

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ

ΤΑ ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΟΥ ΚΡΑΣΙΟΥ ΚΑΙ Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΠΑΛΑΙΩΣΗΣ ΤΟΥ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΔΗΜΗΤΡΙΟΥ ΣΠΥΡΟΣ

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: ΠΕΛΑΓΙΑ ΚΑΤΣΟΥ

η.490

1	Εισαγωγή.....	6
1.1	Πολυφαινόλες.....	6
1.1.1	Χημεία των φαινολικών παραγώγων.....	7
1.1.2	Μη φλαβονοειδείς φαινόλες.....	10
1.1.3	Φλαβονοειδείς φαινόλες.....	13
1.1.4	Κατεχίνες και Προκυανιδίνες.....	16
1.1.5	Ταννίνες.....	23
1.1.6	Ανθοκυάνες.....	28
1.1.7	Η θέση των φαινολικών συστατικών στο σταφύλι.....	36
1.1.8	Εξέλιξη ανθοκυανών και ταννινών κατά την ωρίμανση των σταφυλιών.....	37
1.1.9	Φαινολική ωριμότητα.....	39
1.2	Εκχύλιση.....	40
1.2.1	Η σημασία της εκχύλισης.....	40
1.2.2	Παράγοντες εκχύλισης των ανθοκυανών και των ολικών φαινολών.....	41
1.2.3	Προσαρμογή της οινοποίησης για βελτίωση της εκχύλισης των φαινολικών συστατικών.....	48
1.3	Εξέλιξη του χρώματος.....	51
1.3.1	Αντιδράσεις διάσπασης των ανθοκυανών.....	51
1.3.2	Αντιδράσεις σταθεροποίησης των ανθοκυανών.....	53
1.3.3	Μηχανισμοί αντιδράσεων.....	54
1.3.4	Χρονική σειρά και συνθήκες πραγματοποίησης αντιδράσεων.....	61
1.3.5	Σταθερότητα του χρώματος.....	67
1.3.6	Αντιδράσεις κατά την παλαίωση σε βαρέλι και σε φιάλη.....	70
1.4	Χρώμα στους λευκούς οίνους.....	72
2	Άλλες ιδιότητες των φαινολικών ενώσεων.....	75
2.1	Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά.....	75
2.2	Άρωμα.....	80
2.3	Οξειδωτική και αντιοξειδωτική δράση.....	83
2.4	Αντιμικροβιακή δράση.....	88
2.5	Διαύγαση.....	89
2.6	Ένζυμα που επηρεάζουν τα φαινολικά συστατικά.....	90
2.6.1	Ένζυμα σταφυλίου.....	90
2.6.2	Χρήση εμπορικών σκευασμάτων ενζύμων.....	98
2.7	Προσδιορισμός φαινολικών συστατικών και μελέτη εμπορικών σκευασμάτων.....	105
2.7.1	Ολικές φαινόλες.....	105
2.7.2	Ολικές ανθοκυάνες.....	107
2.7.3	Ολικές Ταννίνες.....	108
2.7.4	Κατεχίνες.....	110
2.7.5	Ένταση χρώματος και απόχρωση.....	111
2.7.6	Δείκτης Ιονισμού.....	112
2.7.7	Δείκτης Εκχυλισματικότητας ανθοκυανών των ραγών και Δείκτης Συνεισφοράς των Ταννινών των Γιγάρτων.....	113
2.7.8	Ταννίνες φλοιών και γιγάρτων.....	116
2.7.9	Ανθοκυάνες με HPLC.....	118
2.7.10	Περιεκτικότητα εμπορικών σκευασμάτων σε ένζυμα που επηρεάζουν τα φαινολικά συστατικά του οίνου.....	118
2.7.11	Επίδραση εμπορικών ενζυμικών σκευασμάτων στα φαινολικά συστατικά του οίνου.....	118
3	ΠΑΛΑΙΩΣΗ.....	119
3.1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	119

3.2	Μικροξυγονωτική παλαίωση σε δρύινο βαρέλι.....	120
3.2.1	2.2.1 Η επίδραση του δρύινου βαρελίου στις φαινολικές ουσίες των οίνων 120	
3.2.2	Η επίδραση του δρύινου βαρελίου στις αρωματικές ουσίες των οίνων	121
3.2.3	Τι πρέπει να προσέχουμε κατά την παλαίωση σε δρύινο βαρέλι	121
3.3	Αναγωγική παλαίωση σε γυάλινη φιάλη.....	122
3.3.1	2.3.1 Τι πρέπει να προσέχουμε κατά την παλαίωση σε φιάλη.....	123
4	Βιβλιογραφία.....	124
4.1	Ξενόγλωσση	124
4.2	Ελληνική.....	126

Περίληψη

Ο οίνος είναι ένα αλκοολούχο ποτό ιδιαίτερου ενδιαφέροντος και αποτελεί προϊόν της ζύμωσης των σταφυλιών ή του χυμού τους. Το ενδιαφέρον για το προϊόν αυτό έγκειται αφενός στο ότι είναι ένα δημοφιλές ποτό που συνοδεύει και ενισχύει ένα ευρύ φάσμα ευρωπαϊκών και μεσογειακών γεύσεων, και αφετέρου γιατί αποτελεί σημαντικό γεωργικό προϊόν αντικατοπτρίζοντας την ποικιλία του εδάφους και του κλίματος ενός τόπου.

Ο οίνος αποτελείται από χημικά συστατικά τα οποία αποτελούν καταλυτικό ρόλο στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του. Παρακάτω λοιπόν θα γίνει μια ανάλυση των φαινολικών συστατικών του κρασιού . όπου στην οινολογία αποτελούν ένα από τα σημαντικότερα κεφάλαια.

Οι φαινολικές ενώσεις στον οίνο περιλαμβάνουν μία μεγάλη ομάδα ενώσεων οι οποίες επηρεάζουν τη γεύση, το χρώμα και την στυφάδα του οίνου. Διαιρούνται σε δύο κατηγορίες στις φλαβονοειδείς, όπου περιλαμβάνονται οι ανθοκυάνες (χρώμα) και οι ταννίνες (στυφάδα), και είναι πολυφαινολικές ενώσεις πολλές από τις οποίες είναι υπεύθυνες για το χρώμα των καρπών και των ανθέων, και στις μη φλαβονοειδείς φαινόλες. Στα φλαβονοειδή οφείλεται το κιτρινωπό χρώμα των λευκών κρασιών και στις ανθοκυάνες ή ανθοκυανίνες το ερυθροϊώδες έως ερυθρό χρώμα των κόκκινων. Οι ανθοκυάνες έχουν την τάση να δίνουν αδιάλυτα συσσωματώματα με το χρόνο και να σχηματίζουν ίζημα στη φιάλη, προκαλώντας μείωση της έντασης του χρώματος του οίνου.

Οι ενώσεις αυτές φθάνουν από το σταφύλι στον οίνο μέσω της ζύμωσης του γλεύκου, όπου η χρησιμοποίηση διαφορετικής θερμοκρασίας ή ζύμης μπορούν σνα επηρεάσουν το τελικό προϊόν.

Επίσης οι φαινολικές ενώσεις μεταβάλλονται έντονα κατά την ωρίμανση και παλαίωση του οίνου και είναι επιρρεπείς σε οξειδώσεις, και έτσι η χρησιμοποίηση των τροποποιημένων ατμοσφαιρών για τη συσκευασία του οίνου παρουσιάζει μια ενδιαφέρουσα εφαρμογή στην αποθήκευσή του.

1 Εισαγωγή

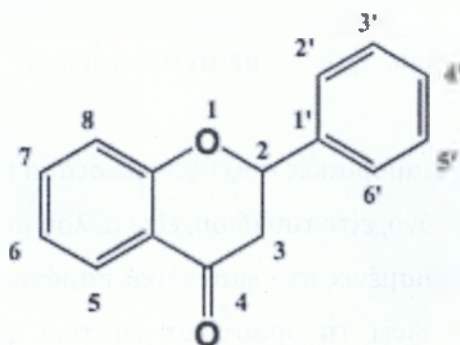
1.1 Πολυφαινόλες

Τα φαινολικά παράγωγα αποτελούν σημαντικό κεφάλαιο της οινολογίας, γιατί καθορίζουν το χρώμα και τις αποχρώσεις των έγχρωμων οίνων, αλλά και τους γευστικούς χαρακτήρες τους. Επίσης υπεισέρχονται στους αρωματικούς χαρακτήρες των οίνων και ευθύνονται για τις θετικές ή αρνητικές μεταβολές της οινικής ποιότητας κατά τη συντήρηση και παλαίωση. Τέτοιες μεταβολές είναι ο εξευγενισμός κατά την ωρίμανση υπό κατάλληλες συνθήκες, αλλά και το καφέτιασμα των λευκών οίνων και η εμφάνιση του καστανού θολώματος, που συμβαίνουν όταν δεν προστατεύονται τα φαινολικά συστατικά από τις οξειδώσεις. Οι αλλοιώσεις του χρώματος και των οργανοληπτικών χαρακτήρων των οίνων είναι αποτέλεσμα των χημικών και ενζυμικών οξειδωτικών δράσεων στα φαινολικά συστατικά (Κουράκου, Σ., 1998).

Τα φαινολικά συστατικά του οίνου προέρχονται κυρίως από το σταφύλι, ενώ δευτερεύουσα πηγή τους είναι το ξύλο των βαρελιών. Πολύ μικρές ποσότητές τους, τέλος, σχηματίζονται κατά τον μεταβολισμό των ζυμών. Ο ρόλος τους στο σταφύλι είναι κατά κύριο λόγο αντιμικροβιακός, αλλά σε μικρότερο βαθμό προστατεύουν από τις προσβολές από έντομα και από την κατανάλωση από ζώα (Jackson, R. S., 2008).

Οι ταννίνες (προκυανιδίνες, συμπυκνωμένες και πολυμερισμένες ταννίνες), και οι ανθοκυάνες, ελεύθερες ή ενωμένες με ταννίνες, αποτελούν τις δύο μεγάλες τάξεις των φαινολικών παραγώγων. Βρίσκονται συγκεντρωμένες στα στερεά μέρη του σταφυλίου και περνούν στον οίνο με εκχύλιση ή διάχυση, κατά τις διάφορες τεχνικές παρασκευής των έγχρωμων οίνων. Στο μόριο αυτών των ουσιών υπάρχουν μία ή περισσότερες δραστικές φαινολικές ομάδες. Οι ουσίες αυτές κατατάσσονται σε δύο κατηγορίες, τις πολυμοριακές και τις μονομοριακές φαινόλες. Οι πολυμοριακές φαινόλες έχουν βασικό σκελετό με 15 άτομα άνθρακα (C6-C3-C6) , του τύπου 2-φαινυλ-βενζοπυρόνη (Σχήμα 1) και λέγονται «φλαβονοειδείς φαινόλες», με κύριους εκπροσώπους τις ταννίνες και τις ανθοκυάνες. Οι μονομοριακές φαινόλες, όπως το γαλλικό και το

καφειϊκό οξύ είναι οι μη φλαβονοειδείς φαινόλες.



Σχήμα 1: 2-φαινυλ-βενζοπυρόνη

1.1.1 Χημεία των φαινολικών παραγώγων

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 (Κουράκου, Σ., 1998).

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 όρθο ή πάρα θέση. Στο φαινόμενο του συντονισμού οφείλεται η σταθερότητα του βενζολικού δακτυλίου, με συνέπεια να σπάει πολύ δύσκολα, ενώ δίνει αντιδράσεις αντικατάστασης και σπάνια προσθήκης. Οι ανθοκυάνες και οι συμπυκνωμένες ταννίνες των σταφυλιών και των οίνων, λόγω των -OH των θέσεων 5 και 7 του πυρήνα A, παρουσιάζουν +R φαινόμενο συντονισμού (δηλαδή είναι δότες ηλεκτρονίων), με αποτέλεσμα να εμφανίζουν αρνητικά φορτία στις κορυφές 6 και 8 του πυρήνα A και επομένως μπορούν να αντιδράσουν με ηλεκτρονιόφιλα αντιδραστήρια. Συμπερασματικά, η εμφάνιση

ηλεκτρικών φορτίων στα μόρια των ανθοκυανών και των ταννινών τους δίνει τη δυνατότητα να συμπεριφέρονται ως ηλεκτρονιόφιλα ή πυρηνόφιλα αντιδραστήρια και ως εκ τούτου συμμετέχουν σε αντιδράσεις ανθοκυανών-ταννινών (Κοτσερίδης, Γ., 2006).

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 δραστικότητα 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 οίνων.

Οι ανθοκυάνες αποτελούνται από ένα άγλυκο φαινολικό συστατικό (C6-C3- C6) και ένα αλδεϋδοσάκχαρο, συνήθως γλυκόζη. Η συνήθης μορφή της γλυκόζης σε ελεύθερη κατάσταση είναι η ημιακεταλική, αφού το καρβονύλιο αντιδρά με το αλκοολικό οξύ της θέσης -4 και σχηματίζεται ένας ετεροκυκλικός εξαμελής δακτύλιος, το πυράνιο. Όταν ένα από τα φαινολικά -OH του άγλυκου φαινολικού συστατικού αντιδράσει με το -OH του άνθρακα της ημιακετάλης, σχηματίζεται ακετάλη. Συνεπώς οι ανθοκυάνες είναι ετεροζίτες, όπου το άγλυκο και το σάκχαρο είναι συνδεδεμένα με ακεταλικό δεσμό και όχι με αιθερικό. Επειδή οι ακετάλες υδρολύονται εν θερμώ σε όξινο περιβάλλον, είναι δυνατή η μελέτη των φυσικών ετεροζιτών και των άγλυκων των φαινολικών συστατικών, μεταξύ των οποίων και οι ανθοκυανιδίνες, δηλαδή το άγλυκο των ανθοκυανών.

Η οξειδωση των φαινολών έχει μεγάλη σημασία στην οινολογία. Το πρώτο στάδιο είναι η δημιουργία μιας ελεύθερης ρίζας, με ένα άτομο οξυγόνου μονοσθενές με ένα μονήρες ηλεκτρόνιο, με την απομάκρυνση του -H από το φαινολικό -OH. Λόγω του φαινομένου του συντονισμού, σχηματίζεται ρίζα

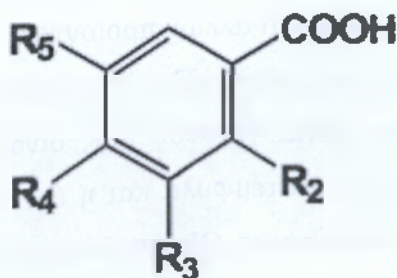
που σε θέση ο- ή π- έχει ένα τρισθενές άτομο άνθρακα με ένα μονήρες ηλεκτρόνιο. Αυτές οι ρίζες είναι πολύ ασταθείς και αντιδρούν γρήγορα μεταξύ τους ή με άλλη ρίζα, σχηματίζοντας δεσμούς C-C, C-O και O-C. Στη συνέχεια, οξειδώσεις των προϊόντων οξείδωσης και οξειδώσεις με υπόστρωμα διάφορα σύνθετα φαινολικά παράγωγα, οδηγούν σε πολυμερισμένα παράγωγα με καστανόμαυρο χρώμα. Σε τέτοιους μηχανισμούς αποδίδεται το καφέτιασμα των οίνων (Κουράκου, Σ., 1998). Τα ένζυμα που εμπλέκονται στην οξείδωση των φαινολικών συστατικών είναι οι πολυφαινολοξειδάσες. Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται οι οξειδοαναγωγάσες ή τυροσινάσες που βρίσκονται σε υγρή σταφύλια και η λακκάση (EC 1.10.3.2) που βρίσκεται σε σταφύλια προσβεβλημένα από *Botrytis cinerea*. Οι τυροσινάσες οξειδώνουν τις διφαινόλες (κατεχολάση ή οξειδάση της κατεχόλης, EC 1.10.3.1) και τις μονοφαινόλες (κρεζολάση ή μονοοξυγονάση της μονοφαινόλης, EC 1.14.18.1) σε κινόνες. Τα ένζυμα αυτά είναι μερικώς διαλυτά στο γλεύκος, έχουν μειωμένη δραστηριότητα μετά τη διαύγαση, είναι αρκετά ευαίσθητα στο διοξείδιο του θείου και απομακρύνονται κατά την κατεργασία με μπεντονίτη. Ο μηχανισμός της οξείδωσης ξεκινά με τη δράση της τυροσινάσης, παρουσία οξυγόνου, στα υδροξυκιναμμωμικά οξέα, η οποία οδηγεί στην παραγωγή κινόνης. Αυτό είναι και το πρώτο στάδιο της καστανώσης, ενώ οι επόμενες αντιδράσεις που οδηγούν στο σχηματισμό καστανών χρωστικών και άλλων προϊόντων, δεν είναι ενζυμικές. Οι κινόνες τότε μετέχουν στον σχηματισμό άλλων προϊόντων και σε αντιδράσεις συμπύκνωσης και οξείδωσης. Είναι γεγονός πως οινοποιητικές πρακτικές όπως η παρατεταμένη επαφή με τα στέμφυλα και η έντονη πίεση, ενισχύουν την τάση του οίνου προς την καστανώση (Nunez-Delicato, E. et al., 2007, Sanchez-Ferrer, A. et al., 1988, Weemaes, C.A. et al., 1998, Ho, P. et al., 1999).

Τέλος αναφέρεται πως οι φλαβονοειδείς φαινόλες έχουν στο μόριό τους έναν δακτύλιο πυρυλίου που τους προσδίδει χαρακτηριστικές ιδιότητες, κάποιες από τις οποίες χρησιμοποιούνται κατά την εξέταση των ανθοκυανών. Συγκεκριμένα το μόριο των φυσικών φλαβονοειδών φαινολών αποτελείται από δύο βενζολικούς δακτυλίους ενωμένους με πυρυλικό δακτύλιο και μπορεί να είναι ή όχι επίπεδο, ανάλογα με τους δεσμούς των τριών ατόμων άνθρακα του πυρυλίου (Κουράκου, Σ., 1998).

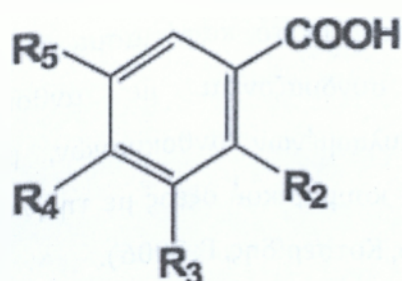
1.1.2 Μη φλαβονοειδείς φαινόλες

Στην κατηγορία των μη φλαβονοειδών φαινολών υπάγονται μονομοριακά φαινολικά παράγωγα που βρίσκονται στο σταφύλι και στον οίνο. Η παρουσία τους στον οίνο οφείλεται είτε στο σταφύλι, όπου απαντούν στους φλοιούς και στη σάρκα, είτε στο ξύλο των βαρελιών που χρησιμοποιήθηκαν για την παλαίωση. Οι ερυθρές ποικιλίες και οίνοι περιέχουν μεγαλύτερες ποσότητες σε σχέση με τα αντίστοιχα λευκά. Κύριοι εκπρόσωποι είναι τα φαινολοξέα και ειδικότερα τα παράγωγα του βενζοϊκού (Σχήμα 2, Πίνακας 1) και του κινναμωμικού οξέος (Σχήμα 3, Πίνακας 2), των οποίων ένα ή περισσότερα υδρογόνα των ανθράκων του δακτυλίου έχουν αντικατασταθεί με υδροξυλομάδες και μεθόξυ ομάδες, και τα στυλβένια (Κουράκου, Σ., 1998, Κοτσερίδης, Γ. 2006).

Τα φαινολοξέα απαντούν στα σταφύλια ως ετεροζίτες ή εστέρες (ταννίνες γαλλικού και ελλαγικού), όμως κατά την οινοποίηση και συντήρηση των οίνων υδρολύονται αργά, με όξινη υδρόλυση οι ετεροζίτες και με αλκαλική οι εστέρες, με αποτέλεσμα στους οίνους να βρίσκονται και σε ελεύθερη μορφή. Στους ερυθρούς οίνους οι συγκεντρώσεις τους κυμαίνονται από 100 έως 200 mg/L, ενώ στους λευκούς από 10 έως 20 mg/L.



Σχήμα 2 : Βενζοϊκό οξύ (C6-C1)



Σχήμα 3 : Κινναμωμικό οξύ (C6-C3)

Βενζοϊκό οξύ	R	R3	R4	R5
Π-υδροξυβενζοϊκό	H	H	OH	H
Πρωτοκατεχινικό	H	OH	OH	H
Βανιλλικό οξύ	H	OCH ₃	OH	H
Γαλλικό οξύ	H	OH	OH	OH
Συριγγικό οξύ	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Σαλικυλικό	OH	H	H	H

1 : Φαινολικά οξέα, παράγωγα του βενζοϊκού οξέος.

Κινναμωμικό οξύ	R	R3	R4	R5
Π-κουμαρικό οξύ	H	H	OH	H
Καφεϊκό οξύ	H	OH	OH	H
Φερουλικό οξύ	H	OCH ₃	O	H
Σιναιπικό οξύ	H	3	H	OCH ₃

Πίνακας 2 :Φαινολικά οξέα, παράγωγα του κανναμωμικού οξέος.

