοκοποιημένες ανθοκυάνες των κρασιών μειώνονται γραμμικά με τον χρόνο ($R^2 > 0.95$) στο κρασί αναφοράς, στο εμπλουτισμένο με εκχύλισμα ρίγανης και σε αυτό με ροσμαρινικό οξύ και σχεδόν γραμμικά ($R^2 = 0.86$) στο εμπλουτισμένο με εκχύλισμα από θρούμπι κρασί, έως το τέλος του πειράματος. Έτσι, μέσω γραμμικής παλινδρόμησης, οι ρυθμοί μείωσης (%απώλεια συμπλοκοποιημένων ανθοκυανών ανά μήνα) που προέκυψαν ήταν: 2.17 ± 0.29 για το κρασί αναφοράς, 1.68 ± 0.19 για το κρασί με εκχύλισμα ρίγανης, 2.12 ± 0.49 για το κρασί με εκχύλισμα από θρούμπι και 1.44 ± 0.15 για το κρασί με πρόσθετο ροσμαρινικό οξύ. Παρατηρείται ότι ο ρυθμός απώλειας κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα, λόγω των υψηλών σφαλμάτων, γεγονός που επιβεβαιώνεται από την στατιστική επεξεργασία τους με one-way ANOVA ($p < 0.05$), αφού δεν βρέθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των αποτελεσμάτων αυτών.

Συνολικά, στο τέλος του πειράματος, δηλαδή μετά την πάροδο 5.5 μηνών, η μείωση των συμπλοκοποιημένων ανθοκυανών έφτασε και στα 4 κρασιά περίπου το 20%. Συγκεκριμένα, το κρασί αναφοράς είχε 7.5% συμπλοκοποιημένες ανθοκυάνες, το κρασί με πρόσθετο ροσμαρινικό οξύ 15.1%, το κρασί με εκχύλισμα ρίγανης 13.1% και το κρασί με εκχύλισμα από θρούμπι 13%.

Όσον αφορά την εξέλιξη των συμπλοκοποιημένων ανθοκυανών του κρασιού αναφοράς, μπορεί να συγκριθεί με αντίστοιχες έρευνες της βιβλιογραφίας. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με την έρευνα των Hermosín-Gutiérrez et al. (2005), κρασί της ποικιλίας Cabernet μετά το τέλος της μηλογαλακτικής ζύμωσης είχε 42.6% συμπλοκοποιημένες ανθοκυάνες, ενώ μετά από 3 μήνες παλαιώσης το ποσοστό αυτό έπεσε στο 24.6% (μείωση κατά 18%), ενώ κρασί της ποικιλίας Syrah είχε αρχικά 44.2% και μετά από 3 μήνες 34.3% (μείωση κατά 9.9%). Τα αποτελέσματα αυτά της μείωσης των συμπλοκοποιημένων ανθοκυανών είναι της ίδιας τάξης με αυτά του παρόντος πειράματος, καθώς στο χρόνο μηδέν το κρασί ποικιλίας Merlot είχε 27.5%, ενώ μετά από 3 μήνες 13.8% (μείωση κατά 13.7%). Τα μικρότερα βέβαια ποσοστά των συμπλοκοποιημένων ανθοκυανών του κρασιού του παρόντος πειράματος, ίσως οφείλονται στο ότι ο χρόνος μηδέν του συγκεκριμένου πειράματος ήταν 1.5 με 2 μήνες μετά το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης, και όχι αμέσως μετά. Επίσης, έχει αναφερθεί από τον Dobrei et al. (2010) ότι κρασί της ποικιλίας Merlot είχε αρχικά 35.5% συμπλοκοποιημένες ανθοκυάνες, ενώ μετά την πάροδο 4 μηνών είχε 32.4% (μείωση κατά 3.1%), το οποίο έχει μεγάλη διαφορά από τα αποτελέσματα του παρόντος πειράματος, αφού η μείωση στους 4 πρώτους μήνες ήταν 16.2%.

Στη συνέχεια παρουσιάζεται το Διάγραμμα 26, όπου φαίνεται το ποσοστό ελεύθερων (μονομερών) ανθοκυανών των κρασιών σε συνάρτηση με τον χρόνο αποθήκευσης.



Διάγραμμα 26: Ποσοστό των μονομερών ανθοκυανών του κρασιού σε συνάρτηση με τον χρόνο αποθήκευσης

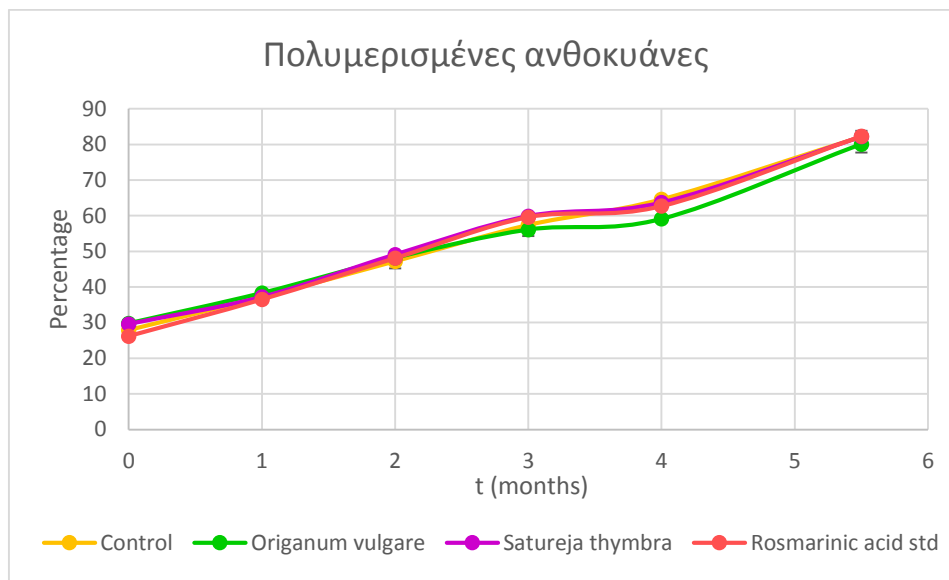
Κατά τον πρώτο μήνα της αποθήκευσης του κρασιού παρατηρείται ότι οι ελεύθερες ανθοκυάνες αυξάνονται ελάχιστα, γεγονός το οποίο έρχεται σε αντίθεση με την πραγματικότητα, όπου η συγκέντρωση των ανθοκυανών στο κρασί ξεκινά να μειώνεται αμέσως μετά την εκχύλισή τους λόγω των αντιδράσεων πολυμερισμού στις οποίες συμμετέχουν. Όμως, κατά τον πρώτο μήνα, όπως ήδη προαναφέρθηκε, η αποδέσμευση των θειωδών υπό την ατμόσφαιρα αποθήκευσης, προκαλεί μία αύξηση στη συγκέντρωση των ελεύθερων ανθοκυανών, η οποία υπερκαλύπτει την μείωσή τους, με αποτέλεσμα το ποσοστό των ελεύθερων ανθοκυανών κατά τον πρώτο μήνα αποθήκευσης να αυξάνεται, αντί να μειώνεται.

Στη συνέχεια, μέχρι και το τέλος του πειράματος, η μείωση των ελεύθερων ανθοκυανών είναι, όπως φαίνεται, γραμμική ($R^2 > 0.96$ για όλα τα κρασιά) και τελικά τείνουν να εξαλειφθούν. Μέσω γραμμικής παλινδρόμησης προσδιορίστηκαν οι ρυθμοί μείωσης των ελεύθερων ανθοκυανών (% απώλεια μονομερών ανθοκυανών ανά μήνα): 7.62 ± 0.46 για το κρασί αναφοράς, 7.03 ± 0.85 για το κρασί με εκχύλισμα ρίγανης, 7.42 ± 0.74 για το κρασί με εκχύλισμα από θρούμπι και 8.27 ± 0.86 για το κρασί με πρόσθετο ροσμαρινικό οξύ. Παρατηρείται ότι ο ρυθμός απώλειας κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα, λόγω των υψηλών σφαλμάτων, γεγονός που επιβεβαιώνεται από την στατιστική επεξεργασία τους με one-way ANOVA ($p < 0.05$), αφού δεν βρέθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των αποτελεσμάτων αυτών.

Συνολικά, οι ελεύθερες ανθοκυάνες του κρασιού αναφοράς ήταν αρχικά 46.2%, ενώ με την πάροδο των 5.5 μηνών μειώθηκαν στο 10.4%. Αντίστοιχα, αυτές του κρασιού με πρόσθετο εκχύλισμα ρίγανης μειώθηκαν από 40.8% σε 6.8%, αυτές του κρασιού με πρόσθετο εκχύλισμα από θρούμπι από 39.1% σε 4.8% και αυτές του κρασιού με πρόσθετο ροσμαρινικό οξύ από 39.5% σε 2.6%. Το ότι τα τρία εμπλουτισμένα κρασιά παρουσιάζουν χαμηλότερα ποσοστά μονομερών ανθοκυανών σε σχέση με το κρασί αναφοράς κατά την διάρκεια της αποθήκευσης, οφείλεται στο ότι ένα μέρος των ελεύθερων ανθοκυανών του κρασιού συμμετέχει στο φαινόμενο σχηματισμού

έγχρωμων συμπλόκων με τα προστιθέμενα συστατικά, και άρα η συγκέντρωση των μονομερών ανθοκυανών είναι μικρότερη.

Στο Διάγραμμα 27, φαίνεται το ποσοστό των πολυμερισμένων ανθοκυανών των κρασιών σε συνάρτηση με τον χρόνο αποθήκευσης.



Διάγραμμα 27: Ποσοστό των πολυμερισμένων ανθοκυανών σε συνάρτηση με τον χρόνο αποθήκευσης

Όπως παρατηρείται το ποσοστό των πολυμερισμένων ανθοκυανών στο κρασί στον χρόνο μηδέν είναι περίπου 28%, και ο εμπλουτισμός του με συστατικά που μπορούν να συμπλοκοποιηθούν με τις ανθοκυάνες, δεν επιφέρει κάποια αλλαγή στο ποσοστό αυτό. Όπως μπορεί να διαπιστωθεί ο πολυμερισμός των ανθοκυανών αυξάνεται γραμμικά με το χρόνο ($R^2 > 0.96$ για όλα τα κρασιά) κατά τη διάρκεια αυτού του πειράματος. Συγκεκριμένα, οι ρυθμοί αύξησης (% αύξηση των πολυμερισμένων ανθοκυανών ανά μήνα), όπως προέκυψαν μέσω γραμμικής παλινδρόμησης, ήταν: 9.81 ± 0.38 για το κρασί αναφοράς, 8.72 ± 1.0 για το κρασί με εκχύλισμα ρίγανης, 9.55 ± 0.75 για το κρασί με εκχύλισμα από θρούμπι και 9.71 ± 0.84 για το κρασί με ροσμαρινικό οξύ. Παρατηρείται ότι ο ρυθμός αύξησης κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα, λόγω των υψηλών σφαλμάτων, γεγονός που επιβεβαιώνεται από την στατιστική επεξεργασία τους με one-way ANOVA ($p < 0.05$), αφού δεν βρέθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των αποτελεσμάτων αυτών. Τελικά, μετά από διάστημα 5.5 μηνών, περίπου το 80% των ανθοκυανών που περιέχονται στο κρασί αναφοράς, και στα κρασιά με πρόσθετο ροσμαρινικό οξύ, εκχύλισμα θρούμπι, και εκχύλισμα ρίγανης είναι πολυμερισμένες.

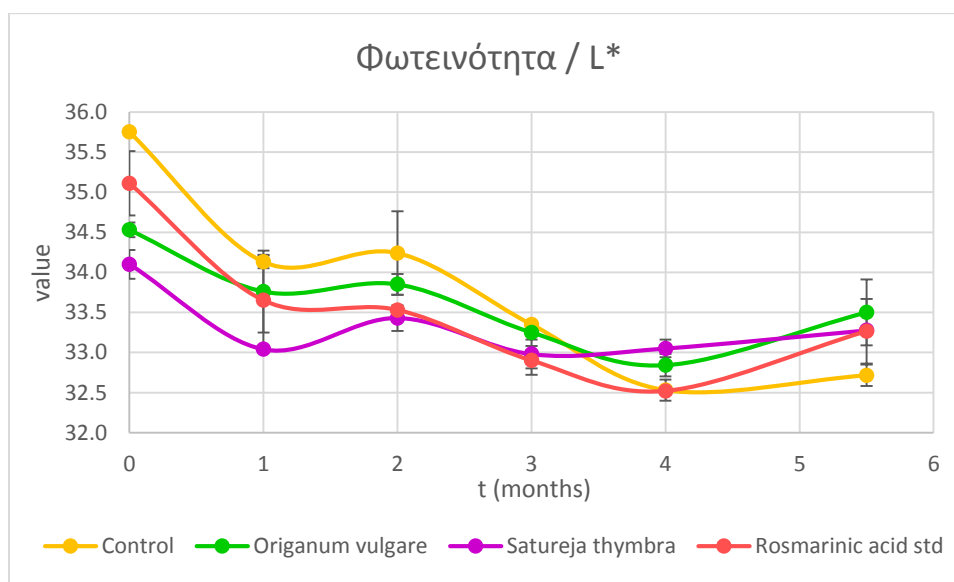
Συγκεντρωτικά, παρατηρείται ότι ενώ οι πολυμερισμένες ανθοκυάνες αυξάνονται γραμμικά με τον χρόνο, οι συμπλοκοποιημένες και οι ελεύθερες ανθοκυάνες μειώνονται, όπως ήδη έχει αναφερθεί και στην διεθνή βιβλιογραφία (Hermosín-Gutiérrez et al. 2005, Dobrei et al. 2010). Καθώς το κρασί παλαιώνει οι ελεύθερες ανθοκυάνες αντιδρούν ώστε να σχηματίσουν πολυμερείς έγχρωμες ενώσεις, και αυτό μεταβάλλει την ισορροπία αφού πρέπει να αναπληρωθούν οι ελεύθερες ανθοκυάνες, και έτσι απελευθερώνονται αυτές των έγχρωμων συμπλόκων. Γι' αυτό,

καθώς το κρασί παλαιώνει τα έγχρωμα σύμπλοκα τείνουν να σπάνε και μειώνεται το ποσοστό τους στο κρασί, ώστε να επιτευχθεί αυτή η ισορροπία (Mirabel & Saucier 1999).

6.2.2.2. Εξέλιξη χρώματος μέσω χρωματόμετρου CIELAB

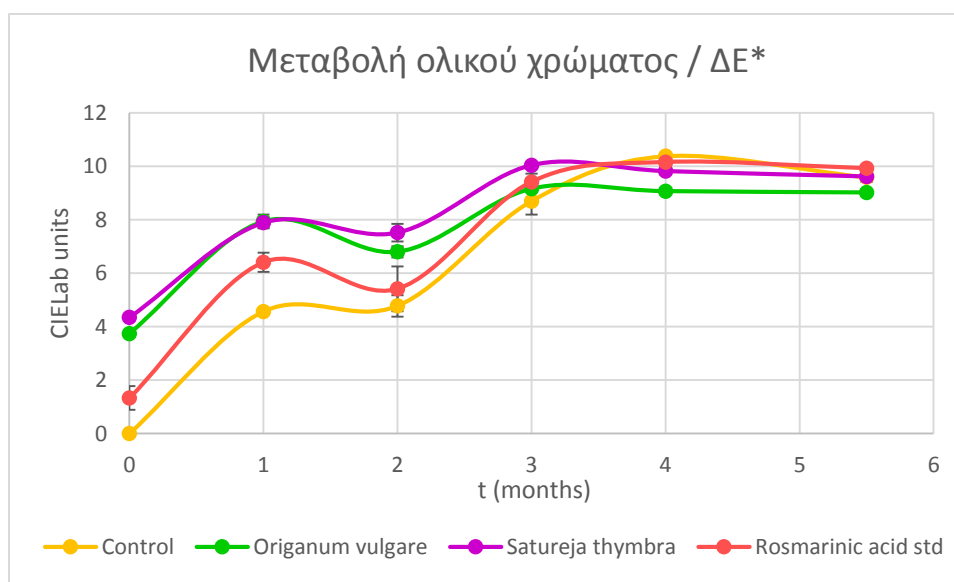
Το χρωματικό μοντέλο CIELab παρουσιάστηκε από την CIE το 1976. Πρόκειται για ένα ομοιόμορφο οπτικά χρωματικό χώρο (uniform color space) ο οποίος προσομοιάζει καλύτερα από όλα τα χρωματικά συστήματα ή μοντέλα στην ανθρώπινη αντίληψη των χρωματικών διαφορών. Το κάθε χρώμα περιγράφεται από 3 παράγοντες (χρωματικές συντεταγμένες), όπως και στον χρωματικό χώρο RGB. Στο σύστημα CIELab οι χρωματικές συντεταγμένες ονομάζονται L^* , a^* και b^* και απεικονίζονται σε τρισδιάστατο καρτεσιανό σύστημα συντεταγμένων. Ο παράγοντας L^* (Lightness) αντιπροσωπεύει τη φωτεινότητα της εικόνας παίρνοντας τιμές από 0 (μαύρο) έως 100 (λευκό) ενώ οι παράγοντες a^* και b^* την πληροφορία χρώματος. Θετικές τιμές του a^* αντιπροσωπεύουν αποχρώσεις του κόκκινου. Αρνητικές τιμές του a^* αντιπροσωπεύουν αποχρώσεις του πράσινου. Θετικές τιμές του b^* αντιπροσωπεύουν αποχρώσεις του κίτρινου. Αρνητικές τιμές b^* αντιπροσωπεύουν αποχρώσεις του μπλε. Με βάση τις τρεις αυτές παραμέτρους μπορούν να υπολογιστούν το ΔE^* (μεταβολή ολικού χρώματος), και το h^* (απόχρωση) (Birse et al. 2007, Garcia - Marino et al. 2013, Pérez - Magarino et al. 2003, Χατζής 2007).

Στα Διαγράμματα 28, 29 και 30 φαίνεται η εξέλιξη του χρώματος του κόκκινου κρασιού αναφοράς, καθώς και των τριών εμπλουτισμένων. Συγκεκριμένα, στο Διάγραμμα 28 φαίνεται η φωτεινότητα (L^*) και στο Διάγραμμα 29 η μεταβολή του ολικού χρώματος (ΔE^*) των κρασιών σε συνάρτηση με τον χρόνο, με την διαφορά αυτή να εκφράζεται ως προς το χρώμα το κρασιού αναφοράς στον χρόνο μηδέν. Τέλος, στο Διάγραμμα 30, παρουσιάζεται η απόχρωση (h^*).