Από τα βενζοϊκά οξέα το σταφύλι περιέχει κυρίως γαλλικό οξύ, το οποίο βρίσκεται συνήθως υπό τη μορφή εστέρων των φλαβονολών-3 (κατεχινών). Από τα κινναμωμικά οξέα, μια μικρή ποσότητα βρίσκεται σε ελεύθερη μορφή, τα περισσότερα είναι εστεροποιημένα, κυρίως με τρυγικό οξύ, ενώ κάποια είναι ενωμένα με γλυκόζη. Τα υδροξυκινναμωμικά οξέα είναι και τα επικρατέστερα στο σταφύλι και βρίσκονται στα χυμοτόπια των κυττάρων του φλοιού και της σάρκας υπό τη μορφή των εστέρων με τρυγικό οξύ (καφεοτρυγικό, π-

κουμαροτρυγικό, φερουλοτρυγικό). Οι εστέρες αυτοί είναι ιδιαίτερα ευοξειδωτά συστατικά του γλεύκους και ευθύνονται για το καφέτιασμα των λευκών γλευκών. Τα κινναμωμικά οξέα συνδυάζονται με ανθοκυανικούς μονογλυκοζίτες, προς σχηματισμό ακυλιωμένων ανθοκυανών, μέσω της εστεροποίησης του καφεϊκού και του π- κουμαρικού οξέος με τη γλυκόζη του γλυκοζίτη (Ribéreau-Gayon, P. et al., 2006, Κοτσερίδης, Γ. 2006).

Τα φαινολικά οξέα είναι άχρωμα όταν βρίσκονται σε αλκοολικό διάλυμα, αλλά αποκτούν κίτρινο χρώμα όταν οξειδωθούν. Δεν έχουν ιδιαίτερη γεύση ή οσμή, αλλά αποτελούν πρόδρομες ενώσεις πτητικών φαινολών που παράγονται από κάποιους μικροοργανισμούς, όπως ζύμες του γένους *Brettanomyces* και ορισμένα βακτήρια. Οι αιθυλφαινόλες έχουν οσμές ζώου και απαντώνται σε ερυθρούς οίνους, όπως και οι αιθυλγουαϊακόλες. Σε λευκούς οίνους υπάρχουν βινυλφαινόλες και βινυλγουαϊακόλες. Οι ενώσεις αυτές προέρχονται από το π-κουμαρικό οξύ και το φερουλικό, μετά από διάσπασή τους.

Το ψήσιμο στο οποίο υποβάλλεται το ξύλο που προορίζεται να χρησιμοποιηθεί στην παρασκευή δρύινων βαρελιών έχει σαν αποτέλεσμα τη διάσπαση της λιγνίνης και το σχηματισμό διάφορων προϊόντων με οσμές καπνιστού, ψημένου ή καμένου, όπως είναι η γουαϊακόλη, η μεθυλγουαϊακόλη, η προπυλγουαϊακόλη, η ισοευγενόλη, η συρινγγόλη και η μεθυλσυρινγγόλη. Οι ενώσεις αυτές καταλήγουν στους οίνους που παλαιώνουν στα καινούρια αυτά δρύινα βαρέλια (Ribéreau-Gayon, P. et al., 2006, Proestos, C. et al., 2005).

Άλλη μια ένωση της ίδιας ομάδας είναι η τυροσόλη, η οποία απαντάται σε ερυθρούς και λευκούς οίνους. Παράγεται κατά την αλκοολική ζύμωση από την τυροσίνη. Η τυροσόλη, της οποίας η συγκέντρωση παραμένει σχετικά σταθερή κατά την παλαίωση του οίνου, συνυπάρχει με άλλες μη φαινολικές αλκοόλες, όπως η τρυπτοφόλη (0-1 mg/L) και η φαινυλαιθυλαλκοόλη (10-75 mg/L).

Οι κουμαρίνες είναι παράγωγα του κινναμωμικού οξέος και σχηματίζονται από την ενδομοριακή εστεροποίηση ενός φαινολικού ΟΗ. Είναι συστατικά του ξύλου της δρυός, είτε σε γλυκοζιτική μορφή στο πράσινο ξύλο, είτε σε άγλυκη μορφή στο ώριμο ξύλο. Αν και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις (μg/L), απαντώνται σε οίνους που έχουν παλαιώσει σε βαρέλια, επηρεάζοντας τις οργανοληπτικές τους ιδιότητες. Σαν γλυκοζίτες είναι πικρές και σε άγλυκη μορφή είναι όξινες, με κατώφλι αντίληψης σε ερυθρούς οίνους τα 3 μg/L.

(Ribéreau-Gayon, P. et al., 2006).

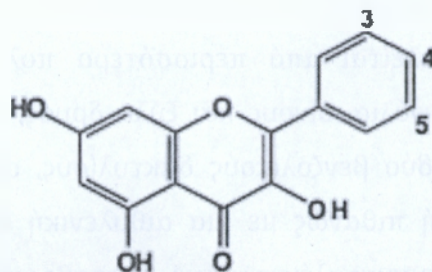
Άλλη μια οικογένεια που αποτελείται από περισσότερο πολύπλοκες πολυφαινόλες και απαντώνται σε σταφύλια, οίνους και ξύλο δρυός, είναι τα στυλβένια. Πρόκειται για ενώσεις με δύο βενζολικούς δακτυλίους, οι οποίοι συνδέονται συνήθως με ένα αιθάνιο ή πιθανώς με μια αιθυλενική αλυσίδα. Μεταξύ αυτών των *trans* ισομερών συγκαταλέγεται και η ρεσβερατρόλη ή αλλιώς το 3,5,4'-τριυδροξυστυλβένιο, ενώ απαντάται και το παράγωγό της με γλυκόζη. Παράγεται σε περιπτώσεις στρες, όπως μετά από προσβολή από μύκητες. Βρίσκεται στους φλοιούς, όχι στα γίγαρτα, και η περιεκτικότητα των φλοιών διαφέρει από ποικιλία σε ποικιλία. Εκχυλίζεται κυρίως κατά την αλκοολική ζύμωση των ερυθρών οίνων. Η συγκέντρωσή της κυμαίνεται από 1 έως 3 mg/L και έχει διαπιστωθεί πως είναι ευεργετική για την υγεία (Κοτσερίδης, Γ. 2006, Ribéreau-Gayon, P. et al., 2006, Dell' Agli et al., 2004, Nikfardjam, M. S. P. et al., 2006, Scheiber, A. et al., 2002).

Εξαιτίας της αντιβακτηριακής δράσης των φαινολοξέων, θεωρούνται υπεύθυνα σε κάποιο βαθμό για τις δυσκολίες εκδήλωσης της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Προσβολή των σταφυλίων από *Botrytis cinerea* καταστρέφει τα φαινολικά οξέα, εκτός από το γαλλικό. Τέλος είναι ευοξειδωτα, ειδικά αυτά που έχουν δύο - OH σε ο-θέση, με συνέπεια τον σχηματισμό καστανόμαυρων ουσιών με δομή κινόνης (καφέτιασμα οίνων) (Κουράκου, Σ., 1998).

1.1.3 Φλαβονοειδείς φαινόλες

1.1.3.1 Φλαβονόλες

Τα φλαβονοειδή χαρακτηρίζονται από ένα βασικό σκελετό με 15 άτομα άνθρακα του τύπου 2-φαινυλ-βενζοπυρόνη. Χωρίζονται σε πολλές ομάδες, οι οποίες διαχωρίζονται ανάλογα με το βαθμό οξειδωσης του πυρανικού δακτυλίου. Με βάση τη δομή της 2-φαινυλ-βενζοπυρόνης, αντιπροσωπεύονται μόνο από τις φλαβονόλες της σταφυλής, ενώ με την ευρεία έννοια του όρου συμπεριλαμβάνονται και οι ανθοκυάνες και οι φλαβανόλες-3. Οι φλαβονόλες απαντούν μόνο στους φλοιούς υπό μορφή γλυκοζιτών στη θέση 3. Στο Σχήμα 4 παρουσιάζεται ο χημικός τύπος της άγλυκης μορφής των τεσσάρων βασικών φλαβονολών του σταφυλιού (Πίνακας 3).



Σχήμα 4 : Φλαβονόλη

Φλαβονόλη	-OH	-OCH ₃
Καμπφερόλη	4'	
Κερκετίνη	3',4	
μυρικετίνη	3',4',5'	
ισοραμνετόλη	4'	3'

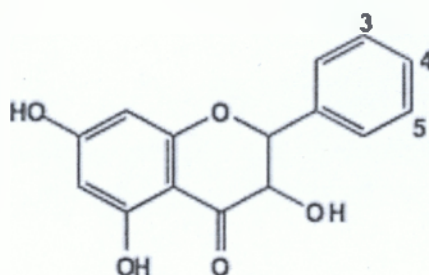
Πίνακας 3 : Φλαβονόλες του σταφυλιού

Στο σταφύλι βρέθηκαν οκτώ μονογλυκοζίτες και τρεις διγλυκοζίτες των φλαβονολών. Οι μορφές των γλυκοζιτών (με γλυκόζη) απαντούν σε πολύ μεγαλύτερες ποσότητες, αλλά βρίσκονται και σημαντικές ποσότητες των εστέρων τους με το γλυκουρονικό οξύ. Τα άλλα σάκχαρα που απαντούν είναι η γαλακτόζη, η ξυλόζη και η αραβινόζη. Τόσο οι λευκές, όσο και οι ερυθρές ποικιλίες αμπέλου περιέχουν τις ίδιες ποσότητες φλαβονολών, διαφέρουν όμως στην ποιοτική τους σύσταση. Η περιεκτικότητα των φλαβονολών ποικίλει από 10 έως 100 mg/kg ραγών. Τα παράγωγα της κερκετίνης είναι πάντα κυρίαρχα, ενώ αυτά της μυρικετίνης και του γλυκοζίτη-3 της ισοραμνετόλης φαίνεται ότι απαντούν μόνο στις λευκές ποικιλίες. Στους ερυθρούς οίνους απαντούν στην ποσότητα των 100 mg/L περίπου, ενώ στους λευκούς 1-3 mg/L (Κοτσερίδης, Γ., 2006).

1.1.3.2 Φλαβανονόλες

Οι ενώσεις που ανήκουν σε αυτή την οικογένεια (Σχήμα 5) είναι γλυκοζίτες και ταυτοποιήθηκαν σε φλοιούς λευκών ποικιλιών. Πρόκειται για την διυδροκερκετίνη και τη διυδροκαμπφερόλη και έχουν πολύ ανοιχτό κίτρινο

χρώμα.



Σχήμα 5 : Φλαβανονόλη

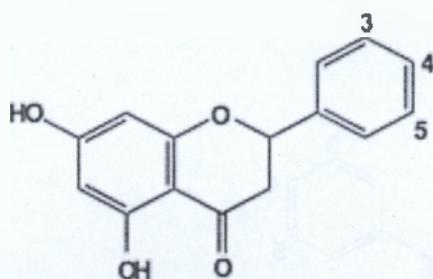
Φλαβονόλη	-OH
διυδροκερκετίνη	4', 3'
διυδροκαιμπερόλη	4'
μυρκετίνη	3',4',5'
ισοραμνετόλη	4'

Πίνακας 4 : Φλαβανονόλες του σταφυλιού

Η περιεκτικότητα της διυδροκερκετίνης είναι της τάξης των 9 mg/kg νωπού βάρους και της διυδροκαιμπερόλης της τάξης του 0,6 mg/kg. Οι φλαβανονόλες απαντούν και στους βοστρύχους (Κοτσερίδης, Γ., 2006).

1.1.3.3 Φλαβανόνες

Οι φλαβανόνες (Σχήμα 8) διαφέρουν από τις φλαβονόλες κυρίως λόγω της απουσίας του δραστικού -OH στη θέση 3. Στον Πίνακα 5 παρουσιάζονται οι δύο σημαντικότερες. Οι φλαβανόνες είναι ελάχιστα διαδεδομένες στη φύση και τα παράγωγά τους δεν είναι συστατικά των σταφυλών, αλλά ανήκουν στα φαινολικά συστατικά του ξύλου της δρυός. Επομένως, η παρουσία τους έχει διαπιστωθεί μόνο σε οίνους που παλαιώσαν σε δρύινα βαρέλια (Κουράκου, Σ., 1998).



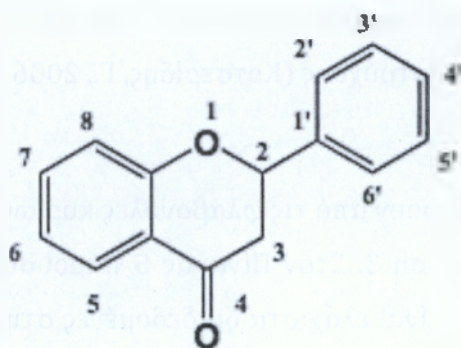
Σχήμα 6: Φλαβανόνη

Φλαβανόνη	-OH	-OCH ₃
ναριγγενίνη	4'	
εσπεριτίνη	3'	4'

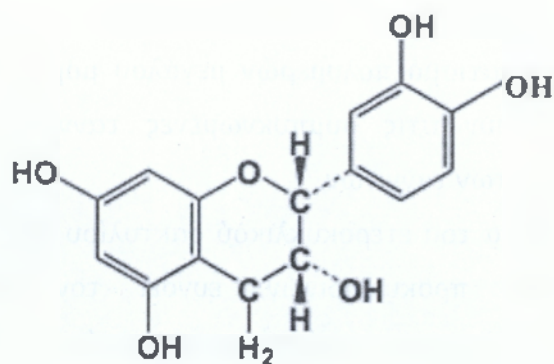
Πίνακας 5 : Φλαβανόνες του σταφυλιού

1.1.4 Κατεχίνες και Προκυανιδίνες

Το παράγωγο της φλαβονόλης που έχει τον κεντρικό δακτύλιο υδρογονωμένο λέγεται φλαβανόλη-3, τα υδροξυλιωμένα παράγωγα της οποίας είναι οι κατεχίνες, με πιο διαδεδομένη την κατεχίνη.



Σχήμα 7 : (+) Κατεχίνη



Σχήμα 8 : (-) Επικατεχίνη

Η κατεχίνη έχει δύο ασύμμετρα άτομα άνθρακα και δίνει τέσσερα ισομερή: την (+) και (-) κατεχίνη και την (+) και (-) επικατεχίνη. Στα σταφύλια και στους οίνους απαντούν κυρίως η (+) κατεχίνη και η (-) επικατεχίνη (Σχήμα 7, Σχήμα 8).

Η κατεχίνη είναι πολύ ευοξειδωτή ουσία και όταν θερμανθεί σε όξινο περιβάλλον πολυμερίζεται προς ενώσεις με χρώμα κίτρινο, που προοδευτικά σκουραίνει, ανάλογα με το βαθμό πολυμερισμού και μπορεί να γίνει καστανόμαυρο. Σε τέτοια φαινόμενα οφείλεται το καφέτσιασμα των οίνων και για τον λόγο αυτό η παρουσία κατεχινών στους λευκούς οίνους είναι ανεπιθύμητη.

Εκτός από τις μονομοριακές κατεχίνες, έχουν βρεθεί στη φύση και συμπυκνωμένα φαινολικά παράγωγα, τα οποία όταν απομονώθηκαν και θερμάνθηκαν παρουσία ανόργανων οξέων έδωσαν κυανιδίνη, κατεχίνη και επικατεχίνη. Επειδή η κυανιδίνη είναι στη φύση το πιο διαδεδομένο ανθοκυανικό άγλυκο, τα παράγωγα αυτά ονομάστηκαν προκυανιδίνες (ή προανθοκυανιδίνες, αφού ορισμένες έδωσαν, αντί για κυανιδίνη, δελφινιδίνη) και είναι αφυδρογονωμένες κατεχίνες. Οι αφυδρογονώσεις μπορούν να συνεχιστούν με συνενώσεις περισσότερων μορίων προς σχηματισμό συμπυκνωμένων προκυανιδινών.

Στα σταφύλια έχουν βρεθεί μέχρι τετραμερείς προκυανιδίνες, ενώ στους νέους οίνους βρίσκονται συνήθως διμερή, οπότε συμπεραίνουμε πως οι προκυανιδίνες μεγαλύτερου βαθμού συμπύκνωσης εκχυλίζονται δύσκολα. Κατά

την ωρίμανση και παλαίωση των οίνων οι προκυανιδίνες ενώνονται μεταξύ τους και με άλλα μόρια, προς σχηματισμό πολυμερών μεγάλου μοριακού βάρους (2.000-3.000) που αντιστοιχούν στις συμπυκνωμένες ταννίνες, γιατί οι προκυανιδίνες είναι πρόδρομοι των ταννινών.

Η εξαιρετική δραστηριότητα του ετεροκυκλικού δακτυλίου της κατεχίνης, της επικατεχίνης και των προκυανιδινών, ευνοεί τον σχηματισμό ενδοφλαβονικών δεσμών. Τα μόρια της κατεχίνης έχουν την τάση να ενώνονται μεταξύ τους ή με μόρια επικατεχίνης προς διμερείς προκυανιδίνες, που με τη σειρά τους ενώνονται προς μεγαλύτερα μόρια (Κουράκου, Σ., 1998). Στα διμερή υπάρχουν δυο βαθμοί αφυδρογόνωσης, άρα έχουμε δύο τύπους προκυανιδινών: A ($C_{30}H_{24}O_{12}$) και B ($C_{30}H_{26}O_{12}$), από τους οποίους μόνο ο B βρέθηκε στα σταφύλια και στους οίνους. Ανάλογα με τη διάταξη των δεσμών μεταξύ των μορίων που τις αποτελούν, διακρίνουμε οχτώ προκυανιδίνες: B1 μέχρι B8. Τα διμερή στις περιπτώσεις B1 μέχρι B4 συνδέονται με δεσμούς C4-C8, ενώ από B5 μέχρι B8 έχουμε C4-C6 δεσμούς. Οι προκυανιδίνες τύπου A είναι διμερή τα οποία, εκτός από δεσμούς C4-C8 και C4-C6, έχουν και δεσμούς είτε μεταξύ C5 ή C7 της τελικής μονάδας, με τον C2 της προηγούμενης μονάδας. Επίσης οι τριμερείς προκυανιδίνες, που είναι λίγες στα σταφύλια, μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες, αυτές του τύπου C, που είναι αντίστοιχες των B διμερών, και του τύπου D, που έχουν δύο ενδοφλαβονικούς δεσμούς, ένας του τύπου A και ένας τύπου B.

Οι ολιγομερείς προκυανιδίνες σχηματίζονται από την ένωση τριών έως δέκα μονάδων, με ενώσεις C4-C8 ή C4-C6. Τα ισομερή που μπορούν να σχηματιστούν είναι πάρα πολλά, κάτι το οποίο εξηγεί γιατί είναι δύσκολος ο διαχωρισμός των μορίων αυτών. Οι συμπυκνωμένες προκυανιδίνες έχουν περισσότερες από δέκα μονάδες και το μοριακό βάρος τους υπερβαίνει τα 3.000 (Prieur, C. et al., 1994, Ribéreau-Gayon, P. et al., 2006, Gonzalez-Rodriguez, J. et al., 2002).

Οι δεσμός C4-C8 και C4-C6 είναι ελάχιστα σταθεροί και σπάνε εύκολα, υπό την επίδραση οξέων, ως καταλυτών. Η διάσπαση οδηγεί στο σχηματισμό καρβοκατιόντος, το οποίο διαθέτει ένα ηλεκτρονιόφιλο κέντρο (θετικό φορτίο) που μπορεί να ενωθεί με πυρηνόφιλες ενώσεις (αρνητικό φορτίο). Στον οίνο, που είναι όξινο υδραλκοολικό διάλυμα, το καρβοκατιόν μπορεί να αντιδράσει

εύκολα με πυρηνόφιλα αντιδραστήρια, όπως είναι η αιθανοθειόλη (Κοτσερίδης, Γ., 2006).

1.1.4.1 Πολυμερισμός προκυανιδινών

Ιδιαίτερα χρήσιμη είναι η γνώση των βασικών αντιδράσεων πολυμερισμού των προκυανιδινών. Τα όξινα διαλύματα των διμερών, ολιγομερών και πολυμερών προκυανιδινών είναι ασταθή. Ακόμα και σε ατμόσφαιρα αζώτου, παρουσία διοξειδίου του θείου, χωρίς φως, το χρώμα αρχικά κιτρινίζει, μετά γίνεται καφέ και σύντομα ακολουθεί καθίζηση. Σε pH 3.2 η αντίδραση διαρκεί δέκα μήνες, στους 5oC, λιγότερους μήνες στους 20 oC και μόνο έναν με δύο μήνες στους 30 oC. Παρουσία οξυγόνου και ειδικά σε υψηλές θερμοκρασίες, η μετατροπή αυτή είναι εντονότερη και τα ιζήματα έχουν διαφορετική μορφή.