Διάγραμμα 28: Φωτεινότητα (L^) των κρασιών συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης*

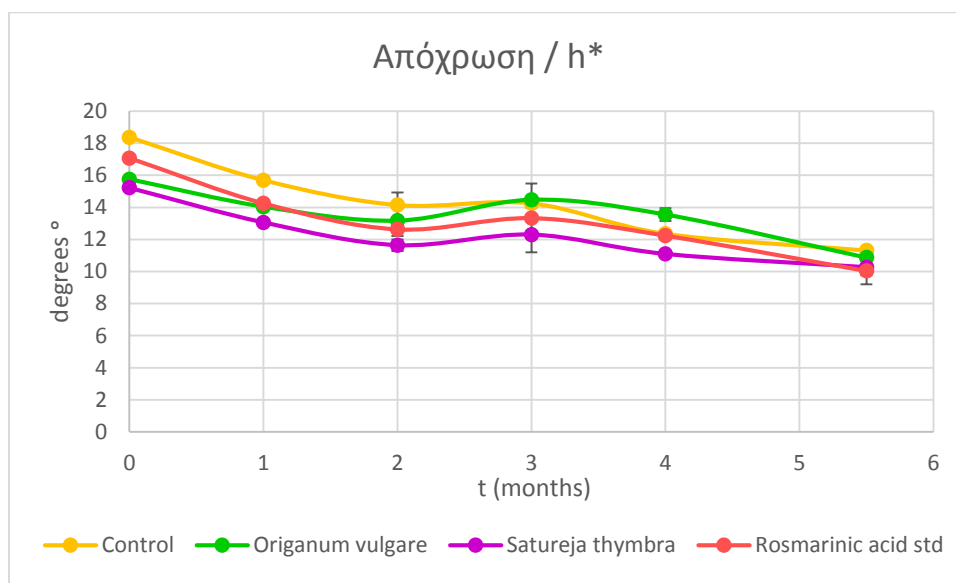
Όπως φαίνεται με την προσθήκη συστατικών στο κρασί, που μπορούν να σχηματίσουν έγχρωμα σύμπλοκα με τις ανθοκυάνες, η φωτεινότητα του κρασιού μειώνεται. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει την ενίσχυση του φαινομένου του σχηματισμού έγχρωμων συμπλόκων, και μάλιστα είναι δείκτης της αυξοχρωμικής επίδρασής του, καθώς η αύξηση των συμπλοκοποιημένων ανθοκυανών οδηγεί σε πιο «σκούρα» κρασιά (χαμηλότερες τιμές της παραμέτρου L*), όπως ήδη έχει αναφερθεί από τους Gómez-Míguez et al. (2006). Επίσης, παρατηρείται ότι η φωτεινότητα του κρασιού μειώνεται με την πάροδο του χρόνου. Το αποτέλεσμα αυτό βρίσκεται σε αντίθεση με άλλες έρευνες (Gómez-Míguez et al. 2006, Hermosín-Gutiérrez et al. 2005), καθώς όσο προχωρά ο πολυμερισμός των ανθοκυανών και μειώνονται οι ελεύθερες και οι συμπλοκοποιημένες ανθοκυάνες, η φωτεινότητα του κρασιού τείνει να αυξάνεται. Η διαφορά αυτή ίσως μπορεί να ερμηνευθεί από το ότι το φρέσκο κρασί απαιτεί την πάροδο ενός εύλογου χρονικού διαστήματος (περισσότερο από τον χρόνο διεξαγωγής αυτού του πειράματος) για να έρθει σε ισορροπία με τα θειώδη μέσα στη συσκευασία του. Έτσι, μέχρι εκείνη τη στιγμή, τα θειώδη αποδεσμεύονται σταδιακά, κάνοντας το χρώμα πιο σκούρο (έντονο), όπως θα παρατηρηθεί και στα επόμενα διαγράμματα.



Διάγραμμα 29: Μεταβολή του ολικού χρώματος (ΔΕ) των κρασιών ως προς το κρασί αναφοράς στον χρόνο μηδέν συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης*

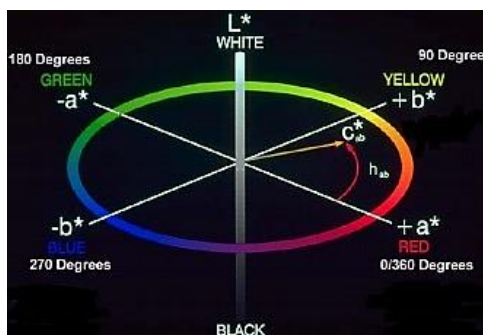
Όπως παρατηρείται η προσθήκη των εκχυλισμάτων και του ροσμαρινικού οξέος προκάλεσαν άμεση αλλαγή του χρώματος του κρασιού αναφοράς. Συγκεκριμένα, η προσθήκη ροσμαρινικού οξέος μετέβαλλε το χρώμα του κρασιού (στον χρόνο μηδέν) κατά 1.33 ± 0.44 μονάδες, η προσθήκη εκχυλίσματος ρίγανης κατά 3.74 ± 0.04 και η προσθήκη εκχυλίσματος θρούμπι κατά 4.35 ± 0.07 . Έχει αποδειχθεί ότι γενικά η μεταβολή αυτή θεωρείται ορατά ανιχνεύσιμη στο ανθρώπινο μάτι για τιμές μεγαλύτερες του 1, όταν το κρασί εξετάζεται σε γυάλινα δισκία (Gonnet 1998), ενώ πρέπει να είναι μεγαλύτερη του 3 όταν το κρασί εξετάζεται στα ειδικά γυάλινα ποτήρια του οργανοληπτικού ελέγχου (Martínez et al. 2001). Στη συνέχεια, μέχρι και τους 3 μήνες, καθώς μεταβαλλόταν και το χρώμα του κρασιού αναφοράς κατά την αποθήκευση, τα χρώματα των εμπλουτισμένων κρασιών συνέχιζαν να μεταβάλλονται, με την μεγαλύτερη διαφορά να

παρουσιάζεται στο κρασί με πρόσθετο εκχύλισμα θρούμπι. Μετά τους 3 μήνες του πειράματος έως το τέλος του, το χρώμα των εμπλουτισμένων κρασιών δεν άλλαξε σημαντικά, ενώ αυτό του κρασιού αναφοράς συνέχιζε να μεταβάλλεται μέχρι και τον 4^ο μήνα. Τελικά, μετά την πάροδο 5.5 μηνών, τα τέσσερα αυτά κρασιά παρουσίασαν περίπου την ίδια μεταβολή στο χρώμα ως προς αυτό του κρασιού αναφοράς στην αρχή του πειράματος, και μάλιστα η διαφορά αυτή ήταν περίπου 10 μονάδες.



Διάγραμμα 30: Μεταβολή της απόχρωσης (h^) των κρασιών συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης*

Όταν η παράμετρος h^* παίρνει τιμές στο διάστημα 0 έως 90° εκφράζει τη μεταβολή του χρώματος προς το κίτρινο ή το κόκκινο. Έτσι, με την αύξηση της τιμής προς τις 90° το χρώμα γίνεται πιο κίτρινο, ενώ με την μείωση της τιμής προς τις 0° το χρώμα γίνεται πιο κόκκινο, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 29 (Bakker et al. 1986). Όπως παρατηρείται, η προσθήκη του ροσμαρινικού οξέος, και ακόμη περισσότερο η προσθήκη των εκχυλισμάτων των αρωματικών φυτών μετέβαλλαν το χρώμα του κρασιού αναφοράς προς το πιο έντονο κόκκινο (κατεύθυνση προς το μπλε), αμέσως μετά την προσθήκη τους.



*Εικόνα 29: Απεικόνιση των χρωμάτων για τις τιμές της παραμέτρου h^**

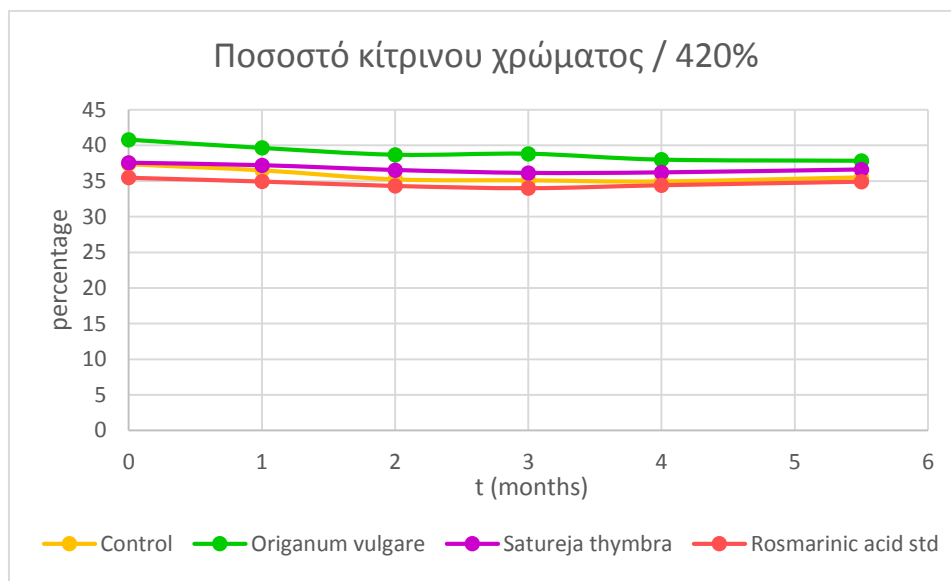
Η μείωση στην τιμή της απόχρωσης (h^*) αποδεικνύει την ενίσχυση του φαινομένου του σχηματισμού έγχρωμων συμπλόκων, και συγκεκριμένα είναι δείκτης της βαθochρωμικής μετατόπισης που προκαλεί, καθώς η αύξηση των συμπλοκοποιημένων ανθοκυανών οδηγεί σε κρασιά με πιο έντονη μπλε χροιά (χαμηλότερες τιμές της παραμέτρου h^*), όπως ήδη έχει αναφερθεί από τους Gómez-Míguez et al. (2006). Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης των κρασιών, η παράμετρος h^* μειωνόταν και άρα το χρώμα μεταβαλλόταν προς το πιο έντονο κόκκινο. Το αποτέλεσμα αυτό βρίσκεται σε αντίθεση με άλλες έρευνες (Gómez-

Míguez et al. 2006, Hermosín-Gutiérrez et al. 2005), καθώς όσο προχωρά ο πολυμερισμός των ανθοκυανών και μειώνονται οι συμπλοκοποιημένες ανθοκυάνες, η απόχρωση h^* τείνει να αυξάνεται, και το χρώμα να αποκτά κίτρινες (πορτοκαλί) χροιές. Η μείωση αυτή, όπως και παραπάνω, ίσως μπορεί να ερμηνευθεί από το ότι το φρέσκο κρασί απαιτεί την πάροδο ενός εύλογου χρονικού διαστήματος (περισσότερο από τον χρόνο διεξαγωγής αυτού του πειράματος) για να έρθει σε ισορροπία με τα θειώδη μέσα στη συσκευασία του.