Σε όξινο περιβάλλον χωρίς οξυγόνο, οι προκυανιδίνες σχηματίζουν καρβοκατιόν το οποίο μπορεί εύκολα να αντιδράσει με τα αρνητικά φορτία των κορυφών 6 και 8 του δακτυλίου A μιας άλλης προκυανιδίνης, αυξάνοντας έτσι τον βαθμό πολυμερισμού της. Οι πολυμερισμένες προκυανιδίνες, συνεπώς, παράγονται από τον πολυμερισμό C4-C8 ή C4-C6 που λέγεται «οργανωμένος πολυμερισμός». Αντίθετα, σε ένα ισχυρά οξειδωτικό περιβάλλον, παράλληλα με τον (μη οργανωμένο) οξειδωτικό πολυμερισμό των προκυανιδινών, σχηματίζονται και ελεύθερες ρίζες, με αποτέλεσμα, λόγω οξειδώσεων, τη δημιουργία μοριακών συσσωματωμάτων μεγάλου όγκου, τα οποία καθιζάνουν. Στην περίπτωση ελεγχόμενου αερισμού (οίνος σε βαρέλι), σχηματίζεται ακεταλδεΐδη, από την οξείδωση της αλκοόλης. Η ακεταλδεΐδη ευθύνεται για την τροποποίηση της δομής των προκυανιδινών, δεδομένου ότι ο πολυμερισμός μέσω της ακεταλδεΐδης είναι πολύ πιο γρήγορος και παράγονται πολυμερή τα οποία είναι πιθανό να καθιζήσουν, ανάλογα με το βαθμό πολυμερισμού τους και τη συγκέντρωσή τους.

Η ακεταλδεΐδη σε όξινο περιβάλλον πρωτονιώνεται και παράγει ένα αρχικό καρβοκατιόν που ενώνεται με τα αρνητικά φορτία των κορυφών 6 ή 8 των φλαβονολών. Με τον τρόπο αυτό σχηματίζεται βενζυλική αλκοόλη η οποία έχει έναν πολικό δεσμό που είναι εύκολο να σπάσει σε όξινο περιβάλλον, παράγοντας έτσι άλλο ένα καρβοκατιόν που αντιδρά με άλλη φλαβανόλη. Έτσι διάφορες φλαβανόλες, κατεχίνες και προκυανιδίνες, συνδέονται με αιθυλικούς

σταυροδεσμούς. Αυτή η αντίδραση παράγει ετερογενή πολυμερή με πολύ διαφορετικές διατάξεις σε σχέση με τα ομογενή πολυμερή. Τα ετερογενή πολυμερή ευθύνονται για ορισμένες ιδιότητες με μεγάλη οινολογική σημασία. Η αντίδραση μπορεί να προχωρήσει μέχρι το σχηματισμό δωδεκαμερών, με μοριακό βάρος 3600 και διάμετρο 4 nm. Τα αντίστοιχα πολυμερή συνδυάζονται με υδρόφοβους δεσμούς και σχηματίζουν κολλοειδή συσσωματώματα με διάμετρο 400 nm, τα οποία είναι πιθανό να καθιζήσουν. (Ribéreau-Gayon, P. et al., 2006, Κοτσερίδης, Γ., 2006).

Ένας διαφορετικός πολυμερισμός έχει προσδιοριστεί και βασίζεται σε αλδεϋδες, γλυοξυλικό οξύ, φουρφουράλη, μεθυλφουρφουράλη και άλλες. Τα σύμπλοκα που προκύπτουν είναι κίτρινα και έχουν δομή ξανθυλίου. Το γλυοξυλικό οξύ σχηματίζεται από την οξείδωση του τρυγικού οξέος. Η φουρφουράλη βρίσκεται στα σαπισμένα σταφύλια, αλλά επίσης μπορεί να ελευθερωθεί από το ξύλο των βαρελιών, ανάλογα με το βαθμό του ψησίματος που αυτό έχει υποστεί.

Πρόκειται για μια απλή αντίδραση, που ξεκινάει με το σχηματισμό σταυροδεσμού μεταξύ δύο φλαβονομάδων σε όξινο περιβάλλον και συνεχίζει με αφυδάτωση και κυκλοποίηση. Το φλαβένιο που σχηματίζεται οξειδώνεται και παράγεται κίτρινος δακτύλιος ξανθυλίου. Η αντίδραση αυτή συνεισφέρει στη δημιουργία της κίτρινης απόχρωσης που έχουν οι οξειδωμένοι οίνοι και αυτοί που έχουν παραχθεί από σταφύλια προσβεβλημένα από βοτρυτή (Ribéreau-Gayon, P. et al., 2006).

1.1.4.2 Οι προκυανιδίνες των σταφυλιών

Σχετικά με την κατανομή των κατεχινών και των προκυανιδινών στο σταφύλι, πρέπει να αναφερθεί πως τα γίγαρτα περιέχουν τις περισσότερες κατεχίνες (Μ.Ο. 65%) και προκυανιδίνες (Μ.Ο. 56%). Τα ποσοστά αυτά είναι επί του συνόλου των κατεχινών και των προκυανιδινών, ενώ τα υπόλοιπα ποσά μοιράζονται σχεδόν εξίσου στους βόστρυχους και τους φλοιούς, αφού ο χυμός δεν περιέχει σχεδόν καθόλου. Εξαιτίας της ιδιαίτερα στυφής γεύσης των βοστρύχων, θα περιμέναμε να έχουν μεγάλες ποσότητες προκυανιδινών, κάτι τέτοιο όμως δεν ισχύει. Το ποσό των προκυανιδινών των βοστρύχων είναι παρόμοιο με αυτό των φλοιών, όμως διαφέρει ριζικά η σύστασή τους. Αντίθετα

με τους φλοιούς, στους βοστρύχους επικρατούν αλκυλιωμένες προκυανιδίνες, που έχουν ιδιαίτερα στυφή γεύση.

Συμπεραίνουμε λοιπόν πως ο χυμός δεν περιέχει ευοξειδωτες ενώσεις, άρα το γλεύκος τις αποκτάει κατά τη μηχανική επεξεργασία των σταφυλιών, από τυχόν κακή μεταχείριση των φλοιών και των βοστρύχων. Αναφορικά με τους ερυθρούς οίνους, στα γίγαρτα βρίσκονται οι πρόδρομοι των συμπυκνωμένων ταννινών που διαμορφώνουν τη δομή και το σώμα τους, συνεπώς απαιτείται παρατεταμένη παραμονή του ζυμούμενου γλεύκους με τα στέμφυλα, προκειμένου να παρασκευαστούν οίνοι κατάλληλοι προς παλαίωση, γιατί οι φλαβονοειδείς φαινόλες εκχυλίζονται δύσκολα από τα γίγαρτα.

Μια ακόμα σημαντική παρατήρηση είναι πως μεταξύ ποικιλιών η συγκέντρωση των κατεχινών και των προκυανιδινών διαφέρει σημαντικά. Ποικιλίες με μεγάλο ποσοστό γιγάρτων, λόγω μικρών ραγών, ή με μεγάλο αριθμό γιγάρτων ανά ράγα, περιέχουν μεγάλα ποσά των ουσιών αυτών. Μεγάλο πρακτικό ενδιαφέρον επίσης έχει το γεγονός πως οι κατεχίνες και οι προκυανιδίνες που βρίσκονται στα διάφορα μέρη της σταφυλής δεν έχουν την ίδια σύσταση. Οι βόστρυχοι περιέχουν σχεδόν αποκλειστικά (+) κατεχίνη, ενώ υψηλό είναι το ποσοστό της και στους φλοιούς. Στα γίγαρτα η (-) επικατεχίνη συναγωνίζεται την (+) κατεχίνη, ενώ στους φλοιούς η (-) επικατεχίνη είναι σαφώς λιγότερη από την (+) κατεχίνη.

Έτσι εξηγείται το γεγονός ότι εάν το ζυμούμενο γλεύκος διαχωριστεί νωρίς από τα στέμφυλα, ο νέος οίνος θα περιέχει κυρίως (+) κατεχίνη, γιατί σε μικρό χρονικό διάστημα προλαβαίνουν να εκχυλιστούν κυρίως οι φλαβονοειδείς φαινόλες των φλοιών, όπου κυριαρχεί η (+) κατεχίνη. Εάν όμως ο διαχωρισμός αργήσει, πραγματοποιείται και η εκχύλιση από τα γίγαρτα, που έχουν πολλή (-) επικατεχίνη, ο νέος οίνος θα έχει αυξημένες ποσότητες και των δύο ουσιών.

Οι φλοιοί, εκτός από τις ανθοκυάνες, περιέχουν όχι μόνο μονομοριακές κατεχίνες και διμερείς προκυανιδίνες, αλλά και τριμερή και τετραμερή παράγωγά τους, τα οποία αντιπροσωπεύουν υψηλό ποσοστό επί της ολικής περιεκτικότητας σε προκυανιδίνες. Το υψηλό ποσοστό συμπυκνωμένων προκυανιδινών στα σταφύλια υποδηλώνει την αυξημένη τάση πολυμερισμού από το στάδιο της πρωτογενούς παραγωγής, άρα η διαφορά της αντοχής των οίνων στον χρόνο είναι θέμα γενετικού χαρακτήρα της ποικιλίας, αφού

σχετίζεται άμεσα με την τάση πρόωρου πολυμερισμού των κατεχινών και προκυανιδινών (Κουράκου, Σ., 1998, Moreno, D.A. et al. 2003).

1.1.4.3 Κατεχίνες και προκυανιδίνες στους οίνους

Η περιεκτικότητα του οίνου σε κατεχίνες και προκυανιδίνες, όπως είναι αναμενόμενο, εξαρτάται κατά πολύ από την ποικιλία του αμπελιού. Όσον αφορά στην οينوποίηση, στην πρώτη φάση της ερυθρής, οι φλοιοί είναι πολύ σημαντικοί, εξαιτίας της ταχύτητας με την οποία εκχυλίζονται τα ευδιάλυτα μονομοριακά φλαβονοειδή παράγωγα, που αφθονούν στους φλοιούς, με κύρια την (+) κατεχίνη. Όσο μεγαλώνει ο χρόνος παραμονής του ζυμούμενου γλεύκους με τα στέμφυλα, μεγαλώνει ο ρόλος των γιγάρτων, που είναι πλούσια σε κατεχίνη και επικατεχίνη, αλλά κυρίως σε προκυανιδίνες. Τα συστατικά αυτά βρίσκονται σχεδόν στην πλειοψηφία τους στον εξωτερικό μαλακό χιτώνα των γιγάρτων.

Οι οίνοι δεν περιέχουν τόσες προκυανιδίνες όσες τα σταφύλια, γιατί η εκχύλιση είναι ατελής, ενώ κάποια ποσότητα προσροφάται από τους φλοιούς και από άλλα αιωρούμενα στερεά. Επίσης οι προκυανιδίνες ενώνονται με πρωτεΐνες, οξειδώνονται προς μη φαινολικά παράγωγα και πολυμερίζονται προς αδιάλυτα σύμπλοκα που καθιζάνουν. Όπως είναι φυσικό, τα μονομοριακά ευδιάλυτα φαινολικά παράγωγα εκχυλίζονται ευκολότερα σε σχέση με τα συμπυκνωμένα, ενώ στην περίπτωση που πρόκειται για πολυμερισμό τεσσάρων μονάδων και άνω, δεν συμβαίνει καθόλου εκχύλιση (Κουράκου, Σ., 1998). Έτσι, σε νέους οίνους η πλειοψηφία των προκυανιδινών είναι διμερείς και τριμερείς, ενώ οι ερυθροί οίνοι περιέχουν είκοσι φορές περισσότερες προκυανιδίνες σε σχέση με τους λευκούς (Jackson, R.S., 2008). Η περιεκτικότητα ενός ερυθρού οίνου σε ταννίνες εξαρτάται από την ποικιλία και ιδιαίτερα από τις συνθήκες οينوποίησης και κυμαίνεται μεταξύ των 1 έως 4 g/L. στην περίπτωση των λευκών οίνων επηρεάζεται από την ένταση της απολάσπωσης και είναι της τάξης των 100 mg/L, όταν γίνει σωστή απολάσπωση και 200-300 mg/L σε οίνους από μη απολασπωμένα γλεύκη (Κοτσερίδης, Γ., 2006).

1.1.5 Ταννίνες

1.1.5.1 Αντίδραση ταννινών με πρωτεΐνες

Οι πολυφαινόλες και ιδιαίτερα οι ταννίνες, ενώνονται με πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες. Αν και μέχρι τώρα έχουν μελετηθεί πολλοί πιθανοί μηχανισμοί για τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ ταννινών και πρωτεϊνών, δεν υπάρχει κάποιο σαφές συμπέρασμα. Οι δύο κύριοι τρόποι σύνδεσης είναι οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και οι δεσμοί υδρογόνου, ενώ οι ιοντικοί ή οι ομοιοπολικοί δεσμοί έχουν δευτερεύουσα σημασία.

Τα μοντέλο των αλληλεπιδράσεων μεταξύ ταννινών και πρωτεϊνών που περιέγραψε ο Haslam το 1981 χρησιμοποιείται μέχρι σήμερα. Όταν η συγκέντρωση των πρωτεϊνών είναι μικρή, οι πολυφαινόλες ενώνονται σε ένα ή περισσότερα σημεία της επιφάνειας της πρωτεΐνης, σχηματίζοντας μια μονή στοιβάδα, λιγότερο υδρόφιλη από την πρωτεΐνη. Έτσι οι πρωτεΐνες συσσωματώνονται και συνεπώς καθιζάνουν.

Όταν η συγκέντρωση των πρωτεϊνών αυξηθεί, οι φαινολικές ενώσεις διασπείρονται στην επιφάνειά τους, όπως προηγουμένως, ενώ ταυτόχρονα σχηματίζονται γέφυρες από ταννίνες μεταξύ των μορίων των πρωτεϊνών. Δηλαδή οι ταννίνες δρουν σαν σύνδεσμοι ή σαν παράγοντες σταυροδεσμών, μεταξύ των διάφορων μορίων πρωτεϊνών. Η επιφανειακή υδρόφοβη στοιβάδα τότε ανασυνδυάζεται και προκαλείται καθίζηση των πρωτεϊνών. Επομένως οι σχετικές συγκεντρώσεις ταννινών και πρωτεϊνών επηρεάζουν το σχηματισμό και την καθίζηση των συμπλόκων μεταξύ τους.

Ένας μεγάλος αριθμός παραγόντων, συμπεριλαμβανομένου του pH, του χρόνου αντίδρασης, της θερμοκρασίας, των διαλυτών και των ιοντικών δυνάμεων, επηρεάζουν τη δημιουργία των συμπλόκων μεταξύ πρωτεϊνών και ταννινών. Μεγάλη σημασία έχει το μέγεθος, η δομή και το φορτίο των ταννινών και η σύστασή τους, αν είναι δηλαδή ενωμένες με ανθοκυάνες, πολυσακχαρίτες ή αν είναι συμπυκνωμένες. Το φορτίο των ταννινών είναι διαφορετικό ανάλογα με τη δομή τους και εξαρτάται από το pH του μέσου.

Επιπλέον, ο τύπος και το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών έχουν μεγάλη σημασία στη δημιουργία αδιάλυτων συμπλόκων. Μεγάλη σημασία έχουν χαρακτηριστικά όπως η σύσταση σε αμινοξέα, η δομή στο χώρο, το μέγεθος και

το φορτίο των πρωτεϊνών. Οι Hagerman και Bulter (1980), έδειξαν ότι οι πρωτεΐνες με υψηλή περιεκτικότητα σε προλίνη έχουν μεγάλη συνάφεια με τις συμπυκνωμένες ταννίνες. Η ιδιότητα αυτή επιδρά στις οργανοληπτικές ιδιότητες των ταννινών στους ερυθρούς οίνους και είναι σημαντική σχετικά με τη διαύγηση, κάτι που εξηγεί τη σημασία της σύστασης των πρωτεϊνών που χρησιμοποιούνται για τη διαύγηση (Ribéreau-Gayon, P. et al., 2006, Mateus, N. et al., 2004).

Η κοινή ιδιότητα των ταννινών, λοιπόν, είναι πως ενώνονται με πρωτεΐνες και άλλα πολυμερή, όπως οι πολυσακχαρίτες. Για να δώσουν σταθερές ενώσεις οι ταννίνες με πρωτεΐνες, θα πρέπει να είναι αρκετά ογκώδεις, όχι όμως υπερβολικά, γιατί σε αυτή την περίπτωση ενδέχεται να μην μπορούν να πλησιάσουν τις δραστικές θέσεις των πρωτεϊνών, για να αντιδράσουν. Τα μοριακά βάρη των δραστικών ταννινών κυμαίνονται από 600 έως 3.500 (Κοτσερίδης, Γ., 2006). Καθώς οι ταννίνες ενώνονται με τις πρωτεΐνες των σιελογόνων αδένων, μειώνεται η ικανότητα ύγρανσης του στόματος και αναστέλλεται η δράση των ενζύμων του εκκρίματος, λόγω δέσμευσης της πρωτεϊνικής ομάδας τους, οπότε φράσσουν οι βλεννογόνοι και παρεμποδίζεται η εκροή του σάλιου. Έτσι προκαλείται μια αίσθηση σκληρότητας και τραχύτητας στη γλώσσα και σε όλο το στόμα και δημιουργείται η χαρακτηριστική στυφή γεύση ορισμένων ερυθρών οίνων.

Οι αντιδράσεις των προκυανιδινών με τους πολυσακχαρίτες στα κυτταρικά τοιχώματα των φλοιών των σταφυλιών αποτελούν ένα ακόμα είδος συμπλόκου. Έχει βρεθεί πως οι όξινοι πολυσακχαρίτες (πηκτίνες) με κύρια μονάδα το α-D- γαλακτουρονικό οξύ και οι αραβινογαλακτάνες δίνουν πολύ σταθερές αντιδράσεις με τις προκυανιδίνες. Ακόμα, παρουσία των πρωτεϊνών προάγουν το σχηματισμό συμπλόκων ταννινών, και αυτό αποτελεί σημαντικό παράγοντα για τη δημιουργία του συνεχούς σχηματισμού φυσαλίδων στους αφρώδεις οίνους (Κοτσερίδης, Γ., 2006, Κουράκου, Σ., 1998).

1.1.5.2 Υδρολυόμενες ταννίνες

Οι ταννίνες της φύσης διακρίνονται στις υδρολυόμενες και τις συμπυκνωμένες, οι οποίες περιλαμβάνουν τις ταννίνες των οίνων.

Οι υδρολυόμενες ταννίνες, αποτελούνται από ένα μόριο σακχάρου, κυρίως

γλυκόζης ή ένα μόριο πολυσακχαρίτη, του οποίου πολλά -OH είναι εστεροποιημένα με διάφορα φαινολικά οξέα, όπως το γαλλικό (γαλλοταννίνες), το διγαλλικό (ή ταννικό) και το ελλαγικό (ελλαγιταννίνες). Τέτοιες ταννίνες αφθονούν στο ξύλο της δρυός, οπότε οι οίνοι που παλαιώθηκαν σε ξύλινα βαρέλια περιέχουν διάφορες μικροποσότητες γαλλικού και ελλαγικού οξέος που είναι προϊόντα υδρόλυσης των ταννινών του ξύλου (Κουράκου, Σ., 1998).

Τα δύο κύρια ισομερή ελλαγιταννίνης της δρυός είναι η βεσκαλαγίνη και η κασταλαγίνη, με μοριακό βάρος 934, ενώ δευτερεύουσας σημασίας είναι η γραντανίνη και η ρομπουρίνη. Τα μόρια αυτά έχουν εξαυδροξυδιφαινικό οξύ και νοναυδροξυδιφαινικό οξύ, εστεροποιημένα με μια μη κυκλική γλυκόζη. Η μερική υδρόλυση της βεσκαλαγίνης και της κασταλαγίνης έχει σαν αποτέλεσμα την απώλεια του εξαυδροξυδιφαινικού οξέος και την παραγωγή βεσκαλίνης και κασταλίνης, με μοριακό βάρος 632. Η σύσταση του ελλαγιταννικού περιεχομένου του ξύλου της δρυός εξαρτάται από το είδος της. Τέσσερις μονομερείς και τέσσερις διμερείς ελλαγιταννίνες (ρομπουρίνη Α, Β, C και D) απαντώνται στις ευρωπαϊκές δρύες, ενώ οι αμερικάνικες έχουν μόνο διμερείς.

Εκτός από τις ταννίνες που προέρχονται από τα δρύινα βαρέλια, υδρολυόμενες είναι και οι οινολογικές ταννίνες που χρησιμοποιούνται για τη διαύγαση του οίνου. Οπότε σε οίνους που έχουν υποστεί κολλάρισμα με προσθήκη ταννίνης, βρίσκεται και υδρολυόμενη ταννίνη, εκτός από τις συμπυκνωμένες, που είναι φυσικά συστατικά του. Το ελλαγικό οξύ που βρίσκεται στους οίνους προέρχεται πάντα από το ξύλο ή την προσθήκη οινολογικής ταννίνης, ενώ το γαλλικό, επειδή υπάρχει στους φλοιούς και στα γιγάρτα, είναι πάντα παρόν (Ribéreau-Gayon, P. et al., 2006, Matejicek, D. et al., 2005).

1.1.5.3 Συμπυκνωμένες ταννίνες

Οι συμπυκνωμένες ταννίνες σχηματίζονται από αντιδράσεις πολυμερισμού της προκυανιδίνης (Κουράκου, Σ., 1998). Οι ταννίνες του σταφυλίου διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τον βαθμό πολυμερισμού. Οι ταννίνες των γιγάρτων είναι λιγότερο πολυμερισμένες από αυτές των φλοιών, στην περίπτωση των γιγάρτων αποτελούνται από 28 φαινολικές μονάδες, ενώ οι ταννίνες των φλοιών έχουν πάνω από 74 μονάδες (Jackson, R. S., 2008).

Στους οίνους οι μονομοριακές προκυανιδίνες οξειδώνονται και με συνένωση μερικών μορίων τους δίνουν ταννίνες μικρού μοριακού βάρους (1.000- 2.000) με κίτρινο χρώμα και πολύ στυφή γεύση. Πρόκειται για το 1-5% των συμπυκνωμένων φαινολικών παραγώγων των οίνων, συνεπώς η συμβολή τους στη διαμόρφωση των οργανοληπτικών χαρακτήρων είναι ελάχιστη. Όταν όμως οι μονομοριακές προκυανιδίνες υποστούν μη οξειδωτική συμπύκνωση, σχηματίζονται συμπυκνωμένες ταννίνες, που έχουν χρώμα πορτοκαλοκίτρινο, μοριακό βάρος από 2.000 μέχρι 3.000, το οποίο αντιστοιχεί στον μέγιστο ταννικό χαρακτήρα, με βαθμό συμπύκνωσης περίπου 10.

Οι συμπυκνωμένες ταννίνες αποτελούν το σώμα του οίνου. Αντιπροσωπεύουν το 30-60% των ολικών φαινολικών παραγώγων και το ποσοστό τους αυξάνεται με την ηλικία του οίνου (Κουράκου, Σ., 1998). Κατά την παλαίωση, οι προκυανιδίνες, με αργό ρυθμό, σχηματίζουν πολυμερή που περιλαμβάνουν αλυσίδες μήκους 8 έως 14 μονάδων. Το μοριακό βάρος των ταννινών αυτών κυμαίνεται από 2.000 έως πάνω από 5.000 (Jackson, R. S., 2008). Οι αλυσίδες τους σχηματίζουν ένα είδους σκελετό, στον οποίο προστίθενται και άλλα μόρια (πεπτίδια, πολυσακχαρίτες, ανόργανα στοιχεία, νερό, τρυγικό οξύ). Η παρεμβολή πολυσακχαριτών και πεπτιδίων απενεργοποιεί τις ταννικές ιδιότητες των συμπυκνωμένων ταννινών, μειώνοντας τη δραστικότητα επί των πρωτεϊνών και επομένως προκαλείται γευστικό μαλάκωμα των οίνων, όταν αυτοί παλαιώνουν υπό κατάλληλες συνθήκες.

1.1.5.4 Χαρακτηριστικά και διαφορές των ταννινών του σταφυλίου

Σύμφωνα με μελέτη του Ribéreau-Gayon το 1970, υπάρχουν διαφορετικά είδη ταννινών στους φλοιούς, τα γίγαρτα και τους βοστρύχους. Οι ταννίνες των γιγάρτων είναι προκυανιδίνες, με σχετικά μικρό βαθμό πολυμερισμού κατά την αλλαγή του χρώματος, που αυξάνεται κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης (Ribéreau- Gayon, P. et al., 2006). Το κυριότερο олиγομερές των φλοιών, από ποσοτική άποψη, είναι η προκυανιδίνη B1, ενώ στα γίγαρτα επικρατεί η B2 (Gonzalez-Manzano, S. et al., 2004). Η ποσότητα των διμερών και των τριμερών μειώνεται από το αρχικό 90% και οι τιμές του δείκτη υδροχλωρίου που είναι ενδεικτικός του βαθμού πολυμερισμού, αυξάνεται εντυπωσιακά, από 12 σε 40. Αυτά τα ελεύθερα, μη κολλοειδή μόρια είναι πολύ δραστικά με τις πρωτεΐνες (ο

δείκτης ζελατίνης που εκφράζει αυτή την ικανότητα είναι της τάξης του 80). Συνεπώς, οι προκυανιδίνες αυτές έχουν ιδιαίτερες ταννικές ιδιότητες, δηλαδή δημιουργούν έντονη στυπτικότητα.

Οι ταννίνες των φλοιών έχουν πιο πολύπλοκες δομές και δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερη διαφοροποίηση ως προς το βαθμό πολυμερισμού τους. Η ποσότητα των διμερών και των τριμερών είναι ήδη χαμηλή στην αλλαγή του χρώματος και δύσκολα αλλάζει κατά την ωρίμανση, ενώ ο δείκτης υδροχλωρίου είναι σχετικά σταθερός (12-15). Τα μόρια αυτά έχουν κολλοειδείς ιδιότητες και κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης γίνονται όλο και λιγότερο δραστικά με τις πρωτεΐνες της ζελατίνης (ο δείκτης μπορεί να μειωθεί κατά 40%). Έτσι οι ταννίνες των φλοιών γενικά αδρανοποιούνται κατά την ωρίμανση, με συνέπεια να χάνουν την επιθετικότητα και τη στυπτικότητά τους. Τέλος, οι ταννίνες των βόστροχων είναι πολυμερισμένες, μη κολλοειδείς προκυανιδίνες, με δείκτη υδροχλωρίου από 35 έως 40 και με δραστηριότητα παρόμοια με αυτή των ταννινών των γιγάρτων.

Τα διάφορα μέρη του τσαμπιού περιέχουν φαινολικά συστατικά που μπορούν να διαχωριστούν σε διάφορες κατηγορίες. Οι φλοιοί έχουν κυρίως υψηλές συγκεντρώσεις συμπλόκων ταννινών-πολυσακχαριτών και ταννινών-πρωτεϊνών, τα οποία δίνουν μια ευχάριστη αίσθηση στρογγυλότητας. Από την άλλη πλευρά, οι βόστρυχοι και τα γίγαρτα έχουν υψηλές συγκεντρώσεις πολυμερισμένων προκυανιδινών και συμπυκνωμένων ταννινών, οι οποίες δημιουργούν έντονη στυπτικότητα. Υπάρχει παρόμοια αναλογία κατεχινών και σχετικά λίγο πολυμερισμένων προκυανιδινών σε όλα τα μέρη του τσαμπιού του σταφυλιού.

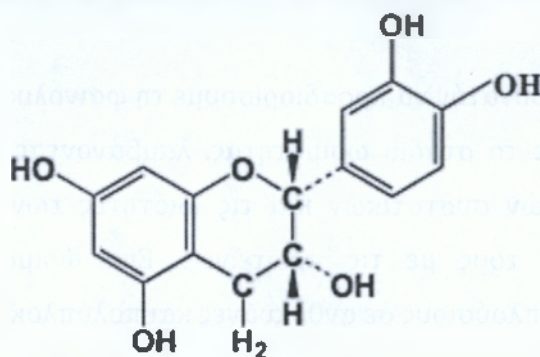
Συμπερασματικά, είναι δυνατόν να προσδιορίσουμε τη φαινολική σύσταση των σταφυλιών, ανάλογα με το στάδιο ωριμότητας, λαμβάνοντας υπόψη τη συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών και τις ιδιότητες των ταννινών, ιδιαίτερα τη δραστηριότητά τους με τις πρωτεΐνες. Ένα ώριμο σταφύλι χαρακτηρίζεται από φλοιούς πλούσιους σε ανθοκυάνες και πολύπλοκες, σχετικά αδρανείς ταννίνες, ενώ τα γίγαρτά του περιέχουν μικρές ποσότητες πολυμερισμένων ταννινών, οι οποίες αντιδρούν έντονα με πρωτεΐνες. Μη ώριμα σταφύλια, από την άλλη πλευρά, έχουν φλοιούς με χαμηλές συγκεντρώσεις ανθοκυανών και σχετικά απλές ταννίνες, οι οποίες έχουν χάσει τη δραστηριότητά

τους, αλλά και γίγαρτα με μεγάλα ποσά ελαφρώς πολυμερισμένων και συνεπώς πολύ δραστικών ταννινών (Ribéreau-Gayon, P. et al., 2006, Kennedy, J.A. et al., 2000, Tinkilic, N. and Uyanic, A., 2001).

1.1.6 Ανθοκυάνες

Οι ανθοκυάνες ανήκουν στις φλαβονοειδείς φαινόλες και είναι υπεύθυνες για το πορφυρό, ερυθρό, πορτοκαλί, κυανό και ιώδες χρώμα τμημάτων των φυτών. (Κουράκου, Σ., 1998). Στα σταφύλια βρίσκονται κυρίως στους φλοιούς, αλλά στις μαύρες ποικιλίες υπάρχουν και στη σάρκα. Επίσης απαντώνται σε μεγάλες ποσότητες στα φύλλα, κυρίως στο τέλος της ανάπτυξής τους (Ribéreau-Gayon, P. et al., 2006). Για πρώτη φορά απομονώθηκε ανθοκυάνη από σταφύλι το 1879 και από τότε αποτελεί αντικείμενο εκτεταμένων ερευνών (Mantell, C. et al., 2002, Kosir, I.J. et al., 2004).

Οι ανθοκυάνες, σε αντίθεση με το σύνολο των φαινολών, μπορούν να αποτελέσουν καθοριστικό παράγοντα για την κατάταξη των οινοποιήσιμων ποικιλιών (Kallithraka, S. et al., 2001, Nunez, V. et al., 2004). Απαντούν στη φύση σε μορφή ετεροζιτών, οι οποίοι ως ακετάλες, υδρολύονται εύκολα προς ένα άγλυκο και ένα ή περισσότερα μόρια σακχάρων. Τα άγλυκα τμήματα λέγονται ανθοκυανιδίνες και έχουν τύπο C₆-C₃-C₆. Έχουν τη βασική δομή του φλαβυλίου (Σχήμα 9), το μόριό τους αποτελείται από δύο βενζολικούς δακτυλίους, που περιβάλλουν ένα δακτύλιο πυρυλίου. Ο δακτύλιος 1 φέρει πάντα δύο φαινολικά -OH στις θέσεις -5 και -7 και ο δακτύλιος 2 ένα φαινολικό -OH στη θέση -4' (Brouillard, R. et al., 2003, Κουράκου, Σ., 1998).



Σχήμα 9 : Φλαβύλιο

Από τις εννέα ανθοκυανιδίνες που είναι γνωστές οι τρεις δεν έχουν -OH στη θέση -3 και είναι σπάνιες. Οι έξι που είναι πολύ διαδεδομένες, έχουν -OH στη θέση -3 και στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι ανθοκυανιδίνες των έγχρωμων σταφυλιών και οίνων (Πίνακας 6). Οι διαφορές μεταξύ τους περιορίζονται στον αριθμό των -OH και -OCH₃ των θέσεων R1 και R2, ο οποίος επηρεάζει τη σταθερότητα και το χρώμα της ανθοκυάνης (Κουράκου, Σ., 1998). Με την αύξηση των ελεύθερων υδροξυλομάδων αυξάνεται το μπλε χρώμα, ενώ το κόκκινο ενισχύεται ανάλογα με την αύξηση του βαθμού μεθυλίωσης (Jackson, R. S., 2008).

Από τις ανθοκυανιδίνες των σταφυλιών και των οίνων η πιο διαδεδομένη είναι η κυανιδίνη, παρά το γεγονός ότι είναι, μαζί με τη δελφινιδίνη, η πιο ασταθής, λόγω των φαινολικών -OH σε ο-θέση. Αυτές οι δύο είναι και οι πρόδρομοι ανθοκυανιδινών σταθερότερων μορφών, όπως η παιονιδίνη και η μαλβιδίνη, που δεν έχουν -OH σε ο-θέση. Έτσι στα σταφύλια ερυθρών ποικιλιών μετά τον περκασμό εμφανίζεται η κυανιδίνη και η συγκέντρωσή της αυξάνεται, όπως της δελφινιδίνης, τις πρώτες δεκαπέντε μέρες ωρίμανσης, τελικά όμως επικρατεί κατά πολύ η μαλβιδίνη, που είναι η κύρια ανθοκυανιδίνη όλων σχεδόν των σταφυλιών και των έγχρωμων οίνων.

Ανθοκυανιδίνη	R1	R2
Κυανιδίνη	OH	H
Δελφινιδίνη	OH	OH
Παιονιδίνη	OCH ₃	H
Πετουνιδίνη Μαλβιδίνη	OCH ₃ OCH ₃	OH OCH ₃

Πίνακας 6 : Οι ανθοκυανιδίνες των σταφυλιών και των οίνων

Όσον αφορά τα σάκχαρα των ανθοκυανών, όλες οι γνωστές έχουν ένα στη θέση -3, στην οποία το -OH έχει ειδικές ιδιότητες, η γλυκοζιδίωσή του είναι απαραίτητη για τη σταθεροποίηση του μορίου (Κουράκου, Σ., 1998, Jackson, R. S., 2008, Ribereau-Gayon, P. et al., 2006, Beckman, C.H., 2000). Ο μονογλυκοζίτης της μαλβιδίνης αποτελεί τη βάση του χρώματος των ερυθρών σταφυλιών και οίνων, ενώ η ακυλιωμένη μορφή του διαφέρει από ποικιλία σε ποικιλία (Κοτσερίδης, Γ., 2006). Συνήθης στις ελληνικές ερυθρές ποικιλίες αμπέλου είναι η

παρουσία του μονογλυκοζίτη-3 της μαλβιδίνης, ακυλιωμένου με οξικό οξύ, κυρίως όμως με π-κουμαρικό οξύ (Κουράκου Σ., 1998). Στην ποικιλία Αγιωργίτικο απαντώνται και οι δύο ακυλιωμένες μορφές της μαλβιδίνης (Kallithraka, S. et al., 2006).

Εάν στην ανθοκυάνη υπάρχει και δεύτερο σάκχαρο, αυτό βρίσκεται πάντα στη θέση -5. Τα σάκχαρα των ανθοκυανών είναι πάντα αλδόζες και κυρίως γλυκόζη, με την ετεροκυκλική μορφή του πυρανίου. Επίσης στη φύση είναι διαδεδομένες οι ακυλιωμένες ανθοκυάνες, στις οποίες το αλκοολικό -OH της θέσης -6 του σακχάρου

είναι εστεροποιημένο με ένα οργανικό οξύ της αλειφατικής ή της αρωματικής σειράς. Οι ανθοκυάνες των σταφυλιών είναι πάντα μονοσακχαρίτες και κυρίως μονογλυκοζίτες (στην *Vitis vinifera*, ενώ διγλυκοζίτες απαντούν μόνο στα υβρίδια) και σε πολλές ποικιλίες το μόριο της γλυκόζης είναι ακυλιωμένο με οξικό, π-κουμαρικό ή καφεϊκό οξύ (Κουράκου, Σ., 1998, Jackson, R. S., 2008, Ribéreau-Gayon, P. et al., 2006, Bao Do, C., et al., 1995).

1.1.6.1 Δομή και ιδιότητες των ανθοκυανών

Το πυρύλιο του μορίου των ανθοκυανιδινών χαρακτηρίζεται από σταθερότητα λόγω της ύπαρξης των δύο διπλών δεσμών του. Λόγω της παρουσίας του πυρυλίου (ιόν οξωνίου με θετικά φορτισμένο το άτομο του οξυγόνου) οι ανθοκυανιδίνες συμπεριφέρονται ως κατιόντα και συνδυάζονται πάντα με ένα ανιόν. Μεταξύ της ερυθρής μορφής του φλαβυλίου και μιας άχρωμης μορφής ψευδοβάσης, υπάρχει μια ισορροπία που εξαρτάται από το pH (Κοτσερίδης, Γ., 2006, Κουράκου, Σ., 1998, Darias-Marin, J. et al., 2001). Σε οίνους με pH 3,0 το 50% των ανθοκυανών βρίσκονται στην έγχρωμη μορφή και το υπόλοιπο στην άχρωμη (Κουράκου, Σ., 1998). Σε υψηλότερα pH το ποσοστό των έγχρωμων ανθοκυανών μειώνεται (20-25% σε pH 3,4-3,6 και μόνο 12% σε pH 3,8 και 10% σε pH 4,0) (Κουράκου, Σ., 1998, Jackson, R. S., 2008). Σε pH > 4,0 το χρώμα τους μεταβάλλεται από μωβ σε μπλε και σε pH ουδέτερα ή αλκαλικά γίνεται κίτρινο (Κοτσερίδης, Γ., 2006). Εκτός από τις δύο αυτές μορφές, οι ανθοκυάνες βρίσκονται στους οίνους υπό άλλες δύο μορφές, την άνυδρη βάση υπό μορφή κινόνης με χρώμα κυανό και τη χαλκόνη που είναι άχρωμη, ή έχει ελαφρό κίτρινο χρώμα. Και οι τέσσερις μορφές των ανθοκυανών βρίσκονται σε

ισορροπία που εξαρτάται από το pH και τη θερμοκρασία. Με μείωση του pH αυξάνεται το ποσό των ερυθρών φλαβυλίων (Κουράκου, Σ., 1998).

Είναι προφανές λοιπόν πως η μηλογαλακτική ζύμωση έχει επίδραση στο χρώμα των ερυθρών οίνων. Μετά την ολοκλήρωσή της η ένταση ελαττώνεται και η απόχρωση ατονεί. Μια αξιοσημείωτη μείωση του ερυθρού χρώματος επέρχεται από τις αλλαγές των ισορροπιών μεταξύ των μορφών των ανθοκυανών, ως αποτέλεσμα της αύξησης του pH. Εάν η αποικοδόμηση του μηλικού οξέος επιφέρει πολύ μεγάλη αύξηση του pH, τότε το χρώμα του οίνου μπορεί να μετατραπεί από έντονα ερυθρό σε μια απόχρωση του μπλε (Κοτσερίδης, Γ., 2006).

Η παρουσία δύο δραστικών φαινολικών -OH σε ο-θέση στα μόρια των κατεχινών, των προκυανιδινών και ορισμένων ανθοκυανών, τις καθιστούν ευαίσθητα υποστρώματα χημικών και ενζυμικών οξειδώσεων. Η οξείδωση των ελεύθερων ανθοκυανών αποσταθεροποιεί το χρώμα των ροζέ οίνων και των ερυθρών οίνων πρώιμης κατανάλωσης (Κουράκου, Σ., 1998, Heredia, F.J. et al., 1998). Εκτός από τη λακκάση, οι περισσότερες πολυφαινολοξειδάσες επηρεάζουν μόνο τις ο-διφαινόλες. Επειδή ούτε η μαλβιδίνη, ούτε η παιονιδίνη έχουν υδροξυλομάδες σε όρθο θέση, είναι σχετικά ανθεκτικές στην οξείδωση (Jackson, R. S., 2008).

Το χρώμα των ανθοκυανών εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, μεταξύ των οποίων είναι η μοριακή δομή τους, η υποκατάσταση του πλευρικού δακτυλίου, η ένωση με τη γλυκόζη και η ακυλίωσή της. Πράγματι, αφ' ενός η υποκατάσταση του πλευρικού δακτυλίου μετατοπίζει το μέγιστο της απορρόφησης σε μεγαλύτερα μήκη κύματος (φαινόμενο βαθυχρωμίας), αφ' εταίρου η ένωση με τη γλυκόζη και η ακυλίωσή της μετατοπίζουν το μέγιστο της απορρόφησης σε μικρότερα μήκη κύματος (φαινόμενο υψιχρωμίας). Εκτός όμως από τη βαθυχρωμία, όπου το χρώμα πλησιάζει προς το μωβ, έχουμε και το φαινόμενο της υπερχρωμίας, όπου αυξάνεται η ένταση του χρώματος, σε περίπτωση ένωσης των ανθοκυανών με ορισμένα συστατικά του οίνου (Κοτσερίδης, Γ., 2006, Boulton, R.B., 2001).

Σε αναγωγικό περιβάλλον το διάλυμα των ελεύθερων ανθοκυανών αποχρωματίζεται μόνιμα απουσία αέρα, όμως ανάλογα με τις συνθήκες το χρώμα επανέρχεται. Σε αυτή την ιδιότητα οφείλεται το γεγονός ότι ο νέος οίνος

μέσα στη δεξαμενή ερυθρής οινοποίησης, αμέσως μετά την αποζύμωση, έχει ανοιχτότερο χρώμα από αυτό που αποκτάει μετά την πρώτη μετάγγιση.