6.2.2.3. Εξέλιξη χρώματος μέσω φασματοφωτομετρικής μεθόδου

Επειδή η εκτίμηση του χρώματος μέσω της εφαρμογής του διεθνούς συστήματος εκτίμησης χρώματος CIELAB είναι δύσκολή για τους οινοπαραγωγούς, έχει καθιερωθεί η ανάλυση του χρώματος μέσω της μεθόδου του Glories (1984). Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει μετρήσεις της οπτικής πυκνότητας στα 420, στα 520, αλλά και στα 620 nm. Έτσι, η απορρόφηση στα 420 nm είναι ενδεικτική για το κίτρινο χρώμα, στα 520 για το κόκκινο και στα 620 για το μπλε χρώμα των νέων κόκκινων κρασιών, που οφείλεται στις ανθοκυάνες όταν αυτές βρίσκονται στη μορφή της άνυδρης βάσης (Συμεού 2010).

Στα Διαγράμματα 31, 32 και 33 που ακολουθούν παρουσιάζονται τα ποσοστά του κίτρινου, του κόκκινου και του μπλε χρώματος, αντίστοιχα, των τεσσάρων σειρών κρασιών κατά την αποθήκευσή τους, όπως αυτά προσδιορίστηκαν από την φασματοφωτομετρική μέθοδο. Στους Πίνακες 8, 9 και 10 παρουσιάζονται οι αντίστοιχες απορροφήσεις στα 420, 520 και 620 nm.

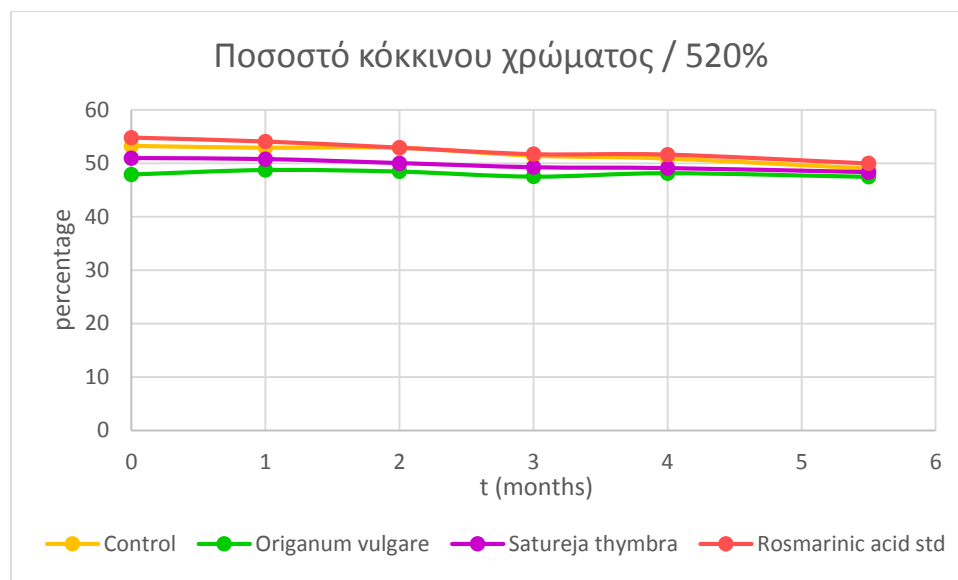


Διάγραμμα 31: Ποσοστό του κίτρινου χρώματος των κρασιών σε συνάρτηση με τον χρόνο αποθήκευσης

Πίνακας 8: Απορρόφηση των κρασιών στα 420 nm κατά τη διάρκεια της αποθήκευσής τους

Χρόνος (μήνες)	Control	Origanum vulgare	Satureja thymbra	Rosmarinic acid std
0	1.99 ± 0.01	2.85 ± 0.01	2.80 ± 0.07	2.16 ± 0.05
1	2.28 ± 0.01	3.23 ± 0.11	2.85 ± 0.00	2.47 ± 0.05
2	2.49 ± 0.10	3.32 ± 0.01	3.12 ± 0.04	2.71 ± 0.13
3	2.77 ± 0.04	3.40 ± 0.06	3.17 ± 0.02	2.94 ± 0.01
4	2.83 ± 0.01	2.89 ± 0.01	2.85 ± 0.03	2.82 ± 0.01
5.5	3.08 ± 0.02	3.07 ± 0.00	2.95 ± 0.01	2.98 ± 0.01

Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 3 η προσθήκη ροσμαρινικού οξέος μειώνει το ποσοστό του κίτρινου χρώματος στο κρασί αναφοράς (κατά 1.9%) , ενώ η προσθήκη των εκχυλισμάτων το αυξάνουν και ιδιαίτερα αυτή της ρίγανης (κατά 3.4%). Η αύξηση αυτή οφείλεται στο γεγονός ότι τα δύο αυτά εκχυλίσματα ήταν πολύ πλούσια σε φαινολικά συστατικά που έχουν σημαντική απορρόφηση στα 420 nm. Βέβαια, όπως φαίνεται στις επιμέρους απορροφήσεις στον Πίνακα 8, η προσθήκη ροσμαρινικού οξέος στα κρασί αυξάνει και αυτή την απορρόφησή του στα 420 nm, απλά αυξάνει περισσότερο την απορρόφηση στα 520 nm (όπως θα παρουσιαστεί παρακάτω), και έτσι το ποσοστό του κίτρινου χρώματος μειώνεται (αφού αυξάνεται αυτό του κόκκινου) αντί να αυξάνεται. Στη συνέχεια, το ποσοστό του κίτρινου χρώματος μειώνεται ελαφρά και στα 4 κρασιά κατά την διάρκεια της αποθήκευσής τους. Συγκεκριμένα στο κρασί αναφοράς το ποσοστό του κίτρινου χρώματος ήταν αρχικά 37.4%, ενώ στο τέλος μειώθηκε στο 35.5%. Αντίστοιχα, στο κρασί με πρόσθετο εκχύλισμα ρίγανης από 40.8% σε 37.8%, στο κρασί με πρόσθετο εκχύλισμα θρούμπι από 37.6% σε 36.6% και στο κρασί με πρόσθετο ροσμαρινικό οξύ από 35.5% σε 34.9%. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με άλλες μελέτες (Dobei et al. 2010, Alamo et al. 2000), όπου το ποσοστό του κίτρινου χρώματος του κρασιού αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου λόγω των οξειδώσεων και της επακόλουθης δημιουργίας κίτρινων χρωστικών. Βέβαια, στον Πίνακα 8 φαίνεται ότι οι επιμέρους απορροφήσεις των κρασιών στα 420 nm αυξάνονται με την πάροδο του χρόνου, γεγονός που υποδηλώνει την δημιουργία κίτρινων χρωστικών λόγω της οξείδωσης του κρασιού.



Διάγραμμα 32: Ποσοστό του κόκκινου χρώματος των κρασιών σε συνάρτηση με τον χρόνο αποθήκευσης

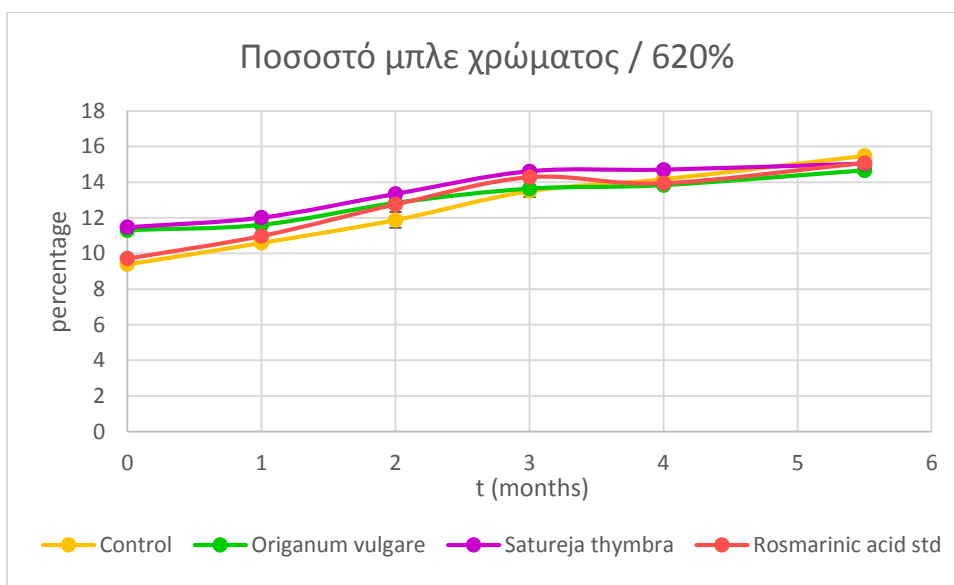
Πίνακας 9: Απορρόφηση των κρασιών στα 520 nm κατά τη διάρκεια της αποθήκευσής τους

Χρόνος (μήνες)	Control	Origanum vulgare	Satureja thymbra	Rosmarinic acid std
0	2.84 ± 0.01	3.81 ± 0.04	3.80 ± 0.10	3.33 ± 0.08
1	3.30 ± 0.01	3.98 ± 0.18	3.89 ± 0.00	3.82 ± 0.09
2	3.74 ± 0.16	4.16 ± 0.01	4.27 ± 0.05	4.18 ± 0.20
3	4.06 ± 0.01	4.17 ± 0.13	4.32 ± 0.02	4.48 ± 0.04
4	4.11 ± 0.00	3.76 ± 0.01	4.13 ± 0.00	4.23 ± 0.01
5.5	4.24 ± 0.01	3.86 ± 0.01	3.89 ± 0.00	4.26 ± 0.00

Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 32 η προσθήκη ροσμαρινικού οξέος αυξάνει το ποσοστό του κόκκινου χρώματος στο κρασί αναφοράς (κατά 1.6%), ενώ η προσθήκη των εκχυλισμάτων το μειώνει και ιδιαίτερα αυτή της ρίγανης (κατά 5.3%). Η μείωση αυτή οφείλεται στο γεγονός ότι τα δύο αυτά εκχυλίσματα είχαν σημαντικότερη αύξηση στην απορρόφηση στα 420 nm. Βέβαια, όπως φαίνεται στις επιμέρους απορροφήσεις στον Πίνακα 9, η προσθήκη των δύο εκχυλισμάτων στο κρασί αύξησαν την απορρόφηση του στα 520 nm, και μάλιστα περισσότερο από την προσθήκη ροσμαρινικού οξέος. Η αύξηση της απορρόφησης στα 520 nm είναι ενδεικτική για την αυξοχρωμική επίδραση του φαινομένου του σχηματισμού έγχρωμων συμπλόκων. Το γεγονός ότι η προσθήκη των εκχυλισμάτων των αρωματικών φυτών αύξησαν περισσότερο την απορρόφηση στα 520 nm σε σχέση με το ροσμαρινικό, ενώ όπως παρατηρήθηκε στο Διάγραμμα 25 ενίσχυσαν το ίδιο το φαινόμενο του σχηματισμού έγχρωμων συμπλόκων, οφείλεται στις φλαβονόλες που περιείχονταν στα δύο εκχυλίσματα. Όπως έχει αναφερθεί από τους Gómez-Míguez et al. (2006) οι φλαβονόλες έχουν υψηλότερη αυξοχρωμική επίδραση από τα κινναμωμικά οξέα. Στη συνέχεια, το ποσοστό του κόκκινου χρώματος μειώνεται ελαφρά και στα 4 κρασιά κατά την διάρκεια της αποθήκευσής τους. Τα αποτελέσματα είναι σύμφωνα με άλλες μελέτες (Dobei et al. 2010, Alamo et al. 2000), όπου το ποσοστό του κόκκινου χρώματος του κρασιού μειώνεται με την πάροδο του

χρόνου λόγω της σταδιακής εξαφάνισης των μονομερών ανθοκυανών και της καταβύθισης των συμπυκνωμένων ταννινών (Dobei et al. 2010). Αντίθετα, όμως, στον Πίνακα 9 φαίνεται ότι οι επιμέρους απορροφήσεις των κρασιών στα 520 nm αυξάνονται με την πάροδο του χρόνου. Αυτό, όπως ήδη έχει αναφερθεί, μάλλον οφείλεται στην σταδιακή αποδέσμευση των θειωδών από τις ανθοκυάνες, και άρα με την πάροδο των πρώτων μηνών αποθήκευσης η απορρόφηση στα 520 nm αυξάνεται καθώς απορροφούν και αυτές που είχαν αποχρωματιστεί από τον θειώδη ανυδρίτη.

Συγκεκριμένα, οι απορροφήσεις του κρασιού αναφοράς αυξάνονται καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, ενώ αυτές των εμπλουτισμένων κρασιών μένουν πρακτικά σταθερές μετά τους 3 μήνες αποθήκευσης και έως το τέλος του πειράματος (5.5 μήνες). Επομένως, η προσθήκη συστατικών στο κρασί που μπορούν να ενισχύσουν το φαινόμενο σχηματισμού έγχρωμων συμπλόκων, επιφέρουν την ισορροπία των θειωδών πιο γρήγορα στο κρασί. Αυτό ίσως μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι με την προσθήκη τέτοιων συστατικών στο κρασί, το ποσοστό των μονομερών ανθοκυανών μειώνεται αφού αυτές συμπλοκοποιούνται. Επομένως, μεταβάλλεται η ισορροπία μεταξύ της μορφής του φλαβυλίου και της άχρωμης μορφής των ανθοκυανών που είναι ενωμένες με τον θειώδη ανυδρίτη και η αντίδραση μετατοπίζεται προς τη μορφή του φλαβυλίου ώστε να αυξηθεί η συγκέντρωσή του.



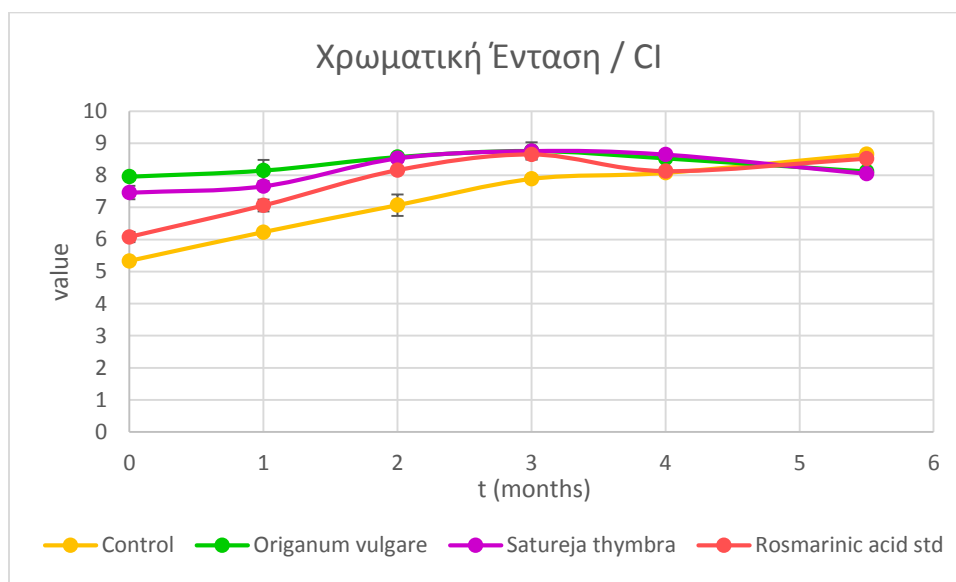
Διάγραμμα 33: Ποσοστό του μπλε χρώματος των κρασιών σε συνάρτηση με τον χρόνο αποθήκευσης

Πίνακας 10: Απορρόφηση των κρασιών στα 620 nm κατά τη διάρκεια της αποθήκευσής τους

Χρόνος (μήνες)	Control	Origanum vulgare	Satureja thymbra	Rosmarinic acid std
0	0.50 ± 0.00	0.83 ± 0.00	0.86 ± 0.04	0.59 ± 0.03
1	0.66 ± 0.00	0.95 ± 0.04	0.92 ± 0.00	0.78 ± 0.04
2	0.84 ± 0.07	1.10 ± 0.03	1.15 ± 0.02	0.97 ± 0.14
3	1.07 ± 0.01	1.20 ± 0.08	1.28 ± 0.03	1.24 ± 0.02
4	1.15 ± 0.01	1.00 ± 0.01	1.23 ± 0.01	1.14 ± 0.00
5.5	1.34 ± 0.01	1.19 ± 0.01	1.21 ± 0.00	1.29 ± 0.01

Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 33 η προσθήκη ροσμαρινικού οξέος δεν επηρεάζει αισθητά το ποσοστό του μπλε χρώματος στο κρασί, αντίθετα με την προσθήκη των εκχυλισμάτων που το αυξάνουν περίπου κατά 2%. Στη συνέχεια, σύμφωνα και με τον Πίνακα 10, το ποσοστό του μπλε χρώματος, αλλά και οι αντίστοιχες απορροφήσεις στα 620 nm, αυξάνονται καθ' όλη τη διάρκεια της αποθήκευσής τους. Συγκεκριμένα, στο κρασί αναφοράς το ποσοστό του μπλε χρώματος ήταν αρχικά 9.4%, ενώ στο τέλος αυξήθηκε στο 15.5%. Αντίστοιχα, στο κρασί με πρόσθετο εκχύλισμα ρίγανης από 11.3% σε 14.7%, στο κρασί με πρόσθετο εκχύλισμα θρούμπι από 11.5% σε 15% και στο κρασί με πρόσθετο ροσμαρινικό οξύ από 9.7% σε 15.1%. Τα αποτελέσματα είναι σύμφωνα με άλλες μελέτες (Dobei et al. 2010, Alamo et al. 2000), όπου το ποσοστό του μπλε χρώματος του κρασιού αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου λόγω του σχηματισμού μπλε χρωστικών (Dobei et al. 2010).