Όπως είναι γνωστό, η θείωση προκαλεί μερικό αποχρωματισμό στους νέους οίνους, γιατί το ανιόν SO_3H^- συνδέεται με τον ηλεκτρονιόφιλο άνθρακα στη θέση -2 του πυρυλίου με αποτέλεσμα το σχηματισμό άχρωμης ένωσης. Το ποσοστό του αποχρωματισμού εξαρτάται από το pH, τον ελεύθερο SO_2 και τη συγκέντρωση των ελεύθερων ανθοκυανών. Όσο περισσότερες είναι οι ελεύθερες ανθοκυάνες και όσο μεγαλύτερο είναι το pH, τόσο μικρότερος είναι ο αποχρωματισμός, αφού στα υψηλά pH μειώνεται ο αριθμός των μορίων των ανθοκυανών που βρίσκονται στη μορφή του φλαβυλίου (A^+).

Η αντίδραση των ανθοκυανών με το θειώδη ανυδρίτη είναι αμφίδρομη. Όταν με την επίδραση του οξυγόνου η αλκοόλη οξειδώνεται προς ακεταλδεϋδη, που έχει μεγαλύτερη συγγένεια με το θειώδη ανυδρίτη, ο ελεύθερος SO_2 του οίνου μειώνεται λόγω δέσμευσής του από την αλδεϋδομάδα, άρα η ένωση ανθοκυάνη- SO_3H^- ελευθερώνει θειώδη ανυδρίτη προς αποκατάσταση της ισορροπίας. Εκτός αυτού και οι ταννίνες έχουν ιδιαίτερη σημασία, αφού, σαν πυρηνόφιλες ενώσεις αντιτίθενται στην προσθήκη πυρηνόφιλου αντιδραστήριου, όπως είναι το $-\text{SO}_3\text{H}^-$, στο μόριο των ανθοκυανών, ενώ ακόμα αποσταθεροποιούν το μόριο $\text{A-SO}_3\text{H}^-$, όταν έχει σχηματιστεί. Έτσι το χρώμα βαθμιαία επανέρχεται. Πάντως ο αποχρωματισμός με θειώδη ανυδρίτη συμβαίνει μόνο στους νέους οίνους, όπου το μεγαλύτερο μέρος των ανθοκυανών είναι ελεύθερο, ενώ στους παλιούς έχει ήδη επέλθει συμπύκνωση και πολυμερισμός των ανθοκυανών, που με αυτές τις μορφές δεν ενώνονται με θειώδη ανυδρίτη (Κουράκου, Σ., 1998).

1.1.6.2 Σύμπλοκα ανθοκυανών

Η εξαιρετική δραστηριότητα του ετεροκυκλικού δακτυλίου του μορίου των φλαβονοειδών φαινολών ευνοεί το σχηματισμό ενδοφλαβονικών δεσμών. Έτσι τα μόρια των κατεχινών έχουν την τάση να ενώνονται προς σχηματισμό διμερών παραγώγων, οι προκυανιδίνες να πολυμερίζονται προς ταννίνες και οι ανθοκυάνες να ενώνονται με ταννίνες προς πολυμερή ταννινών-ανθοκυανών, που αντίθετα με τις ελεύθερες ανθοκυάνες, έχουν αρκετή σταθερότητα. Αυτός είναι και ο λόγος για τον οποίο οι ταννίνες σταθεροποιούν το χρώμα των

ερυθρών οίνων. Όταν τα πολυμερή είναι μικρού μοριακού βάρους, έχουμε τις συμπυκνωμένες ανθοκυάνες, στις οποίες το μόριο εξακολουθεί να έχει μορφή φλαβυλίου και να είναι έγχρωμο. Αντίθετα, σε πολυμερή υψηλού βαθμού συμπύκνωσης επικρατεί το χρώμα της ταννίνης, οπότε έχουμε τις πολυμερισμένες ανθοκυάνες. Σε αυτές οφείλεται το κεραμιδί χρώμα που αποκτούν οι ερυθροί οίνοι παλαιώνοντας. Το χρώμα των παλαιών οίνων οφείλεται σε ταννίνες, ή σε πολυμερή ταννινών-ανθοκυανών μεγάλης συμπύκνωσης και σχεδόν καθόλου σε ελεύθερες ανθοκυάνες (Κουράκου, Σ., 1998).

Εκτός από τις ταννίνες, οι ανθοκυάνες δημιουργούν έγχρωμα σύμπλοκα και με άλλες ανθοκυάνες, καθώς και με άλλες οργανικές ενώσεις, συνήθως άχρωμες, με συνέπεια το σχηματισμό συσσωματωμάτων που διατηρούνται εξαιτίας δεσμών χαμηλής ενέργειας, δηλαδή υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων και δεσμών υδρογόνου. (Hermosin-Gutierrez, I. et al., 2005, Κοτσερίδης, Γ., 2006). Τέτοιες ενώσεις είναι φλαβονοειδείς και μη φλαβονοειδείς, αμινοξέα (κυρίως προλίνη και αργινίνη), οργανικά οξέα, πολυσακχαρίτες και πουρίνες. Όλα αυτά τα σύμπλοκα αυξάνουν την ένταση και την απόχρωση και σταθεροποιούν το χρώμα των ερυθρών οίνων (Jackson, R. S., 2008).

Το φαινόμενο, σύμφωνα με τους Brouillard και Dangles (1994), μπορεί να περιγραφεί ως η υδρόφοβη ένωση μιας ανθοκυάνης με ένα άχρωμο συστατικό. Δηλαδή πρόκειται για μια διάταξη που προστατεύει το φλαβύλιο από το νερό, παρεμποδίζοντας έτσι το σχηματισμό ημικεταλικών δομών και χαλκονών. Κάθε διαταραχή στο πλέγμα του ύδατος, όπως η αύξηση της θερμοκρασίας, η προσθήκη άλλου διαλύτη (π.χ. αιθανόλη) ή η προσθήκη ενός άλατος, μειώνει την ένταση του φαινομένου. Σε ένα υδραλκοολικό διάλυμα, όπως ο οίνος, δημιουργείται γύρω από την άχρωμη ουσία ένα πρώτο περίβλημα από τα μόρια του οργανικού διαλύτη και αυτό περιβάλλεται από ένα πιο υδατικό περιβάλλον (Gonzalez-Manzano, S. et al., 2009, Castaneda-Ovado, A. et al., 2009, Κοτσερίδης, Γ., 2006, Tsanova-Savona, S. et al., 2002).

Η διατήρηση των ανθοκυανών σε συμπλοκοποιημένη κατάσταση εμποδίζει την ενυδάτωση του φλαβυλίου και της βάσης κινόνης, που οδηγεί σε σχηματισμό άχρωμων ενώσεων. Και οι δύο αυτές έγχρωμες καταστάσεις των ανθοκυανών διευκολύνουν την αλληλεπίδραση μεταξύ τους, με άλλα μόρια

ανθοκυανών, αλλά και με τα σύμπλοκα των ανθοκυανών με οργανικές ενώσεις, καθιστώντας τις πιο πιθανές. Σε χαμηλές τιμές του pH η συμπλοκοποίηση με οργανικές ενώσεις γίνεται κυρίως με ανθοκυάνες που βρίσκονται στη μορφή φλαβυλίου, με αποτέλεσμα τη μετατόπιση της ισορροπίας των ελεύθερων ανθοκυανών προς την κατεύθυνση της κατάστασης του φλαβυλίου. Έτσι έχουμε ενίσχυση του χρωματισμού και η απόχρωση τείνει προς το μωβ. Η συμπλοκοποίηση αυτή συνεισφέρει στο χρωματισμό των νέων οίνων κατά 30-50%.

Τα σύμπλοκα μεταξύ ανθοκυανών διατηρούνται από υδρόφιλες έλξεις μεταξύ των μορίων γλυκόζης και από υδρόφοβες απώσεις από το νερό. Στην περίπτωση των δυνατότερων και πιο σταθερών συμπλόκων των ανθοκυανών με άλλες ενώσεις, οι σχηματίζονται ομοιοπολικοί δεσμοί μεταξύ των ακυλομάδων των ανθοκυανών και των ενώσεων αυτών. Όπως ήδη αναφέρθηκε, οι ανθοκυάνες συμπλοκοποιούνται με πολλές διαφορετικές ενώσεις, στις οποίες όμως κυριαρχούν η επικατεχίνη, οι προκυανιδίνες, τα κινναμωμικά οξέα και οι υδροξυκινναμωμικοί εστέρες. Η διακύμανση της σχετικής αναλογίας μεταξύ αυτών των ενώσεων είναι έντονη μεταξύ των διάφορων οίνων της ίδιας ποικιλίας, που παράχθηκαν σε διαφορετικές περιοχές, κάτι το οποίο εξηγεί τις χρωματικές διαφορές μεταξύ των οίνων αυτών.

Οι παράγοντες που οδηγούν στη διάσπαση των συμπλόκων των ανθοκυανών είναι πολλοί. Η θέρμανση των σταφυλιών ή του οίνου που πραγματοποιείται κατά τη θερμοσινοποίηση, για να αυξηθεί η εκχύλιση του χρώματος, αποσταθεροποιεί τα σύμπλοκα μεταξύ ανθοκυανών. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε μεγάλη απώλεια χρώματος κατά την ωρίμανση του οίνου, σε περίπτωση που το ποσό των ταννινών δεν είναι επαρκές. Οι ταννίνες βέβαια ευνοούν τον σχηματισμό έγχρωμων συμπλόκων με τις ανθοκυάνες. Η αλκοόλη επίσης αποσταθεροποιεί τους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των συμπλόκων των ανθοκυανών, εμποδίζοντας την αλληλεπίδραση των μορίων του νερού (Jackson, R. S., 2008). Επειδή η αλκοόλη αντιτίθεται στην ένωση των ανθοκυανών με μη έγχρωμες φαινόλες, το χρώμα που οφείλεται σε αυτές τις ενώσεις χάνεται σε μερικούς μήνες και παραμένουν μόνο οι μονογλυκοζίτες των πέντε ανθοκυανών (Κοτσερίδης, Γ., 2006). Συνεπώς όταν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης το γλεύκος βρίσκεται σε επαφή με τα στέμφυλα για μικρό χρονικό διάστημα, είναι

αναμενόμενη μια έντονη μείωση του χρώματος, όσο η ζύμωση συνεχίζεται, παρά το γεγονός ότι η ποσότητα των ανθοκυανών παραμένει σταθερή. Η μείωση του χρώματος εξαρτάται από την ποσότητα των φαινολικών ουσιών, το pH και την περιεκτικότητα σε αλκοόλη, και αποδίδεται στη μείωση της απορρόφησης, καθώς τα σύμπλοκα των ανθοκυανών διασπώνται. Μέσα στα σύμπλοκα περιέχονται ανθοκυάνες που βρίσκονται στην κατάσταση της βάσης κινόνης, οι οποίες αποχρωματίζονται καθώς περνάνε στο όξινο περιβάλλον του οίνου.

Αν και μειώνεται, η συμπλοκοποίηση των ανθοκυανών μεταξύ τους ενδέχεται να είναι η αιτία των μωβ αποχρώσεων που χαρακτηρίζουν κάποιους νέους οίνους. Η διατήρηση του οίνου σε χαμηλές θερμοκρασίες, διευκολύνει τη δημιουργία συμπλόκων μεταξύ ανθοκυανών και άλλων ενώσεων και επιβραδύνει τη διάσπασή τους. Εξαιτίας του γεγονότος ότι η συνένωση των μορίων βρίσκεται σε δυναμική ισορροπία με τις ελεύθερες ανθοκυάνες, ερυθροί οίνοι με ασθενές χρώμα και μικρό περιεχόμενο σε φαινολικές ουσίες, παρουσιάζουν περισσότερη διάσπαση συμπλόκων και μεγαλύτερη απώλεια χρώματος, από αυτή που θα ήταν αναμενόμενη δεδομένης της περιεκτικότητάς τους σε ανθοκυάνες. Επιπλέον τα μόρια των ανθοκυανών έχουν την τάση να υδρολύονται σε ανθοκυανιδίνες, χάνοντας την ακυλομάδα τους και τα γλυκοζιδικά τους συστατικά. Οι διασπασμένες ανθοκυάνες είναι περισσότερο ευαίσθητες στην μη αντιστρέψιμη απώλεια χρώματος, αλλά και στην επίσης μη αντιστρέψιμη μετατροπή των έγχρωμων φλαβυλίων σε άχρωμες ημιακετάλες (Jackson, R. S., 2008).

Τέλος αναφέρεται πως οι ανθοκυάνες που έχουν δύο -OH σε όρθο θέση του πλευρικού δακτυλίου, δηλαδή η δελφινιδίνη, η πετουνιδίνη και η κυανιδίνη, σχηματίζουν σε όξινο περιβάλλον σύμπλοκα με μέταλλα και κυρίως με αργίλιο, σίδηρο, χαλκό και μαγνήσιο. Αυτό έχει σαν συνέπεια την εμφάνιση του φαινομένου της βαθυχρωμίας. Υπάρχουν δύο τύποι χηλικών ενώσεων, είτε με τη μορφή του φλαβυλίου (A+), είτε με τη βάση κινόνης (AO), οι οποίοι σταθεροποιούν τα μόρια και προλαμβάνουν το σχηματισμό της άχρωμης βάσης της καρβινόλης (AOH). Έτσι, το χρώμα γίνεται έντονα κυανό και διατηρείται, ακόμα και σε τιμές pH που κυμαίνονται γύρω στο 4. Η ιδιότητα αυτή χρησιμοποιείται για την αλλαγή του χρώματος ορισμένων λουλουδιών. Οι δεσμοί αυτού σπάνε σε ισχυρά όξινο περιβάλλον (Ribéreau-Gayon, P. et al.,

2006). Στη δημιουργία του αδιάλυτου συμπλόκου των ανθοκυανών, αλλά και των ταννινών με τον τρισθενή σίδηρο οφείλεται το λεγόμενο «μπλε θόλωμα σιδήρου» (Κουράκου, Σ., 1998).

1.1.7 Η θέση των φαινολικών συστατικών στο σταφύλι

Οι ανθοκυάνες βρίσκονται κυρίως στους φλοιούς. Στις μαύρες ποικιλίες όμως, υπάρχουν ανθοκυάνες και στη σάρκα, με αποτέλεσμα τα σταφύλια να είναι πολύ πλούσια σε χρώμα. Επίσης ανθοκυάνες απαντώνται και στα φύλλα, κυρίως στο τέλος της περιόδου ανάπτυξης, αν και στην περίπτωση αυτή η κατανομή είναι διαφορετική, αφού κυριαρχεί η κυανιδίνη. Στην πλειοψηφία των λευκών σταφυλιών δεν υπάρχουν καθόλου ανθοκυάνες, ενώ σε λίγες περιπτώσεις υπάρχουν απλώς ίχνη. Οίνοι που παράγονται αποκλειστικά από λευκές ποικιλίες και ονομάζονται "blanc de blancs" δεν πρέπει να περιέχουν καθόλου ανθοκυάνες.

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.

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 (Ribèreau-Gayon, P. et al., 2006, Shi, J. et al., 2003).

1.1.8 Εξέλιξη ανθοκυανών και ταννινών κατά την ωρίμανση των σταφυλιών

Από την αλλαγή του χρώματος μέχρι την πλήρη ωριμότητα, όπως ορίζεται από την αναλογία σακχάρων/ολικής οξύτητας, τα φαινολικά συστατικά που περιέχονται στο φλοιό αυξάνονται. Οι ανθοκυάνες εμφανίζονται καθώς το χρώμα αλλάζει και συγκεντρώνονται κατά την πορεία ωρίμανσης, φθάνοντας στο μέγιστο στην πλήρη ωριμότητα. Τότε μειώνονται, σε περίπτωση που τα σταφύλια αφεθούν να υπερωριμάσουν. Η συγκέντρωση των ταννινών αυξάνεται με παρόμοιο τρόπο, αν και είναι ήδη πολύ υψηλή κατά την αλλαγή του χρώματος (Ribèreau-Gayon, P. et al., 2006, Perez-Magarino, S. et al., 2006, Hirarsuka, S. et al., 2001, Jeong, S.T. et al., 2004, Wen, P. F. et al., 2005)

Αν και αυτός ο τρόπος εξέλιξης πραγματοποιείται σε όλες τις ποικιλίες αλλά και στις περισσότερες καλλιεργητικές συνθήκες, η συσσώρευση των ανθοκυανών και οι μέγιστες τιμές ποικίλουν πολύ ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες και το κλίμα. Πράγματι, ανάλογα με το περιβάλλον, η μέγιστη τιμή μπορεί να συμπίπτει με τη μέγιστη τιμή του πηλίκου σακχάρου/ολικής οξύτητας, αλλά μπορεί να συμβεί νωρίτερα, αργότερα, ή καθόλου. Επιπλέον, η ολική ποσότητα των ανθοκυανών μπορεί να ποικίλει για ένα συγκεκριμένο αμπέλι, από τρύγο σε τρύγο, ανάλογα με τις καιρικές συνθήκες (Kennedy, J.A. et al., 2002, Kolb, C.A. et al., 2003, Ribèreau-Gayon, P. et al., 2006, Cliff, M.A., et al., 2007, Dreier, L.P. et al., 1998). Σύμφωνα με μελέτη που πραγματοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της επίδρασης του νερού στα φαινολικά και τα αρωματικά συστατικά της ποικιλίας Αγιωργίτικο, το σχετικό έλλειμμα νερού προκαλεί ανάλογη αύξηση της περιεκτικότητας των ραγών σε

ανθοκυάνες, αλλά και αύξηση των ολικών φαινολών, κατά την ωρίμανση (Koundouras, S. et al., 2006).

Στο εκχύλισμα των γιγάρτων, η συγκέντρωση των ταννινών συνήθως μειώνεται μετά την αλλαγή του χρώματος, καθώς τα σταφύλια ωριμάζουν. Η μείωση μπορεί να έχει μεγαλύτερη ή μικρότερη έκταση, ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν κατά την ωρίμανση και προφανώς εξαρτάται από τη συσσώρευση των ανθοκυανών στους φλοιούς. Πάντως, σε ορισμένες περιπτώσεις, η μείωση πραγματοποιείται σε πρωιμότερο στάδιο, πριν την αλλαγή του χρώματος, και τότε η συγκέντρωση παραμένει σχετικά σταθερή καθόλη τη διάρκεια ωρίμανσης (Ribéreau-Gayon, P. et al., 2006, Kennedy, J.A. et al., 2000b).

Η μείωση των ταννινών των γιγάρτων επίσης διαφοροποιείται μεταξύ των ποικιλιών. Κάποιες ποικιλίες παρουσιάζουν χαμηλή συγκέντρωση (Cabernet Sauvignon), ενώ άλλες έχουν πολύ υψηλότερα επίπεδα (Pinot noir). Οι συγκεντρώσεις των ταννινών των βοστρύχων είναι πολύ υψηλές κατά την αλλαγή του χρώματος και διαφοροποιούνται ελαφρά κατά την ωρίμανση. Τα ίδια ισχύουν και για τις λευκές ποικιλίες σταφυλιών, οι ταννίνες συσσωρεύονται στους φλοιούς, ενώ οι συγκεντρώσεις των γιγάρτων μειώνονται κανονικά (Andrade, P.B. et al., 2001, Ribéreau-Gayon, P. et al., 2006, Guendez, R. et al., 2005).

Η μελέτη της εξέλιξης των διμερών και τριμερών προκυανιδινών, όπως και των απλών φλαβονολών που εκχυλίζονται από τους φλοιούς και τα γίγαρτα λευκών και ερυθρών σταφυλιών, δείχνει πως οι συγκεντρώσεις μειώνονται σε μεγαλύτερο ή μικρότερο βαθμό, αλλά ποτέ δεν αυξάνονται. Έχει παρατηρηθεί ότι η προκυανιδίνη B2 είναι το πιο συνηθισμένο διμερές σε ώριμα σταφύλια των ποικιλιών Merlot και Cabernet Sauvignon, ενώ ακολουθείται από το τριμερές C1. Όλα τα διμερή είναι παρόντα στο εκχύλισμα των γιγάρτων, ενώ οι προκυανιδίνες B4, B7 και B8 απουσιάζουν από τους φλοιούς. Τα γίγαρτα των ερυθρών και λευκών ποικιλιών έχουν παρόμοια κατανομή προκυανιδινών. Τα διμερή B2 αποτελούν την πλειοψηφία στους ερυθρούς φλοιούς, αλλά πρακτικά απουσιάζουν από τις λευκές ποικιλίες, όπου έχουν αντικατασταθεί από διμερή B1. Από τα αποτελέσματα των ερευνών προκύπτει πως οι διμερείς και τριμερείς προκυανιδίνες, που απαντώνται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, δεν είναι από

τα σημαντικότερα φαινολικά συστατικά των σταφυλίων (Ribereau-Gayon, P. et al., 2006).

1.1.9 Φαινολική ωριμότητα

Τα σταφύλια φτάνουν στην οινολογική ωριμότητα όταν μεγάλος αριθμός παραγόντων βρίσκεται σε ισορροπία, καθιστώντας έτσι εφικτή την παραγωγή οίνου υψηλής ποιότητας. Η τεχνολογική ωριμότητα (αναλογία σακχάρων/οξέων), η αρωματική (μέγιστο αρωματικό δυναμικό) και η φαινολική ωριμότητα είναι ανεξάρτητες μεταβλητές, οι οποίες πρέπει να λαμβάνονται υπόψη στο σύνολό τους στην εκτίμηση της οινολογικής ωριμότητας και είναι κρίσιμες στον καθορισμό του τρύγου. Η φαινολική ωριμότητα δεν αφορά μόνο την ολική συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων, αλλά και τη δομή τους και την ικανότητά τους να εκχυλίζονται από τα σταφύλια κατά την οينوποίηση.

Η ανάλυση των ανθοκυανών και των ταννινών των σταφυλίων κατά την περίοδο ωρίμανσης χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της εξέλιξής τους και για την ταξινόμηση των αμπελώνων, αλλά και των διάφορων αμπελοτεμαχίων, ανάλογα με το περιεχόμενό τους σε φαινολικά συστατικά. Θεωρητικά, υπό παρεμφερείς οينوποιητικές συνθήκες, σταφύλια με υψηλότερο περιεχόμενο σε ανθοκυάνες είναι αναμενόμενο να δώσουν οίνους με περισσότερο χρώμα, όμως αυτό δε συμβαίνει πάντα. Τα σταφύλια, συνεπώς, έχουν διαφορετική ικανότητα εκχύλισης, ή αλλιώς εκχυλισματικότητα, ανάλογα με την ωριμότητα και την ποικιλία (Ribereau-Gayon, P. et al., 2006, Gonzalez-Neves, G. et al., 2004).

Η έννοια της εκχυλισματικότητας των ανθοκυανών εξαρτάται από την κατάσταση ωριμότητας που ελέγχει την διάρρηξη των κυττάρων των φλοιών. Όταν όλες οι υπόλοιπες συνθήκες παραμένουν οι ίδιες, όταν τα σταφύλια είναι απόλυτα ώριμα ή ελαφρά υπερώριμα, το περιεχόμενο σε ανθοκυάνες στον οίνο είναι υψηλότερο σε σχέση με το αντίστοιχο οίνου που θα προέκυπτε από μη ώριμα σταφύλια, αν και οι χρωστικές αυτές έχουν την τάση να μειώνονται. Και το χρώμα, αλλά και η ολικές φαινόλες βρίσκονται τότε στη μέγιστη συγκέντρωσή τους. Στο αμπέλι, είναι εφικτό να αποκτήσουμε μια γενική ιδέα για την ευκολία με την οποία θα συμβεί η διάρρηξη των κυττάρων της

επιδερμίδας πιέζοντας τη ράγα μεταξύ του δείκτη και του αντίχειρα και εκτιμώντας το χρώμα.

Αν και η υψηλή συγκέντρωση ανθοκυανών για την παραγωγή βαθύχρωμου οίνου είναι απαραίτητη, δεν αποτελεί και τη μοναδική προϋπόθεση. Τα κύτταρα θα πρέπει επίσης να είναι αρκετά εύθρυπτα για να διευκολυνθεί η εκχύλιση των ανθοκυανών, χωρίς την απαίτηση επιθετικής τεχνολογίας. Στην κατάσταση της φαινολικής ωριμότητας τα σταφύλια έχουν και υψηλό δυναμικό χρωστικών και επαρκή ικανότητα για την απελευθέρωση των ουσιών αυτών στον οίνο (Ribéreau- Gayon, P. et al., 2006, Ortega-Regules, A. et al., 2006, Fang, F. et al., 2008).

1.2 Εκχύλιση

1.2.1 Η σημασία της εκχύλισης

Οι ερυθροί οίνοι είναι οίνοι εκχύλισης. Η εκχύλιση είναι υπεύθυνη για τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά τους (χρώμα, άρωμα, γεύση), τα οποία τους διαφοροποιούν από τους λευκούς οίνους. Εμπλουτίζονται σε φαινολικά συστατικά (ανθοκυάνες και ταννίνες), τα οποία συμμετέχουν στο χρώμα και στη γενικότερη δομή των ερυθρών οίνων, 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 οίνου, η επαφή του γλεύκους με τα σταφύλια μπορεί να είναι μικρότερης ή μεγαλύτερης χρονικής διάρκειας. Έτσι, οι πρώιμοι οίνοι που καταναλώνονται νέοι, πρέπει να διαθέτουν φρουτώδες άρωμα, χαρακτήρας που είναι αντίστροφα ανάλογος με την περιεκτικότητά τους σε φαινολικά συστατικά. Αντίθετα, οι οίνοι παλαίωσης πρέπει να είναι πλούσιοι σε ταννίνες.

Η συμμετοχή λοιπόν των φλοιών στην ερυθρά οινοποίηση προσδίδει ένα σημαντικό ρόλο στην 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 στους ερυθρούς οίνους σε σχέση με τους λευκούς, όσον αφορά τις σταφυλοχρονιές 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 ένας εύπλαστο, αλλά ατελή οίνο. 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 οίνων 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 (Κοτσερίδης, Γ., 2005).

1.2.2 Παράγοντες εκχύλισης των ανθοκυανών και των ολικών φαινολών

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. Άλλοι παράγοντες τείνουν να αυξήσουν τη συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών και άλλοι να τη μειώσουν. Η ποσότητα των ανθοκυανών και των ταννινών που βρίσκονται στον οίνο εξαρτάται πρώτα από όλα από την ποσότητά τους στα σταφύλια και είναι φυσικό ότι τα ώριμα σταφύλια είναι πρωταρχική υπόθεση για την παραγωγή ενός οίνου πλούσιου και έντονα χρωματισμένου. Στον παραγόμενο οίνο δεν βρίσκεται παρά ένα μικρό ποσοστό (<50%) των φαινολικών συστατικών του σταφυλιού. Η εκχύλιση των φαινολικών συστατικών επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες (Κοτσερίδης, Γ., 2005).

Οι ανθοκυάνες εκτός από το ότι καθορίζουν το χρώμα των οίνων, αποτελούν πολύ καλό χημικό δείκτη για τον χαρακτηρισμό του σταφυλιού και του οίνου, γιατί μας πληροφορούν για την περιεκτικότητα σε φλαβονοειδείς φαινόλες. Έτσι, τα σταφύλια μιας ποικιλίας πλούσιας σε χρώμα, συνήθως δίνουν

οίνους πλούσιους σε σώμα.

Κατά την αλκοολική ζύμωση παρουσία των στερεών μερών του σταφυλίου, 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 σε πολλά συστατικά των φλοιών και των γιγάρτων, μεταξύ των οποίων είναι οι ανθοκυάνες και τα υπόλοιπα φαινολικά παράγωγα.

Η εκχύλιση των συστατικών των στερεών μερών του σταφυλίου επηρεάζεται, εκτός από την εκχυλισματικότητα, από τις συνθήκες που επικρατούν κατά τη διεξαγωγή του και ειδικότερα από τους εξής παράγοντες: διάρκεια παραμονής του ζυμούμενου γλεύκους με τα στέμφυλα, ρυθμός διαβροχής των στεμφύλων από το γλέυκος, θερμοκρασία, παραγόμενη αιθανόλη, θειώδης ανυδρίτης, και άλλοι (Κουράκου, Σ., 1998).

1.2.2.1 Διάρκεια παραμονής του γλεύκους με τα στέμφυλα

Η διάχυση των φαινολικών συστατικών στο ζυμούμενο γλέυκος εξαρτάται από το χρόνο επαφής στεμφύλων-ζυμούμενου γλεύκους, χωρίς όμως να υπάρχει αναλογία μεταξύ του χρόνου επαφής και της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών. Είναι γνωστό πως η ένταση 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.

Η διαφορά εκχύλισης των ανθοκυανών και των ολικών φαινολών οφείλεται στο γεγονός ότι οι ανθοκυάνες, που 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 γλέυκος, αμέσως μόλις υποστούν πλασμόλυση τα κύτταρα. Αφού η εκχύλισή τους δεν απαιτεί την παρουσία αλκοόλης, παραλαμβάνονται πρώτες.

Αντίθετα, οι ταννοειδείς ουσίες, που αποτελούν το σημαντικότερο μέρος των ολικών φαινολών των ερυθρών οίνων, βρίσκονται κυρίως στα γίγαρτα και λιγότερο στους φλοιούς και στους βοστρύχους και η εκχύλισή τους διευκολύνεται από την παραγόμενη αλκοόλη. Έτσι, ενώ οι ταννοειδείς ουσίες

των φλοιών παραλαμβάνονται σχετικά γρήγορα, αυτές των γιγάρτων διαχέονται με μικρότερο ρυθμό, ανάλογα με το στάδιο ωριμότητας των γιγάρτων, οπότε για την παραλαβή τους απαιτείται παρατεταμένο μούλιασμα.

Αρχικά παρατηρείται αύξηση των ταννινών και των ανθοκυανών, στη συνέχεια όμως η μείωση των ταννινών είναι πολύ μικρότερη αυτής των ανθοκυανών, με αποτέλεσμα η αύξηση του συνόλου των φαινολικών συστατικών να είναι πάντα θετική.

Κατά την όγδοη μέρα του μουλιάσματος, η ένταση του χρώματος βρίσκεται στο μέγιστο και οι ταννίνες είναι σχετικά λίγες, επιτρέποντας στις φρουτώδεις γεύσεις να αναδειχθούν. Έτσι, η χρονική διάρκεια του μουλιάσματος σχετίζεται με τον τύπο του οίνου. Συγκεκριμένα, στους οίνους πρώιμης κατανάλωσης, το χρώμα των οποίων οφείλεται κυρίως στις ανθοκυάνες, το μούλιασμα είναι μικρής διάρκειας. Αντίθετα, στους οίνους παλαίωσης, όπου οι ταννίνες παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση του χρώματος, το μούλιασμα είναι μακράς διάρκειας.

Ένας άλλος παράγοντας που πρέπει να ληφθεί υπόψη είναι η ευαισθησία των ελεύθερων ανθοκυανών στις οξειδώσεις, εξαιτίας της οποίας οι οίνοι που δεν έχουν ικανή ποσότητα ταννινών για να σχηματιστούν σταθερά πολυμερή ανθοκυανών-ταννινών, χάνουν απότομα το ερυθρό χρώμα τους που αρχίζει να καφετιάζει. Οι οίνοι αυτοί δεν είναι κατάλληλοι για παλαίωση, γιατί γερνάνε πριν να ωριμάσουν. Αντίθετα, ποικιλίες που είναι πλούσιες σε ανθοκυάνες και ταννίνες παρουσιάζουν χαμηλή απόχρωση, που σε νέους οίνους υποδηλώνει τον βαθμό οξείδωσης των ανθοκυανών. Αυτό σημαίνει πως έχουν επάρκεια ταννινών από τις πρώτες μέρες της οινοποίησης, άρα δεν απαιτείται μεγάλος χρόνος παραμονής των στεμφύλων με το ζυμούμενο γλεύκος.

Η διάρκεια παραμονής του γλεύκους με τα στέμφυλα επηρεάζει τη γευστική ισορροπία των οίνων, γιατί καθώς αυξάνεται, ενισχύεται το σώμα των οίνων, αλλά και η ένταση του αρώματός του, αφού οι ταννοειδείς ουσίες ενισχύουν το άρωμα, αλλά καλύπτουν τη φρουτώδη γεύση του (Ribéreau-Gayon, P. et al., 2006, Κοτσερίδης, Γ., 2005, Κουράκου, Σ., 1998, Netzel, M. et al., 2003, Kelebek, H. et al., 2006).

1.2.2.2 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 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 από το χυμό και τη δημιουργία άλλων προβλημάτων στη διεξαγωγή της οينوποίησης. Για το λόγο αυτό είναι απαραίτητη η διαβροχή των στεμφύλων με το γλεύκος (ανακύκλωση) με τον κατάλληλο ρυθμό, ώστε να εξασφαλιστεί η ομαλότητα της εκχύλισης των συστατικών των φλοιών και η ομογενοποίηση του γλεύκους (Κουράκου, Σ., 1998).

Αυξάνοντας τον αριθμό των ανακυκλώσεων αυξάνεται και η εκχύλιση των φαινολικών συστατικών (αύξηση της έντασης του χρώματος και του δείκτη φαινολικών συστατικών). Οι πρώτες ανακυκλώσεις ευνοούν την εκχύλιση των ταννινών των φλοιών (οينوποίηση για παραγωγή πρώιμων οίνων), ενώ προς το τέλος της ζύμωσης ευνοούν την εκχύλιση των ταννινών των γιγάρτων (οينوποίηση για παραγωγή οίνων παλαιώσης).

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 οίνου (Κοτσερίδης, Γ., 2005).

1.2.2.3 Θερμοκρασία

Μεγάλη σημασία για την εκχύλιση έχει και η θερμοκρασία της οينوποίησης. Η θερμότητα νεκρώνει τα κύτταρα των φλοιών και κάνει πιο έντονη τη διάλυση των συστατικών τους στο γλεύκος, επιταχύνοντας έτσι την εκχύλιση κατά το μούλιασμα. Η θέρμανση της σταφυλομάζας χρησιμοποιείται για την παραλαβή των χρωστικών των φλοιών κατά τη θερμοοينوποίηση.

Η θερμοκρασία του σταφυλοπολτού λοιπόν είναι ένας σημαντικός παράγοντας στην ερυθρά οينوποίηση. Πρέπει να είναι αρκετά υψηλή για να έχουμε ικανοποιητική εκχύλιση του συνόλου των φαινολικών συστατικών των φλοιών και των ραγών. Όπως προκύπτει από στοιχεία έρευνας, όταν η ερυθρή οينوποίηση διεξάγεται σε θερμοκρασία 30-35°C, ο οίνος που παράγεται έχει

σημαντικά περισσότερες ολικές φαινόλες και ανθοκυάνες και πολύ μεγαλύτερη ένταση χρώματος από τον οίνο που παράγεται από τον ίδιο σταφυλοπολτό, αλλά σε θερμοκρασία 20-25 °C (Κοτσερίδης, Γ., 2005). Επιπλέον, η υψηλή θερμοκρασία μουλιάσματος έχει σαν συνέπεια τη διευκόλυνση της απελευθέρωσης των μαννοπρωτεϊνών των ζυμών. Οι ενώσεις αυτές συμβάλλουν στην παραγωγή μαλακών οίνων που χαρακτηρίζονται από στρογγυλότητα (Ribèreau-Gayon, P. 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 να μειώνεται η αρωματική ένταση. Τέτοιες τιμές θερμοκρασίας για την ερυθρή οινοποίηση κυμαίνονται από 25 °C έως 35 °C (Κοτσερίδης, Γ., 2005).

Σύμφωνα με έρευνες, η επίδραση της θερμοκρασίας, ως προς την εκχύλιση των φαινολικών συστατικών είναι πολύ μεγαλύτερη κατά τις πρώτες τρεις με τέσσερις ημέρες της οινοποίησης, από ότι στη συνέχεια (Gil-Munoz, R. et al., 1999).

Για τους οίνους πρώιμης κατανάλωσης που χαρακτηρίζονται από έντονο ερυθρό χρώμα και φρουτώδη χαρακτήρα, συνιστάται μέτρια θερμοκρασία ζύμωσης (25 °C), ενώ αντίθετα για τους οίνους παλαίωσης, που το χαρακτηριστικό τους είναι η πλούσια ταννική δομή, μια θερμοκρασία ζύμωσης 30 °C είναι απαραίτητη. Πιθανόν ακόμα υψηλότερες θερμοκρασίες να ευνοούσαν την πληρέστερη εκχύλιση των φαινολικών συστατικών, αλλά υπάρχει κίνδυνος να δημιουργήσουν προβλήματα στη δραστηριότητα των ζυμών (Κοτσερίδης, Γ., 2005).

1.2.2.4 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 εντατικής παραγωγής αιθανόλης κατά τη ζύμωση και στη συνέχεια παρουσιάζει μια ελάττωση, λιγότερο ή περισσότερο απότομη (Κουράκου, Σ., 1998). 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 προσρόφηση των ανθοκυανών από τους φλοιούς των ραγών και τα κύτταρα των ζυμών, αλλά και την καταστροφή των έγχρωμων ενώσεων ταννινών- ανθοκυανών από τη σχηματιζόμενη αλκοόλη.

Έτσι, στην αρχή, η ένταση του χρώματος φτάνει σε ένα μέγιστο, αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να αυξηθεί ξανά σε επόμενο στάδιο. Αρχικά πραγματοποιείται μια συνένωση των ανθοκυανών σε κάποιο βαθμό, ακολουθεί η διάσπαση των ενώσεων που προκαλείται από την αιθανόλη και στη συνέχεια η ένταση αυξάνεται πάλι λόγω του σχηματισμού συμπλόκων ανθοκυανών- ταννινών (Ribèreau-Gayon, P. et al., 2006).

Οι ολικές φαινόλες στην αρχή διαχέονται όπως οι ανθοκυάνες, αλλά και στη συνέχεια εξακολουθούν να διαχέονται, σε όλη τη διάρκεια παραμονής των στεμφύλων (Κουράκου, Σ., 1998). Τέλος, και οι πολυσακχαρίτες εκχυλίζονται από τα σταφύλια κυρίως στην αρχή της αλκοολικής ζύμωσης, αλλά αρχίζουν να καθιζάνουν παρουσία αιθανόλης. Οι μαννοπρωτεΐνες των ζυμών μπορεί να βρίσκονται σε διαλυτή μορφή κατά τη διάρκεια της μεταζυμωτικής εκχύλισης (Ribèreau-Gayon, P. et al., 2006).

1.2.2.5 Θειώδης ανυδρίτης

Ο θειώδης ανυδρίτης διευκολύνει την εκχύλιση των διάφορων φαινολικών παραγώγων των στερεών συστατικών της σταφυλομάζας από το ζυμούμενο γλεύκος, με συνέπεια την παραγωγή οίνων με πιο έντονο χρώμα και μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ολικές φαινόλες.

Στην ερυθρά οινοποίηση είναι γεγονός πως η θείωση του σταφυλοπολτού ευνοεί τη διάχυση των ανόργανων συστατικών, των οργανικών οξέων και κυρίως των φαινολικών συστατικών των φλοιών. Η διαλυτική δράση του SO₂ οφείλεται στην καταστροφή των κυττάρων των φλοιών, οι οποίοι εκχωρούν έτσι πιο εύκολα τα συστατικά τους.

Στην περίπτωση των σάπιων σταφυλιών το SO₂ δρα βελτιώνοντας των εκχύλιση των χρωστικών, αλλά και παρεμποδίζοντας την καταστροφή τους από τη λακκάση του *Botrytis cinerea*.

Ακόμα και χωρίς την εκδήλωση της αλκοολικής ζύμωσης, η απλή

παραμονή θειωμένης σταφυλομάζας σε θερμοκρασία περιβάλλοντος οδηγεί σε σημαντική πρόσληψη ανθοκυανών, χωρίς την αύξηση ολικών φαινολών, σε περιπτώσεις σταφυλιών πλούσιων σε χρώμα, όπως οι ποικιλίες Αγιωργίτικο, Μανδηλαριά, Βάφτρα κ. α.. Αυτό συμβαίνει διότι οι ανθοκυάνες, αντίθετα με τις ταννίνες, είναι διαλυτές σε υδατικά διαλύματα, όπως είναι το γλεύκος (Κοτσερίδης, Γ., 2005, Κουράκου, Σ., 1998, Gomez-Plaza, E. et al., 2002).

1.2.2.6 Λοιποί παράγοντες

Ακόμα και στην περίπτωση που η οينوποίηση διεξαχθεί υπό τις ίδιες ακριβώς συνθήκες, το ποσό των ανθοκυανών που διαχέονται στο γλεύκος δεν είναι το ίδιο. Όπως ήδη αναφέρθηκε, 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 οίνου σε ανθοκυάνες προς την αντίστοιχη των ραγών, επί 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 τα σταφύλια είναι φτωχότερο σε ανθοκυάνες.

Ιδιαίτερη σημασία επίσης έχει και η κατάσταση των ίδιων των ανθοκυανών. Οι ελεύθερες ανθοκυάνες εκχυλίζονται πιο γρήγορα όταν δεν είναι αλκυλιωμένες, ενώ οι συμπυκνωμένες εκχυλίζονται πολύ αργά ή και καθόλου, για αυτό ο υψηλός βαθμός συμπύκνωσής τους στα σταφύλια εκτιμάται ως αρνητικός παράγοντας κατά τις ερυθρές οينوποιήσεις. Το χρώμα του νέου οίνου μέσα στη δεξαμενή ερυθρής οينوποίησης είναι, αμέσως μετά την αποζύμωση των σακχάρων, ανοιχτότερο σε σχέση με αυτό που διαμορφώνεται μετά τις πρώτες μεταγγίσεις, εξαιτίας του ότι στο έντονα αναγωγικό περιβάλλον της ζύμωσης το φλαβύλιο των ανθοκυανιδινών ανάγεται προς άχρωμα παράγωγα. Η αντίδραση αυτή είναι αμφίδρομη και το χρώμα γίνεται πιο έντονο με συχνές μεταγγίσεις για τον αερισμό του οίνου.

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 οίνου και η περιεκτικότητά του σε ανθοκυάνες και ολικές φαινόλες είναι αντιστρόφως ανάλογος με την απόδοση των σταφυλιών σε χυμό (Κουράκου, Σ., 1998).