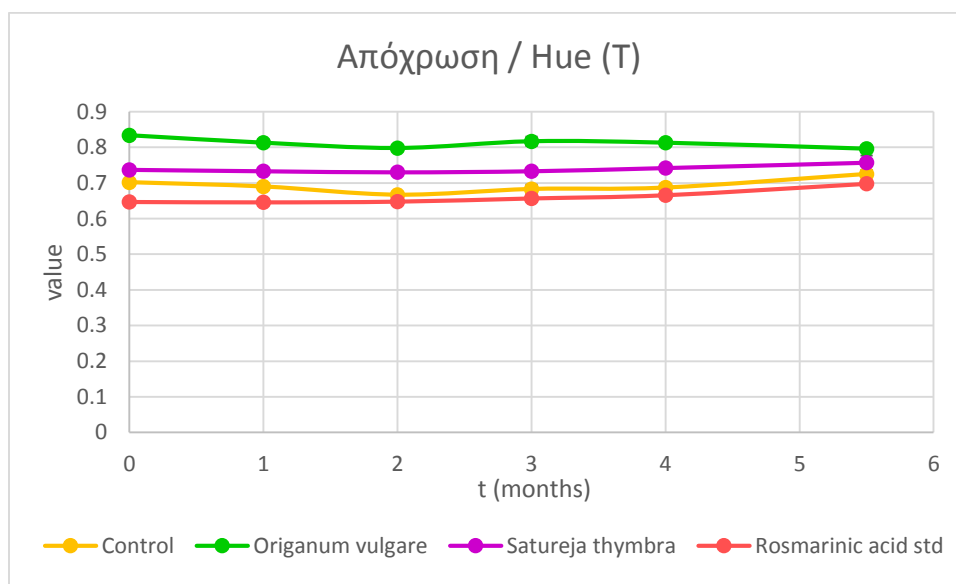
Μέσω των τριών αυτών απορροφήσεων (420, 520 και 620 nm) μπορούν να υπολογιστούν τα μεγέθη χρωματική ένταση (CI), απόχρωση (T) και λαμπρότητα (dA%). Η εξέλιξη αυτών των μεγεθών των τεσσάρων κρασιών κατά την αποθήκευσή τους παρουσιάζεται στα Διαγράμματα 34, 35 και 36, αντίστοιχα.



Διάγραμμα 34: Χρωματική ένταση (CI) των κρασιών σε συνάρτηση με τον χρόνο αποθήκευσης

Η χρωματική ένταση (CI) αντιπροσωπεύει την ποσότητα του χρώματος. Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή της τόσο πιο έντονο χρώμα έχουν τα κρασιά. Η χρωματική ένταση του κρασιού αναφοράς στον χρόνο μηδέν του πειράματος ήταν 5.3 μονάδες, ενώ η προσθήκη συστατικών (cofactors) μέσα σε αυτό, προκάλεσε την αύξησή της. Συγκεκριμένα, η προσθήκη ροσμαρινικού οξέος αύξησε την χρωματική ένταση στις 6.1 μονάδες (αύξηση κατά 0.8 μονάδες), η προσθήκη εκχυλίσματος από θρούμπι στις 7.5 μονάδες (αύξηση κατά 2.2 μονάδες) και η προσθήκη εκχυλίσματος ρίγανης στις 8 μονάδες (αύξηση κατά 2.7 μονάδες). Η μεγαλύτερη αύξηση του προκάλεσαν τα εκχυλίσματα σε σχέση με το πρόσθετο ροσμαρινικό οξύ στο κρασί αναφοράς, οφείλεται στην πολύ υψηλότερη απορρόφηση που είχαν στα 420 nm. Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης παρατηρείται ότι η ένταση του χρώματος του κρασιού αναφοράς και αυτού με

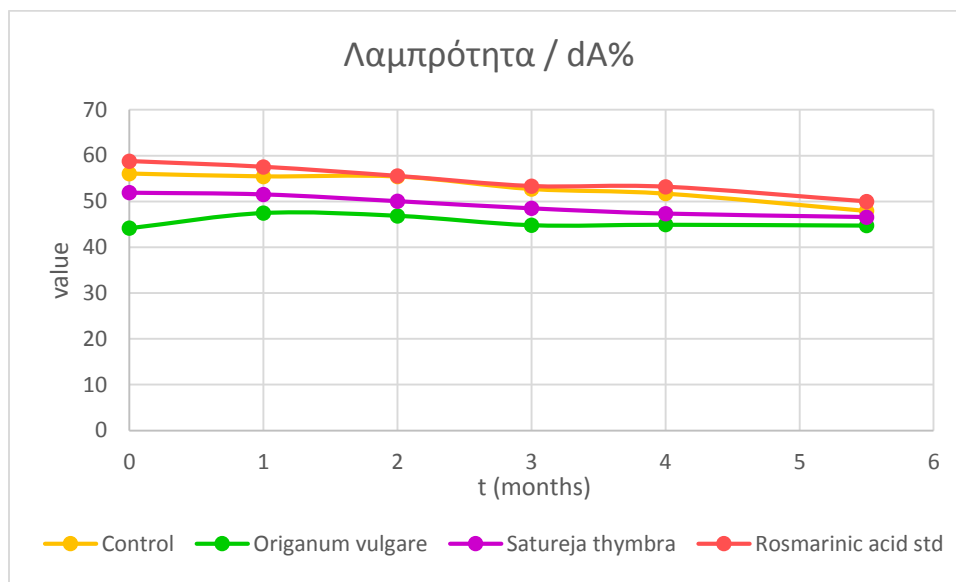
πρόσθετο ροσμαρινικό οξύ αυξάνεται, ενώ στα εμπλουτισμένα κρασιά με εκχύλισμα θρούμπι και ρίγανης παραμένει πρακτικά σταθερή. Στη διεθνή βιβλιογραφία έχει αναφερθεί ότι καθώς το κρασί παλαιώνει η χρωματική του ένταση τείνει να μειώνεται (Dobrei et al. 2010), λόγω της σταδιακής απώλειας των μονομερών ανθοκυανών. Στο συγκεκριμένο πείραμα, όμως, η χρωματική ένταση αυξάνεται, γεγονός που για άλλη μία φορά μπορεί να αποδοθεί στην αποδέσμευση του θειώδη ανυδρίτη από τις ανθοκυάνες, και συνεπώς την αύξηση του χρώματος. Τελικά, παρά την σημαντική διαφορά που είχαν αρχικά τα τέσσερα κρασιά ως προς την χρωματική ένταση, μετά την πάροδο των 5.5 μηνών κατέληξαν στην ίδια τιμή, περίπου 8.5 μονάδες.



Διάγραμμα 35: Απόχρωση (hue) των κρασιών κατά την διάρκεια της αποθήκευσής τους

Η απόχρωση (T) αντιπροσωπεύει την εξέλιξη του χρώματος προς το πορτοκαλί. Όσο υψηλότερη είναι η τιμή της, τόσο το χρώμα μεταβάλλεται από το κόκκινο προς το πορτοκαλί. Η απόχρωση του κρασιού αναφοράς στον χρόνο μηδέν του περάματος ήταν 0.70 μονάδες. Η προσθήκη ροσμαρινικού οξέος μέσα σε αυτό μείωσε την τιμή της στις 0.65 μονάδες, λόγω της αύξησης της απορρόφησης στα 520 nm που επέφερε. Αντίθετα, η προσθήκη εκχυλισμάτων αύξησε την απόχρωση, λόγω της μεγαλύτερης αύξησης της απορρόφησης στα 420 nm που επέφερε, σε σχέση με τα 520 nm. Συγκεκριμένα, η προσθήκη εκχυλίσματος από θρούμπι αύξησε την απόχρωση στις 0.74 μονάδες, ενώ η προσθήκη ρίγανης στις 0.83 μονάδες. Στη συνέχεια, μέχρι και τους 4 μήνες αποθήκευσης η απόχρωση παρέμεινε στα ίδια επίπεδα και στα τέσσερα κρασιά, ενώ μετά τον 4^ο μήνα, παρατηρήθηκε μία μικρή αύξηση στην απόχρωση του κρασιού αναφοράς και του κρασιού με πρόσθετο ροσμαρινικό οξύ. Η αύξηση αυτή έχει παρατηρηθεί και από τους Dobrei et al. (2010) κατά την διάρκεια κιάλας των τεσσάρων πρώτων μηνών αποθήκευσης κρασιού της ποικιλίας Merlot. Αυτή η χρονική υστέρηση που παρατηρήθηκε στην αύξηση της απόχρωσης οφείλεται για ακόμα μία φορά στα θειώδη του κρασιού. Έτσι, η αύξηση της απορρόφησης στα 420 nm λόγω των οξειδώσεων και του πολυμερισμού, καθώς και αυτή στα 520

nm λόγω της αποδέσμευσης των θειωδών, είχαν ως αποτέλεσμα τη σταθερή τιμή της απόχρωσης. Τελικά, η αύξηση που παρατηρήθηκε στην απόχρωση του κρασιού αναφοράς και αυτού με ροσμαρινικό οξύ, ενώ δεν υπήρξε μεταβολή στην απόχρωση των εμπλουτισμένων κρασιών με εκχυλίσματα, είχαν ως αποτέλεσμα μικρότερες διαφορές των τεσσάρων κρασιών ως προς την απόχρωση στο τέλος του πειράματος.



Διάγραμμα 36: Λαμπρότητα (dA%) των κρασιών κατά την διάρκεια της αποθήκευσής τους

Η λαμπρότητα (dA%), σχετίζεται με το σχήμα του φάσματος. Όσο υψηλότερη είναι η τιμή της, τόσο κυριαρχεί περισσότερο το κόκκινο χρώμα. Έτσι, σύμφωνα και με τα αποτελέσματα για το ποσοστό του κόκκινου χρώματος, το ροσμαρινικό οξύ αυξάνει την λαμπρότητα του κρασιού αναφοράς, ενώ τα εκχυλίσματα των αρωματικών φυτών την μειώνουν. Συγκεκριμένα, στον χρόνο μηδέν η τιμή της λαμπρότητας του κρασιού αναφοράς ήταν 56.1 ± 0.1 μονάδες, του κρασιού με πρόσθετο εκχύλισμα ρίγανης 44.2 ± 0.6 , αυτού με πρόσθετο εκχύλισμα από θρούμπι 51.9 ± 0.1 και αυτού με πρόσθετο ροσμαρινικό οξύ 58.8 ± 0.1 . Στη συνέχεια, μέχρι και το τέλος του πειράματος, οι τιμές της λαμπρότητας των τεσσάρων κρασιών μειώνονται, και καταλήγουν σε τιμές που κυμαίνονται στα ίδια επίπεδα, της τάξης των 45-50 μονάδων.

7. Συμπεράσματα

7.1. Α' Μέρος: Μεταβολές κατά την οινοποίηση

Στο κόκκινο κρασί είναι απαραίτητη η ανάκτηση ενός υψηλού ανθοκυανικού φορτίου, προκειμένου το κρασί να αποκτήσει ένα έντονο χρώμα, το οποίο είναι το πρώτο χαρακτηριστικό που καθιστά επιθυμητή την κατανάλωσή του. Επιπλέον, οι φλαβονόλες και τα φαινολικά οξέα είναι σημαντικά συστατικά λόγω των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων, τόσο γιατί συμβάλουν στην οξειδωτική σταθεροποίηση των κρασιών, όσο και για την διατροφική τους αξία. Από την άλλη μεριά, το περιεχόμενο σε φλαβαν-3-όλες εξαρτάται από το είδος του κρασιού που πρόκειται να παρασκευασθεί. Χαμηλή περιεκτικότητα σε φλαβαν-3-όλες είναι ζητούμενη σε κρασιά που προορίζονται για άμεση κατανάλωση, δίχως παλαίωση, έτσι ώστε να αποφευχθεί η στυφότητα που προσδίδουν στη γεύση, ενώ για τα κρασιά παλαίωσης το υψηλό περιεχόμενο σε φλαβαν-3-όλες κρίνεται απαραίτητο, για την σταθεροποίηση του χρώματος.

Στην παρούσα εργασία αποδείχθηκε ότι οι ανθοκυάνες είναι τα συστατικά εκείνα, τα οποία εκχυλίζονται άμεσα, μαζί με τις φλαβονόλες και τα κινναμωμικά οξέα, ενώ οι φλαβαν-3-όλες, καθώς και τα διμερή και τριμερή τους, οι προκυανιδίνες, απαιτούν την παρουσία της αιθανόλης. Επομένως, η διάρκεια της εκχύλισης πρέπει κάθε φορά να αριστοποιείται ανάλογα με το κρασί που πρόκειται να παραχθεί. Όσο επιμηκύνεται η διάρκεια παραμονής των στεμφύλων σε επαφή με το γλεύκος, τα σάκχαρα μετατρέπονται σταδιακά σε αιθανόλη, και εκχυλίζονται όλο και περισσότερες φλαβαν-3-όλες. Επομένως, μικρής διάρκειας εκχύλιση (περίπου 5 ημερών) επιτρέπει την ανάκτηση υψηλού ανθοκυανικού φορτίου και χαμηλή περιεκτικότητα σε προκυανιδίνες, αφού η ζύμωση είναι ακόμη στο αρχικό στάδιο και η συγκέντρωση της αιθανόλης δεν είναι υψηλή.

Επίσης, συγκρίνοντας τις δύο μελετούμενες ποικιλίες, Αγιωργίτικο και Merlot, φαίνεται ότι η εκχύλιση των συστατικών που περιέχονται στους φλοιούς της ράγας του Merlot, είναι πολύ πιο εύκολη από αυτή του Αγιωργίτικου. Αυτό δικαιολογείται από τη μορφολογία της ράγας του Merlot, η οποία έχει μικρή διάμετρο και λεπτότερο φλοιό.

Στις λευκές οινοποιήσεις, η προζυμωτική κρυσταλλοποίηση κρίνεται απαραίτητη, καθώς μπορεί να ενισχύσει το πολύ φτωχό φαινολικό προφίλ που παρουσιάζουν τα λευκά κρασιά. Διαφορετικά, οι πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις πολυφαινολών μπορούν να οδηγήσουν σε κρασιά «αδύναμα» οργανοληπτικά (δίχως σώμα).

7.2. Β' Μέρος: Μεταβολές κατά την αποθήκευση του φρέσκου κρασιού και μελέτη βελτίωσης χρώματος με συμπλοκοποίηση

Εφόσον το χρώμα είναι το πρώτο χαρακτηριστικό του κρασιού, που το κάνει αποδεκτό και επιθυμητό από τον καταναλωτή, είναι αναγκαία η μελέτη των αντιδράσεων και των μηχανισμών που συμβάλουν στην σταθεροποίησή του. Ένα σημαντικό μέρος του χρώματος των φρέσκων κρασιών οφείλεται στο φαινόμενο σχηματισμού έγχρωμων συμπλόκων (copigmentation), και ως εκ τούτου η μελέτη, η οποία συνεχίζεται έως σήμερα, και η κατανόησή του κρίνονται απαραίτητες.

Κατά το φαινόμενο αυτό, οι ανθοκυάνες δημιουργούν μοριακά συσσωματώματα, που συγκρατούνται από υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις, με άλλα άχρωμα συστατικά του κρασιού, όπως φλαβονόλες, κινναμωμικά οξέα, κατεχίνες, προκυανιδίνες κ.α.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία αποδείχθηκε ότι η προσθήκη στο φρέσκο κρασί τέτοιων συστατικών (cofactors) προκαλεί την αύξηση των έγχρωμων συμπλόκων (συμπλοκοποιημένες ανθοκυάνες), με συνέπεια την άμεση ενίσχυση του χρώματος. Παρατηρήθηκε ότι η ενίσχυση του φαινομένου του σχηματισμού έγχρωμων συμπλόκων που προκαλείται από τέτοια συστατικά, δεν εξαρτάται από την περιεκτικότητα του διαλύματος σε ανθοκυάνες (για συγκέντρωση μεγαλύτερη των 95 ppm), και επίσης, ότι αυξάνεται γραμμικά με την συγκέντρωση του προστιθέμενου συστατικού. Συγκεκριμένα, η προσθήκη περίπου 700 ppm ολικών φαινολικών από αιθανολικό εκχύλισμα από ρίγανη και από θρούμπι και 700 ppm ροσμαρινικού οξέος, αύξησαν το ίδιο τις συμπλοκοποιημένες ανθοκυάνες του κρασιού κατά περίπου 6.5% επί των ολικών ανθοκυανών. Όσον αφορά τη μεταβολή των χρωματικών παραμέτρων, αυτή ήταν αισθητά μεγαλύτερη στα εμπλουτισμένα με εκχυλίσματα κρασιά, καθώς τα εκχυλίσματα, εκτός από κινναμωμικά οξέα (κυρίως ροσμαρινικό οξύ), περιείχαν και άλλα φαινολικά συστατικά (φλαβόνες, φλαβονόλες) που δίνουν διαλύματα κίτρινου χρώματος.

Καθ' όλη την αποθήκευση των εμπλουτισμένων κρασιών φάνηκε ότι η προσθήκη συστατικών, που μπορούν να σχηματίσουν με τις ανθοκυάνες έγχρωμα σύμπλοκα, δεν επηρεάζει το ρυθμό πολυμερισμού των ανθοκυανών. Μετά την πάροδο 5.5 μηνών, λόγω του υψηλού βαθμού πολυμερισμού (80% πολυμερισμένες ανθοκυάνες), το μεγαλύτερο μέρος του χρώματος των κρασιών οφειλόταν στις πολυμερισμένες ανθοκυάνες, και συνεπώς οι χρωματικές διαφορές ανάμεσα στα εμπλουτισμένα κρασιά και στο κρασί αναφοράς αμβλύθηκαν.

Συμπερασματικά, η προσθήκη συστατικών, που μπορούν να σχηματίσουν με τις ανθοκυάνες έγχρωμα σύμπλοκα, κατά την μεταζυμωτική περίοδο, επιφέρει ενίσχυση στο χρώμα του κρασιού μόνο κατά τους πρώτους μήνες αποθήκευσής του (3-4 μήνες), όπου ο πολυμερισμός των ανθοκυανών δεν έχει φτάσει σε υψηλά επίπεδα. Στη συνέχεια, καθώς ο πολυμερισμός προχωρά χωρίς να επηρεάζεται από την παρουσία αυτών των συστατικών, το χρώμα του κρασιού τείνει να οφείλεται εξ' ολοκλήρου στις πολυμερισμένες ανθοκυάνες και όχι στις συμπλοκοποιημένες.

8. Βιβλιογραφία

Ξενόγλωσση 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.
- Alcalde - Eon, C., Escribano-Bailón, M.T., Santos-Buelga, C. & Rivas-Gonzalo, J.C. (2008). Changes in the detailed pigment composition of red wine during maturity and ageing: A comprehensive study. *Analytica Chimica Acta*, 563, 238-254.
- Álvarez, I., Aleixandre, J. L., García, M. J., Lizama, V. & Aleixandre-Tudó, J. L. (2009). Effect of the prefermentative addition of copigments on the polyphenolic composition of Tempranillo wines after malolactic fermentation. *European Food Research and Technology*, 228, 501-510.
- Arnous, A., Makris, D. P., & Kefalas, P. (2002). Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15, 655-665.
- Bakker, J., Bridle, P. & Timberlake, C. F. (1986). Tristimulus measurements (CIELAB 76) of port wine colour. *Vitis*, 25, 67-78.
- Bautista-Ortín, A.B., Fernandez-Fernandez, J.I., Lpoez-Roca, J.M. & Gomez-Plaza, E. (2007), The effects of enological practices in anthocyanins, phenolic compounds and wine colour and their dependence on grape characteristics, *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 546-552.
- Bimpilas, A., Tsimogiannis, D., Balta-Brouma, K., Lymperopoulou, T. & Oreopoulou, V. (2015). Evolution of phenolic compounds and metal content of wine during alcoholic fermentation and storage. *Food Chemistry*, 178, 164-171.
- Birse, M., Pollnitz, A. & Herderich, M. (2007). CIELab colour values: Enhanced wine colour measurement for use by the wine industry and in research applications. *The Australian Wine Research Institute*
- Bloomfield, D. G., Heatherbell, D. A., & Pour Nikfardjam, M. S. (2003). Effect of p-coumaric acid on the color of red wine. *Mitteilungen Klosterneuburg*, 53, 195–198.
- 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, 67–87.
- Busse-Valverde, N., Gómez-Plaza, E., López-Roca, J. M., Gil-Muñoz, R., & BautistaOrtin, A. B. (2011). The extraction of anthocyanins and proanthocyanidins from grapes to wine during