1.2.3 Προσαρμογή της οινοποίησης για βελτίωση της εκχύλισης των φαινολικών συστατικών

Υπάρχουν διάφορες τεχνικές που μπορούν να εφαρμοστούν κατά την οινοποίηση για να βελτιωθεί η εκχύλιση χρωστικών από το σταφύλι, οι οποίες μπορεί να έχουν θετική ή αρνητική επίδραση, ανάλογα με την ωριμότητα του σταφυλιού και την ποιότητά του. Εάν τα σταφύλια είναι πολύ καλής ωριμότητας, όσον αφορά το πηλίκο σάκχαρο/οξέα και έχουν και την απαιτούμενη φαινολική ωριμότητα, η διαδικασία της εκχύλισης των φαινολικών συστατικών είναι εύκολο να πραγματοποιηθεί. Αντίθετα, αν οι συνθήκες δεν είναι οι ιδανικές, είναι πιθανό να προκύψουν κάποια προβλήματα, τα οποία θα πρέπει να αντιμετωπιστούν. Πολλές είναι οι τεχνικές που διατίθενται για το σκοπό αυτό: η τροποποίηση του χρόνου εκχύλισης, η μείωση του όγκου του χυμού που αποστραγγίζει, η θείωση ή η οξυγόνωση, η επεξεργασία με ένζυμα εκχύλισης χρώματος, η επιλογή ζυμών, ο έλεγχος της θερμοκρασίας, το σπάσιμο των σταφυλιών, η διαβροχή του καπέλου και η ανάδευση. Σε κάθε περίπτωση, η κύρια επιδίωξη είναι η επίτευξη ισορροπίας μεταξύ των ταννινών των γιγάρτων και των φλοιών.

Στην ερυθρή οινοποίηση, η εκχύλιση πρέπει να προσαρμόζεται στον τύπο των σταφυλιών. Μάλιστα, σύμφωνα με έρευνα που έγινε σε σταφύλια του Bordeaux, είναι απαραίτητη η διάκριση μεταξύ της εκχύλισης των ταννινών και των ανθοκυανών. Μπορούμε να διακρίνουμε διάφορες περιπτώσεις.

Κατ' αρχήν έστω πως τα σταφύλια είναι υγιή και έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε ανθοκυάνες ($A_{pH > 120} \text{ mg/L χυμού}$). Εάν οι ανθοκυάνες είναι εύκολα εκχυλίσιμες ($\Delta E \leq 30$), μια ελαφριά θείωση (3 g/hL) είναι απαραίτητη για τη εκχύλιση πριν την αλκοολική ζύμωση. Το χρώμα του γλεύκους μόλις σπάσει το σταφύλι είναι πολύ έντονο και έτσι δεν υπάρχει κίνδυνος να δημιουργηθεί έλλειψη χρώματος σε επόμενο στάδιο. Εάν οι ανθοκυάνες δεν είναι πολύ εκχυλίσιμες, (ΔE 50 με 60), οι χρωστικές θα

εκχυλίστουν με αργό ρυθμό, έτσι μια θείωση στα 5-6 g/hL, συνδυασμένη με χαμηλή θερμοκρασία (<10°C), προκαλεί τη διάτρηση των μεμβρανών, καθυστερώντας την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης 1 έως 4 μέρες και προάγοντας την απελευθέρωση του χρώματος. Τα ένζυμα μπορούν να αυξήσουν το ρυθμό της εκχύλισης, αλλά δεν έχουν μεγάλο αποτέλεσμα στο τελικό επίπεδο του χρώματος. Είναι περισσότερο αποτελεσματικά στην εκχύλιση ταννινών από τους φλοιούς και η χρήση τους συνιστάται όταν οι φλοιοί έχουν χορτώδη χαρακτήρα.

Μια άλλη περίπτωση είναι να είναι τα σταφύλια υγιή, αλλά να έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε ανθοκυάνες (A pH < 1000 mg/L χυμού). Υπό αυτές τις συνθήκες η εκχύλιση των ανθοκυανών είναι δύσκολη. Η τεχνική που περιγράφηκε προηγουμένως μπορεί να εφαρμοστεί, σε συνδυασμό με πιο συχνή ανάδευση. Επίσης ορισμένες πιο εξεζητημένες τεχνικές μπορούν επίσης να είναι χρήσιμες: ζύμωση σε υψηλή θερμοκρασία, κρυοεκχύλιση και αρχική εκχύλιση σε χαμηλή θερμοκρασία με τη χρήση υγρού διοξειδίου του άνθρακα. Υπό αυτές τις συνθήκες σπάνε τα κύτταρα και ελευθερώνεται το περιεχόμενό τους, έτσι είναι δυνατόν να βελτιωθεί το χρώμα, αλλά μπορεί να υπάρξει και αρνητική επίδραση στην ποιότητα, σε περίπτωση που δεν υπάρχει πλήρης έλεγχος της διαδικασίας.

Υπάρχει βέβαια και το ενδεχόμενο τα σταφύλια να έχουν προσβληθεί από σήψη. Πρόκειται για επικίνδυνη κατάσταση, που πρέπει να αποφεύγεται. Οι ανθοκυάνες, στην περίπτωση αυτή θα έχουν υποβαθμιστεί. Η λακκάση είναι πάντα παρούσα και δημιουργεί προβλήματα οξείδωσης. Η επεξεργασία με διοξείδιο του θείου (6 με 8 g/hL) είναι απαραίτητη, ενώ θα πρέπει να αποφευχθεί η επαφή με τον αέρα σε προζυμωτικό στάδιο. Η θέρμανση του γλεύκους είναι μια αποδεκτή λύση, αλλά υπάρχει κίνδυνος δημιουργίας ασταθών κολλοειδών ουσιών. Η χρήση ξηρών, ενεργοποιημένων ζυμών συνιστάται για την έγκαιρη έναρξη της ζύμωσης.

Εάν τα γίγαρτα έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε ταννίνες (TG > 50), χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή στο ανακάτεμα από τη μέση της ζύμωσης και ειδικά στο τέλος της, ώστε να αποφευχθεί ο κίνδυνος να εκχυλίστουν πολλές επιθετικές ταννίνες που θα δημιουργήσουν ανεπιθύμητα οργανοληπτικά αποτελέσματα.

Στην περίπτωση που τα γίγαρτα έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε ταννίνες

($TG \leq 15$), δεν υπάρχει κίνδυνος να δημιουργηθεί πρόβλημα από πολύ μεγάλη ποσότητα ταννινών από τα γίγαρτα στην ποιότητα του οίνου. Αντίθετα, θα πρέπει να γίνει οποιαδήποτε δυνατή προσπάθεια ώστε να πραγματοποιηθεί η καλύτερη δυνατή εκχύλιση, καθώς οι ταννίνες είναι απαραίτητες για την καλή ισορροπία και δομή του οίνου. Συνιστάται ανάδευση και υψηλές θερμοκρασίες από το μέσο της αλκοολικής ζύμωσης και μέχρι το τέλος της, πιθανώς με επιπρόσθετη ανάδευση κατά τη μεταζυμωτική εκχύλιση.

Εάν ο σκοπός μας είναι η παραγωγή οίνου με καλό χρώμα, ισορροπία, μαλακότητα και ευδιάκριτα αρώματα, αλλά χωρίς επιθετικότητα, είναι απαραίτητο να προωθηθεί η εκχύλιση των ταννινών από τους φλοιούς. Βέβαια, θα πρέπει να αποφεύγουμε την υπερβολική εκχύλιση, καθώς δίνει έναν χορτώδη χαρακτήρα. Θα πρέπει να δίνουμε έμφαση στην εκχύλιση πριν από την αλκοολική ζύμωση, η ανάδευση θα πρέπει να γίνεται κατά το δυνατόν λιγότερο και κυρίως στην αρχή της εκχύλισης, ενώ η θερμοκρασία δεν θα πρέπει να περνά τους 30°C.

Σε περίπτωση που θέλουμε να φτιάξουμε έναν οίνο που θα μπορεί να παλαιώσει, μια καλή ταννική δομή είναι απαραίτητη. Θα πρέπει βέβαια να είναι προσαρμοσμένη στα σταφύλια, για να μη δημιουργηθεί τραχύς χαρακτήρας. Οι ταννίνες των γιγάρτων είναι τόσο αναγκαίες όσο και αυτές των φλοιών. Επιπλέον οι μοριακές δομές των φαινολικών συστατικών θα πρέπει να τροποποιηθούν, ώστε να υπάρχει ομαλότητα. Αυτό απαιτεί αερισμό και σχετικά υψηλή θερμοκρασία στο τέλος της αλκοολικής ζύμωσης, καθώς και μεταζυμωτική εκχύλιση.

Ο χρόνος παραμονής στη δεξαμενή εξαρτάται από την κατάσταση των σταφυλιών. Μακρά παραμονή (3-4 εβδομάδες) έχει θετικά αποτελέσματα σε σταφύλια πολύ καλής ποιότητας και τέλεια ωριμασμένα. Πρέπει να μειωθεί εάν τα σταφύλια δεν έχουν ωριμάσει καλά, για να αποφύγουμε τη δημιουργία χορτώδους χαρακτήρα, ή εάν τα σταφύλια είναι υπέρωριμα, για να ελαχιστοποιήσουμε την τραχύτητα των ταννινών των γιγάρτων (Ribéreau-Gayon, P. et al., 2006).

1.3 Εξέλιξη του χρώματος

1.3.1 Αντιδράσεις διάσπασης των ανθοκυανών

Οι ανθοκυάνες δεν είναι σταθερά μόρια, οπότε η συγκέντρωσή τους στους οίνους μειώνεται κατά τους πρώτους μήνες της παραμονής στο βαρέλι. Μετά από μερικά χρόνια εξαφανίζονται εντελώς, παρά το γεγονός ότι ο οίνος παραμένει ερυθρός. Αυτή η μείωση οφείλεται σε αντιδράσεις που συμβαίνουν με άλλα συστατικά του οίνου, κυρίως ταννίνες, σε αντιδράσεις διάσπασης, αλλά και σε τροποποίηση της δομής τους.

Η σταθερότητα των ανθοκυανών εξαρτάται από πολλούς παράγοντες: τον τύπο των μορίων, τη συγκέντρωση του διαλύματος, το pH, τη θερμοκρασία, την οξείδωση, το φως και το είδος των διαλυτών. Η μείωση στη συγκέντρωση των ανθοκυανών, που καταλήγει στην εξαφάνισή τους μετά από μερικά χρόνια, οφείλεται σε αντιδράσεις διάσπασης και σε αντιδράσεις σταθεροποίησης. Οι αντιδράσεις διάσπασης καταλήγουν στο σχηματισμό διάφορων ενώσεων: 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 (Ribéreau-Gayon, P. et al., 2006, Gomez-Plaza, E. et al., 2005).

Σύμφωνα με μελέτη του Glories (1978a) και του Galvin (1993), μπορούμε να διαχωρίσουμε τις αντιδράσεις διάσπασης σε τρεις κατηγορίες. Η πρώτη είναι η θερμική υποβάθμιση των ανθοκυανών. Η θέρμανση των ανθοκυανών στους 100°C προκαλεί μείωση της έντασης του χρώματος, που γίνεται εντονότερη με την πάροδο του χρόνου. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί με μετατόπιση της ισορροπίας προς τη χαλκόνη και τις άχρωμες μορφές. Σε περίπτωση που θερμανθούν οι ανθοκυάνες δεν επανέρχονται ποτέ στην αρχική τους κατάσταση, όποιες και αν είναι οι υπόλοιπες συνθήκες. Οι αντιδράσεις που συμβαίνουν είναι οι εξής: σπάει η ανθρακική αλυσίδα της trans χαλκόνης και σχηματίζεται βενζοϊκό οξύ, αλλά και η γλυκοζιδική υδρόλυση με το σχηματισμό διυδροφλαβονόλης από όπου μπορεί να προκύψει κινναμωμικό οξύ.

Μετά από 8 ώρες θέρμανσης τα διαλύματα των ανθοκυανών περιέχουν κινναμωμικά οξέα, διυδροφλαβονόλες, κατεχίνες και κάποια άλλα μη ταυτοποιημένα μόρια. Επιπλέον, η μαλβιδίνη αποδεικνύεται πολύ πιο ευαίσθητη

στη θερμική υποβάθμιση από την κυανιδίνη. Έτσι γίνεται αντιληπτό πως η θερμική υποβάθμιση είναι ένας παράγοντας που πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη, όταν πρόκειται να παλαιωθούν οίνοι σε βαρέλια, δεξαμενές ή φιάλες, προκειμένου να προστατευτεί το χρώμα τους.

Η επόμενη περίπτωση αντίδρασης διάσπασης είναι η οξειδωτική υποβάθμιση. Οι ανθοκυάνες, σε όξινο αλκοολικό διάλυμα (0,1% HCl) χάνουν το χρώμα τους μετά από μερικές μέρες έκθεσης στο φως. Η αντίδραση αυτή επηρεάζεται κυρίως από τη συγκέντρωση της αλκοόλης και το είδος του διαλύτη. Το οξυγόνο και το φως αντιδρούν σαν καταλύτες. Διυδροφλαβονόλες (ταξιφολίνη) έχουν ανιχνευθεί στο μέσο αντίδρασης. Η μαλβιδίνη είναι περισσότερο ανθεκτική από την κυανιδίνη στην ελεγχόμενη οξείδωση που συμβαίνει κατά την παλαίωση, λόγω της υποκατάστασης του Β' δακτυλίου της.

Οι ορθοδιαφαινόλες οξειδώνονται και μπορούν να δράσουν σαν υποστρώματα για τα ένζυμα οξείδωσης, όπως η πολυφαινολοξειδάση και σε μικρότερο βαθμό η υπεροξειδάση. Οι ορθοκινόνες που παράγονται με αυτόν τον τρόπο είναι ισχυρά οξειδωτικά με έντονη δραστηριότητα. Οι ανθοκυάνες αντιδρούν με τα προϊόντα της οξείδωσης, αλλά όχι τόσο έντονα όπως το καφταρικό οξύ. Μπορεί 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 διαφοροποιήσει τις ηλεκτρόφιλες κινόνες, δίνοντας άχρωμα προϊόντα προσθήκης που αφυδατώνονται προς σχηματισμό ερυθρού κατιόντος φλαβυλίου. Η αντίδραση αυτή διαπιστώθηκε σε τεχνητό διάλυμα αλλά και σε οίνο.

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 σε ερυθρούς οίνους, ορισμένες φορές σε ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις, όταν ο οίνος 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 άνθρακα 4.

Συνοψίζοντας, μπορούμε να πούμε πως με τις αντιδράσεις διάσπασης οι ελεύθερες ανθοκυάνες διασπώνται, λόγω θέρμανσης σε φαινολικά οξέα (κυρίως η μαλβιδίνη) και με βίαιη οξειδωση, κυρίως η δελφινιδίνη, η πετουνιδίνη και η κυανιδίνη. Είναι πολύ ευαίσθητες στις κινόνες και στη δράση των οξειδασών, είτε άμεσα, είτε σε συνδυασμό με το καφταρικό οξύ. Στις αντιδράσεις που οδηγούν σε δομικές αλλαγές, οι ανθοκυάνες δρουν με ενώσεις που έχουν πολικούς διπλούς δεσμούς και σχηματίζουν νέες, πορτοκαλί ενώσεις οι οποίες είναι σχετικά ανθεκτικές στο διοξείδιο του θείου και στις αλλαγές του pH. Οι ενώσεις με τις οποίες αντιδρούν οι ανθοκυάνες έχουν διάφορες προελεύσεις. Μπορεί να έχουν προκύψει από οξειδώσεις (ακεταλδεΐδη), από τη δραστηριότητα ζυμών (πυροσταφυλικό οξύ), από βακτηριακό μεταβολισμό (διακετύλιο), ή μπορεί να οφείλονται στην προσβολή των σταφυλιών από *Botrytis cinerea* (φουρφουράλη) (Ribéreau-Gayon, P. et al., 2006).

1.3.2 Αντιδράσεις σταθεροποίησης των ανθοκυανών

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η συγκέντρωση όλων των ανθοκυανών αυξάνεται άλλοτε μέχρι την τρίτη και άλλοτε μέχρι την πέμπτη ημέρα της αλκοολικής ζύμωσης παρουσία στεμφύλων, και στη συνέχεια παρατηρείται μια σταδιακή μείωση που συνεχίζεται και μετά το τέλος της ζύμωσης, χωρίς οι επιμέρους συγκεντρώσεις των ανθοκυανών να παρουσιάσουν ανάκαμψη, παρά τις μεταγγίσεις και τους αερισμούς. Παρά τη μείωση αυτή, η ένταση του νέου οίνου αυξάνεται μετά από κάθε μετάγγιση, γιατί η οξείδωση των ελεύθερων ανθοκυανών (A) διευκολύνει το σχηματισμό ενώσεων με τις προκυανιδίνες και τις ολιγομοριακές ταννίνες (T), με συνέπεια τη δημιουργία έγχρωμων ενώσεων ταννινών-ανθοκυανών. Οι ενώσεις αυτές έχουν διαφορετικά χρώματα από τις ελεύθερες ανθοκυάνες και είναι αρκετά σταθερές στις μεταβολές του pH, της συγκέντρωσης του SO₂ και στο χρόνο, γεγονός που επιτρέπει στους ερυθρούς οίνους να διατηρήσουν το χρώμα τους κατά την αποθήκευση και την παλαίωση. Έτσι εξηγείται η αύξηση του χρώματος των νέων οίνων, παρά τη μείωση της συγκέντρωσης των ελεύθερων ανθοκυανών (Κουράκου, Σ., 1998, Κοτσερίδης, Γ.,

2006).

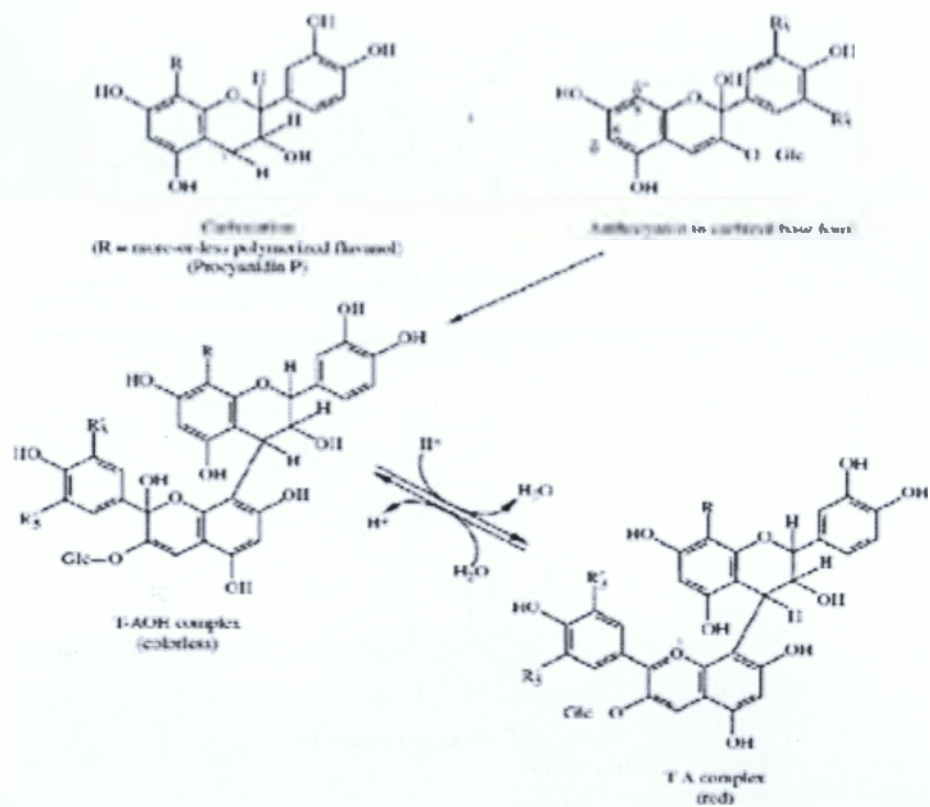
Ο σχηματισμός των ενώσεων ταννινών-ανθοκυανών εξαρτάται από τις συνθήκες που επικρατούν (θερμοκρασία, οξείδωση), αλλά και από τη φύση και την ποσότητα των ανθοκυανών και των ταννινών που θα εκχυλιστούν κατά την οينوποίηση και από τη μεταξύ τους αναλογία. Συνεπώς το χρώμα των νέων ερυθρών οίνων εξαρτάται από την περιεκτικότητα των ραγών σε ανθοκυάνες, την ωριμότητα των γιγάρτων που εμπλουτίζουν το ζυμούμενο γλεύκος σε προκυανιδίνες και τη μέθοδο οينوποίησης που καθορίζει τις συνθήκες εκχύλισης. Το χρώμα κυμαίνεται από μωβ σε πορτοκαλί και είναι πιο έντονο στο pH του οίνου από αυτό των ελεύθερων ανθοκυανών. Η εξάρτησή του από το διοξείδιο του θείου είναι σχετικά μικρή (Κουράκου, Σ., 1998, Ribéreau-Gayon, P. et al., 2006, Eiro, M.J. et al., 2002, Hermosin-Gutierrez, I., 2003).