- fermentative maceration is affected by the enological technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 5450–5455.
- 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.
- Cheyrier, V. (2006). Flavonoids in wine. In Ø. M. Andersen & K. R. Markham (Eds.), *Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications* (pp. 273–299). Boca Raton: CRC Taylor and Francis Group.
- Cliff, M. A., King, M. C. & Schlosser, J. (2007). Anthocyanin, phenolic composition, color measurement and sensory analysis of BC commercial red wines. *Food Research International*, 40: 92–100.
- Darias-Martín, J., Rodríguez, O., Díaz, E., & Lamuela-Raventós, R. M. (2000). Effect of skin contact on the antioxidant phenolics in white wine. *Food Chemistry*, 71, 483–487.
- Darias-Martín, J., Carrillo, M., Díaz, E. & Boulton, R. B. (2001). Enhancement of red wine colour by pre-fermentation addition of copigments. *Food Chemistry*, 73, 217–220.
- Delcour, J. A. & Varebeke, D. J. (1985). A new colourimetric assay for flavanoids in pilsner beers. *Journal of the Institute of Brewing*. 91, 37-40.
- Dobrei, A., Poiana, M.-A., Sala, F., Ghita, A. & Gergen, I. (2010). Changes in the chromatic properties of red wines from *Vitis vinifera* L. cv. Merlot and Pinot Noir during the course of aging in bottle. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 8, 20-24.
- Figueiredo-González, M., Martínez-Carballo, E., Cancho-Grande, B., Santiago, J. L., Martínez, M. C., & Simal-Gándara, J. (2012). Pattern recognition of three *Vitis vinifera* L. red grapes varieties based on anthocyanin and flavonol profiles, with correlations between their biosynthesis pathways. *Food Chemistry*, 130, 9–19.
- Gauche, C., Malagoli, E. S. & Bordignon Luiz M.T. (2010). Effect of pH on the copigmentation of anthocyanins from Cabernet Sauvignon grape extracts with organic acids. *Scientia Agricola*, 67, 41-46.
- García-Marino, M., Escudero-Gilete, M. L., Heredia, F. J., Escibano-Bailón, M. T. & Rivas-Gonzalo, J. C. (2013). Color-copigmentation study by tristimulus colorimetry (CIELAB) in red wines obtained from Tempranillo and Graciano varieties. *Food Research International*. 51, 123-131.
- Gil-Muñoz, R., Gómez-Plaza, E., Martínez, A. & López-Rocab, J. M. (1997). Evolution of the CIELAB and other spectrophotometric parameters during wine fermentation. Influence of some pre and postfermentative factors. *Food Research International*. 30 (9), 699-705.

- Glories, Y. (1984). La couleur des vins rouges. *Connaissance Vigne Vin*, 18, 253–271.
- Gómez-Míguez, J., Gonzalez-Miret, L., Hernanz, D., Fernandez, A. , Vicario, I. & Heredia, F. J. (2007). Effects of prefermentative skin contact conditions on colour and phenolic content of white wines. *Journal of Food Engineering*, 78, 238-245
- Gómez-Míguez, M., González-Manzano, S., Escribano-Bailón, M. T., Heredia, F. J. & Santos-Buelga, C. (2006). Influence of different phenolic copigments on the color of malvidin 3-glucoside. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 5422-5429.
- Gonnet, J. F. (1998). Colour effects of copigmentation of anthocyanins revisited - 1. A colorimetric definition using CIELAB scale. *Food Chemistry*. 63, 409-415
- González, R., De La Rosa, T., González, M.R. & Martín, P. (2010). Pre-harvest spraying with rutin improves colour of ‘Tempranillo’ grapes and wines. *Vitis*, 49, 147–148.
- 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.
- Haselgrove, L., Botting, D., Van Heeswijck, R., Hoj, P. B., Dry, P. R. & Ford, C. (2000). Canopy microclimate and berry composition: the effect of bunch exposure on the phenolics composition of *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz grape berries. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 6, 141–149
- He, F., Liang, N.-N., Mu, L., Pan, Q.-H., Wang, J., Reeves, M. J. & Duan, C.-Q. (2012). Anthocyanins and Their Variation in Red Wines I. Monomeric Anthocyanins and Their Color Expression. *Molecules*, 17, 1571-1601.
- Hermosín-Gutiérrez, I. (2003). Influence of ethanol content on the extent of copigmentation in a Cencibel young red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4079–4083.
- Hermosín-Gutiérrez, I., Lorenzo E. A.- P. & Espinosa A. V. (2005). Phenolic composition and magnitude of copigmentation in young and shortly aged red wines made from the cultivars, Cabernet Sauvignon, Cencibel, and Syrah. *Food Chemistry*, 92, 269-283.
- Hernanz, D., Recamales, A. F., Gonzalez-Miret, M. L., Gómez-Míguez, M. J., Vicario, I.M. & Heredia, F.J. (2007). Phenolic composition of white wines with a prefermentative maceration at experimental and industrial scale. *Journal of Food Engineering*, 80, 327-335.

- Jackson, R. S. (2008). *Wine science: principles and applications* (pp. 270-331). San Diego: Academic Press.
- Lambert, S.G., Asenstorfer, R.E., Williamson, N.M., Iland, P.G., Jones, G.P. (2011). Copigmentation between malvidin-3-glucoside and some wine constituents and its importance to colour expression in red wine. *Food Chemistry*, 125, 106–115.
- Lorenzo, C., Pardo, F., Zalacain, A., Alonso, G.L. & Salinas, M.R. (2005). Effect of red grapes co-winemaking in polyphenols and color of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 7609–7616.
- Maarit R. (2005). *Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins*. University of Helsinki, Helsinki
- Makris, D. P., Psarra, E., Kallithraka, S., & Kefalas, P. (2003). The effect of polyphenolic composition as related to antioxidant capacity in white wines. *Food Research International*, 36, 805–814.
- Martínez, J. A., Melgosa, M., Pérez, M. M., Hita, E., & Negueruela, A. I. (2001). Note. Visual and instrumental color evaluation in red wines. *Food Science and Technology International*, 7(5), 439–444.
- Mazza, G., Fukumoto, L., Delaquis, P., Girard, B., & Ewert, B. (1999). Anthocyanins, phenolics, and color of Cabernet Franc, Merlot, and Pinot Noir wines from British Columbia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4009–4017.
- Mirabel, M. & Saucier, C. (1999). Copigmentation in model wine solutions: Occurrence and relation to wine aging. *American Journal of Enology & Viticulture*. 50, 211-218.
- Ortega-Regules A., Ros-García J.M., Bautista-Ortín A.B., López-Roca J.M. & Gómez-Plaza E. (2008). Differences in morphology and composition of skin and pulp cell walls from grapes (*Vitis vinifera* L.): technological implications. *European Food Research and Technology*. 227, 223–231.
- Pérez-Magariño, S. & González-Sanjosé, M. L. (2003). Application of absorbance values used in wineries for estimating CIELAB parameters in red wines. *Food Chemistry*. 81 (2), 301-306.
- 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.
- Ribereau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2006). *Handbook of Enology. The chemistry of wine stabilization and treatments (Vol. 2)* (pp. 141-204). West Sussex-UK: John Wiley and Sons Ltd.

- Romero-Cascales, I., Ros-García, J. M., López-Roca, J.M. & Gómez-Plaza, E. (2012). The effect of a commercial pectolytic enzyme on grape skin cell wall degradation and colour evolution during the maceration process. *Food Chemistry*, 130, 626-631.
- Rustioni, L., Rossoni, M., Cola, G., Mariani, L., & Failla, O. (2011). Bunch exposure to direct solar radiation increases ortho-diphenol anthocyanins in northern Italy climatic condition. *Journal of the International Science of Vigne Vin*, 45, 85–99.
- Segade, S. R., Pace, C., Torchio, F., Giacosa, S., Gerbi, V. & Rolle, L. (2015). Impact of maceration enzymes on skin softening and relationship with anthocyanin extraction in wine grapes with different anthocyanin profiles. *Food Research International*, 71, 50-57
- Selli, S., Canbas, A., Cabaroglu, T., Erten, H., Lepoutre, J.-P. & Gunata, Z. (2006). Effect of skin contact on the free and bound aroma compounds of the white wine of *Vitis vinifera* L. cv Narince. *Food Control*, 17, 75-82.
- Waterhouse, A. L. (2005). Determination of total phenolics. In R. E. Wrolstad, T. E. Acree, E. A. Decker, M. H. Penner, D. S. Reid, S. J. Schwartz, C. F. Shoemaker, D. Smith, & P. Sporns (Eds.), *Handbook of food analytical chemistry* (pp. 463–471). Hoboken: John Wiley & Sons.

Ελληνική βιβλιογραφία

- Αναστασοπούλου, Χ. & Σαββίδου, Ε. (2012), Μεταπτυχιακή Διατριβή: *Πολύτιμα Πράσινα Εθνικά Προϊόντα: Το Κρασί*, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη.
- Κουράκου–Δραγώνα, Σ. (1998). *Θέματα Οινολογίας*. Αθήνα: Τροχαλία.
- Σουφλερός, Ε. (2000). *Οινολογία, Επιστήμη και Τεχνογνωσία, Τομός Ι*. Θεσσαλονίκη: Τυπογραφία Παπαγεωργίου.
- Σουφλερός, Ε. (2000). *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.
- Τσέτουρας, Π. (2008). *Οινοτεχνία, Η Επιστήμη του κρασιού στην πράξη, ISO 22000*. Αθήνα: Εκδόσεις Σταμούλη Α.Ε.
- Χατζής, Ε. (2011). *Μέτρηση χρώματος - Χρωματομετρία*. Ελληνική Ένωση Βιομηχανιών Ψύχους