1.3.3 Μηχανισμοί αντιδράσεων

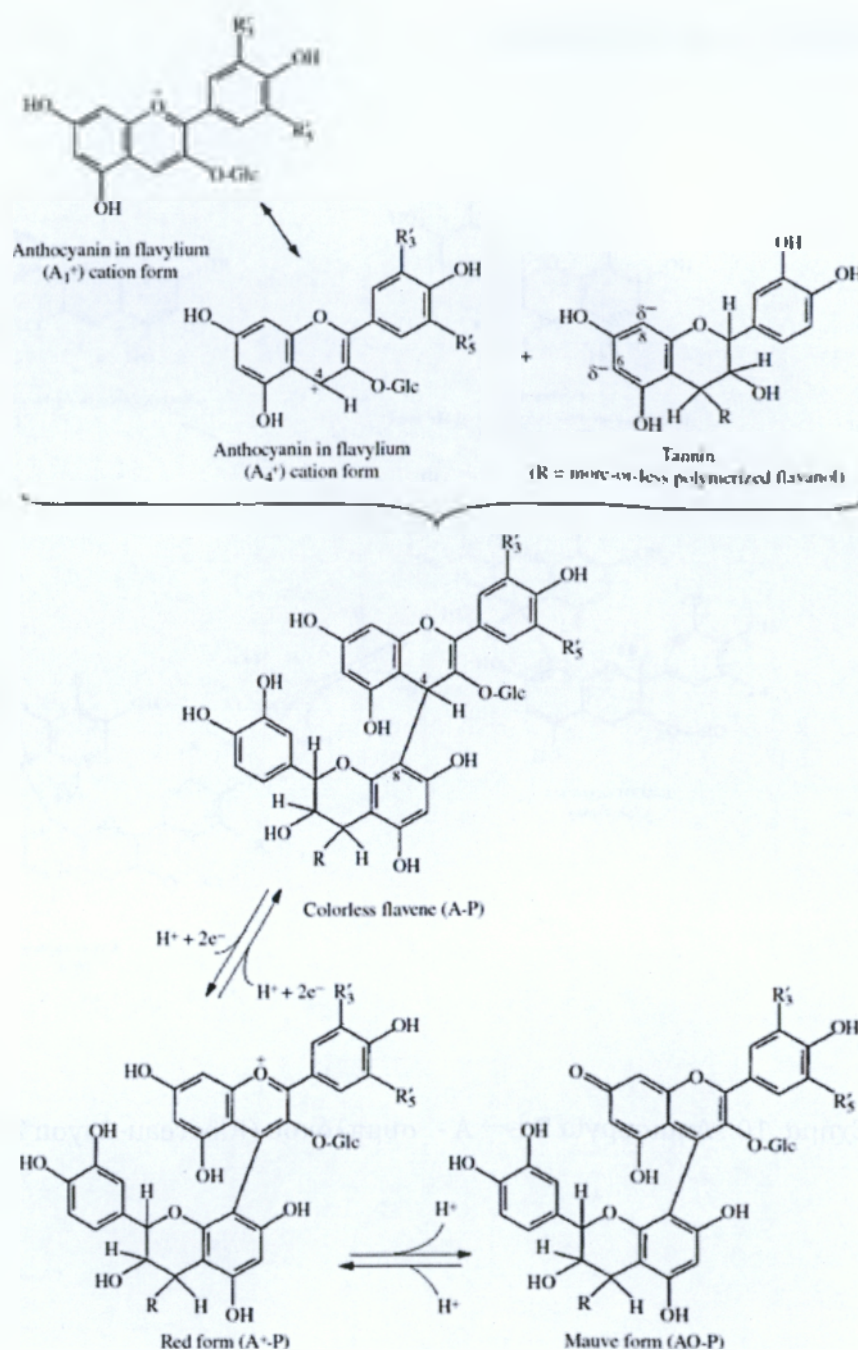
Εξαιτίας της ευαισθησίας που παρουσιάζουν οι ελεύθερες ανθοκυάνες στην μη αντιστρέψιμη υποβάθμιση, είναι σημαντικό ο πολυμερισμός μεταξύ ανθοκυανών και ταννινών να γίνει στα πρώτα στάδια της ωρίμανσης του οίνου. Κατά την εκχύλισή τους από τα σταφύλια, οι κατεχίνες και οι προκυανιδίνες είναι πολύ ευδιάλυτες και έτσι μπορούν να σχηματίσουν διαλυτά πολυμερή με τις ανθοκυάνες. Η αντίδραση αυτή οδηγεί στο σχηματισμό T-A ή A-T συμπλόκων (Jackson, R. S., 2008).

Οι περισσότερες, άχρωμες, ημιακεταλικές ανθοκυάνες δημιουργούν $T+ \rightarrow A$ - σύμπλοκα (Σχήμα 10). Αυτά σχηματίζονται καθώς ο πυρηνόφιλος C8 (ή ο C6) της ανθοκυάνης, υπό τη μορφή της βάσης της καρβινόλης (AOH), ενώνεται με τον ηλεκτρονιόφιλο C4 μιας τελικής φλαβονοειδούς μονάδας μιας προκυανιδίνης ή μιας μικρής συμπυκνωμένης ταννίνης. Ο σχηματισμός καρβοκατιόντων από τις προκυανιδίνες ενισχύεται από τις υψηλές θερμοκρασίες και απαιτεί όξινο περιβάλλον (οίνος). Τα μόρια που σχηματίζονται είναι αρχικά άχρωμα, αλλά γρήγορα ακολουθεί αφυδάτωση και δημιουργούνται έγχρωμες κιτρινοπορτοκαλί ενώσεις. Για την αντίδραση σχηματισμού τους δεν απαιτείται αέρας, αφού δε χρειάζεται να γίνει οξείδωση, μάλιστα η διατήρηση του οίνου σε περιβάλλον χωρίς αέρα ευνοεί αυτόν τον τύπο της συμπύκνωσης. Τα πολυμερή που προκύπτουν μπορεί να έχουν μέχρι

οχτώ φλαβονοειδείς υπομονάδες.



Σχήμα 10 : Δημιουργία T⁺ → A⁻ συμπλόκου (Ribéreau-Gayon 2006).



Σχήμα 11 : Δημιουργία $A^+ \rightarrow T$ - συμπλόκου (Ribéreau-Gayon 2006).

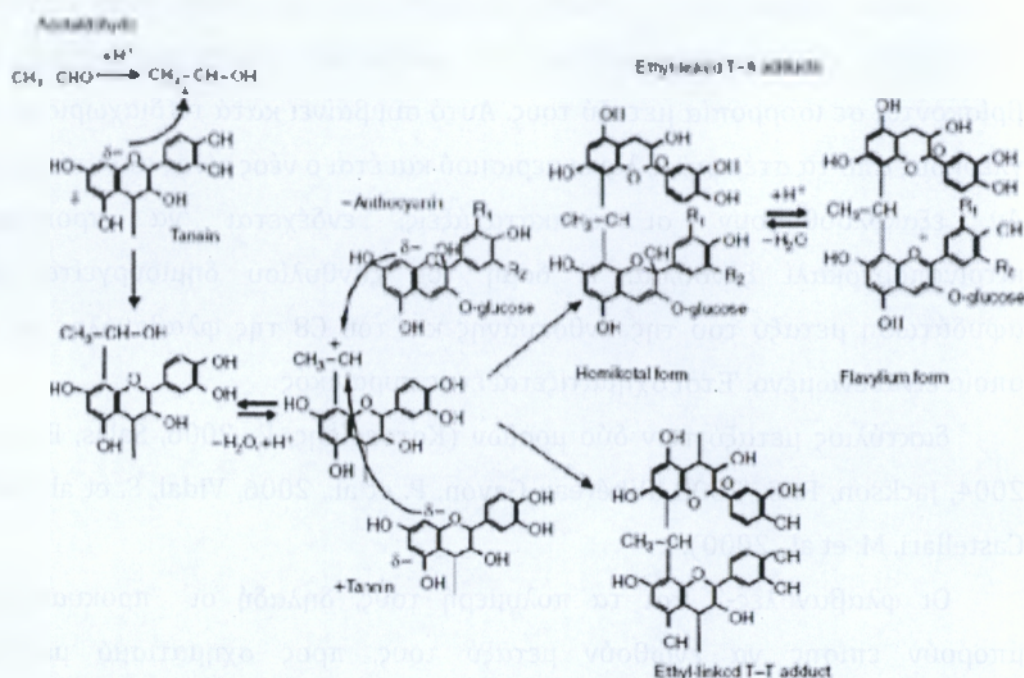
Αντίθετα, η κατοχή ηλεκτρονίου από τον C4 ενός ηλεκτρονιόφιλου φλαβυλίου (A^+) ανθοκυάνης και από τον αρνητικά φορτισμένο C8 ή C6 μιας νουκλεόφιλης φλαφανόλης-3 μιας προκυανιδίνης ή μιας κατεχίνης ή επικατεχίνης, δημιουργεί $A^+ \rightarrow T$ - σύμπλοκα (Σχήμα 11). Αρχικά σχηματίζεται

ένα άχρωμο (ημιακεταλικό) σύμπλοκο (A-P), αλλά με επακόλουθη οξείδωση επανέρχεται η έγχρωμη κατάσταση του φλαβυλίου (A+-P) και η AO-P, που βρίσκονται σε ισορροπία μεταξύ τους. Αυτό συμβαίνει κατά το διαχωρισμό του γλεύκους από τα στέμφυλα, λόγω αερισμού και έτσι ο νέος οίνος αποκτά χρώμα. Αν εξακολουθήσουν οι ανακατατάξεις, ενδέχεται να προκύψουν κιτρινοπορτοκαλί ξανθύλια. Η δομή του ξανθυλίου δημιουργείται από αφυδάτωση μεταξύ του της ανθοκυάνης και του C8 της φλαβανόλης με την οποία είναι ενωμένο. Έτσι σχηματίζεται ένας πυρανικός

δακτύλιος μεταξύ των δύο μορίων (Κοτσερίδης, Γ., 2006, Salas, E. et al., 2004, Jackson, R. S., 2008, Ribéreau-Gayon, P. et al., 2006, Vidal, S. et al., 2004, Castellari, M. et al., 2000).

Οι φλαβανόλες-3 και τα πολυμερή τους, δηλαδή οι προκυανιδίνες, μπορούν επίσης να ενωθούν μεταξύ τους, προς σχηματισμό μεγάλων συμπυκνωμένων ταννινών, οι οποίες είναι πολύ πιο πολύπλοκες από τις ταννίνες που εκχυλίζονται από τα σταφύλια. Τα μεγάλα αυτά πολυμερή είναι λιγότερο επιρρεπή στη συμπύκνωση με ανθοκυάνες, σε σχέση με τις μικρότερες προκυανιδίνες και τις κατεχίνες. Οι παράγοντες που καθυστερούν τον πολυμερισμό των ανθοκυανών με φλαβονοειδείς ενώσεις, αυξάνουν την πιθανή οξείδωση και καστάνωση των ανθοκυανών. Για παράδειγμα η προσθήκη διοξειδίου του θείου οδηγεί σε δημιουργία θειοενώσεων των ανθοκυανών. Σε περίπτωση που οι ενώσεις αυτές δεσμεύσουν τον ίδιο άνθρακα που συνδέει τις ανθοκυάνες με τις φλαβονοειδείς ενώσεις, παρεμποδίζεται ο πολυμερισμός. Όλα αυτά έχουν σαν αποτέλεσμα την καθυστέρηση και την παρεμπόδιση του πολυμερισμού, ο οποίος απωθεί το νερό, προστατεύοντας τις ανθοκυάνες από νουκλεόφιλες ενώσεις. Επιπλέον, ο πολυμερισμός τις προστατεύει και από τον αποχρωματισμό που προκαλεί το διοξείδιο του θείου (Jackson, R. S., 2008).

Οι αντιδράσεις συμπύκνωσης των ανθοκυανών με φλαβονοειδείς ενώσεις πραγματοποιείται αργά στον οίνο. Εκτός από τις άμεσες αντιδράσεις των ανθοκυανών με τις ταννίνες που περιγράφηκαν πιο πάνω, υπάρχουν και οι έμμεσες, μέσω της ακεταλδεϋδης, που παράγεται από την οξείδωση της αιθανόλης (Pissarra, J. et al., 2004).



Σχήμα 12 : Δημιουργία συμπλόκου ταννίνης-ανθοκυάνης και ταννίνης-ταννίνης, μέσω ακεταλδεΐδης (Jackson, R. S., 2008).

Σε χαμηλά pH η ακεταλδεΐδη σχηματίζει καρβοκατιόν, βρίσκεται δηλαδή σε κατάσταση που της επιτρέπει να αντιδράσει με τη νουκλεόφιλη (αρνητικά φορτισμένη) C8 του ακραίου τμήματος μιας προκυανιδίνης (Σχήμα 12). Κατά την αφυδάτωση, η ακεταλδεΐδη μπορεί να σχηματίσει αιθυλικό σταυροδεσμό με τον C8 μιας ανθοκυάνης που βρίσκεται σε ημιακεταλική κατάσταση. Μια επόμενη αφυδάτωση μετατρέπει την άχρωμη ημιακετάλη σε ερυθρό φλαβύλιο ή σε βάση κινόνης που έχει βιολετί χρώμα, ενισχύοντας έτσι το χρώμα του οίνου. Η συμπύκνωση αυτή γίνεται κατά την ήπια οξείδωση των οίνων που πραγματοποιείται κατά την παλαίωση σε βαρέλι, οπότε σχηματίζονται μικρές ποσότητες ακεταλδεΐδης από την οξείδωση της αιθανόλης. Παρόμοιες ενώσεις με ακεταλδεΐδη συμβαίνουν κατά τον πολυμερισμό φλαβανολών-3 μεταξύ τους, είτε μέσω παραπλήσιων νουκλεόφιλων C8, είτε μεταξύ του C8 μιας φλαβονοειδούς ένωσης και του νουκλεόφιλου C6 μιας άλλης. Ένας άλλος τρόπος σύνδεσης της ακεταλδεΐδης με ταννίνες και ανθοκυάνες εμπλέκει το

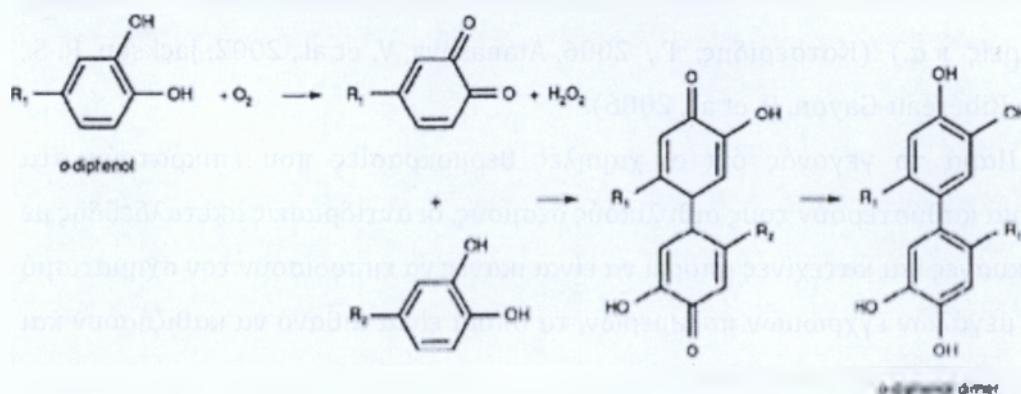
νουκλεόφιλο τμήμα μιας φλαβανόλης-3 και του C4 ενός φλαβυλίου (θετικά φορτισμένου) ανθοκυάνης. Σύμφωνα μάλιστα με κάποιες έρευνες, άλλες αλδεϋδες μπορούν να συμπεριφερθούν σαν την ακεταλδεϋδη και να σχηματίσουν δεσμούς με ανθοκυάνες ή μεταξύ ανθοκυανών και φλαβονολών-3. Οι ενώσεις που προκύπτουν από την έμμεση ένωση ανθοκυανών-ταννινών μέσω της ακεταλδεϋδης έχουν μωβ χρώμα και διάφορες δομές (διμερείς, τριμερείς κ.α.) (Κοτσερίδης, Γ., 2006, Atanasova, V. et al., 2002, Jackson, R. S., 2008, Ribereau-Gayon, P. et al., 2006).

Παρά το γεγονός ότι οι χαμηλές θερμοκρασίες που επικρατούν στα κελάρια καθυστερούν τους αιθυλικούς δεσμούς, οι αντιδράσεις ακεταλδεϋδης με ανθοκυάνες και κατεχίνες μπορεί να είναι ικανές να εμποδίσουν τον σχηματισμό πολύ μεγάλων έγχρωμων πολυμερών, τα οποία είναι πιθανό να καθιζήσουν και να προκληθεί απώλεια χρώματος.

Η σημασία που έχουν οι ταννίνες του φλοιού και των γιγάρτων σε σχέση με τη σημασία των μικρότερων φλαβονολών-3, στο σχηματισμό των σταθερών συμπλόκων μεταξύ ανθοκυανών και ταννινών, δεν έχει αποσαφηνιστεί. Η ταχύτητα του σχηματισμού έγχρωμων πολυμερών, αλλά και η φυσική τους ομοιότητα με τις ταννίνες, υποδεικνύει πως οι ταννίνες του σταφυλιού έχουν σημαντικό ρόλο, τουλάχιστον στους νέους οίνους.

Η πιο δραστική ανθοκυάνη για το σχηματισμό των πολυμερών είναι η μαλβιδίνη, που είναι και η πιο συνηθισμένη ανθοκυάνη των σταφυλιών. Η αντίδραση αυτή συμβαίνει πιο γρήγορα από ότι η συμπλοκοποίηση με φλαβανόλες- 3, αλλά απαιτεί την αυτοοξείδωση των φαινολικών, παρουσία οξυγόνου. Αυτό εξηγεί την ενίσχυση του χρώματος και τη σταθεροποιητική επίδραση που έχει η έκθεση των νέων οίνων σε μικρές ποσότητες οξυγόνου. Κατά την αυτοοξείδωση της ο-διφαινόλης, που καταλύεται από ιόντα χαλκού ή σιδήρου, δημιουργείται υπεροξείδιο του υδρογόνου (Σχήμα 13). Η ο-δικινόνη που σχηματίζεται μπορεί να αντιδράσει με την ο-διφαινόλη, προς σχηματισμό ενός διμερούς ο-διφαινόλης. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου που παράχθηκε κατά την αρχική αυτοοξείδωση, μπορεί να ενεργοποιήσει την οξείδωση της αιθανόλης σε ακεταλδεϋδη, και πάλι παρουσία ιόντων χαλκού ή σιδήρου. Οι αντιδράσεις πολυμερισμού ανθοκυανών-ταννινών, που ενεργοποιούνται από την ακεταλδεϋδη, επίσης ενισχύουν το βιολετί χρώμα στους νέους οίνους. Η

έκταση αυτής της αντίδρασης εξαρτάται από το οξυγόνο, την παρουσία διοξειδίου του θείου, και την ποσότητα και τα είδη των κατεχινών και των πολυμερών τους, των προκυανιδινών.



Σχήμα 13 : Δημιουργία πολυμερών ο-διφαινόλης με αυτοοξειδωση που ακολουθεί την οξείδωση των απλών ο-διφαινόλων σε ο-δικινόνες (Jackson, R. S., 2008).

Ένας άλλος τρόπος ενίσχυσης του χρώματος, που σχετίζεται με την αυτοοξειδωτική δημιουργία του υπεροξειδίου, περιλαμβάνει την οξείδωση της γλυκερόλης, που είναι η δεύτερη ποσοτικά αλκοόλη του οίνου. Ο σχηματισμός γλυκεριναλδεϋδης και διυδροξυακετόνης, μπορεί να προάγει το σχηματισμό επιπλέον έγχρωμων ανθοκυανικών ενώσεων (Jackson, R. S., 2008).

Άλλος μηχανισμός που σχετίζεται με τη σταθεροποίηση του χρώματος που πραγματοποιείται νωρίς, είναι η άμεση αντίδραση της μαλβιδίνης με δευτερεύοντα προϊόντα των ζυμών, όπως η ακεταλδεϋδη, το πυροσταφυλικό οξύ και οι βυνιφαινόλες. Οι ενώσεις αυτές λέγονται πυρανοανθοκυάνες. Δημιουργούν έναν επιπλέον πυρανικό δακτύλιο μεταξύ του C4 και της υδροξυλομάδας του C5 της ανθοκυάνης. Είναι πολύ σταθερές και ανθεκτικές στον αποχρωματισμό που προκαλεί το διοξείδιο του θείου και μπορούν να συνεισφέρουν δραστικά στη σταθερότητα του χρώματος. Με εξαίρεση κάποιες πορτισίνες που έχουν μπλε χρώμα, οι περισσότερες πυρανοανθοκυάνες είναι

πορτοκαλοκίτρινες. Είναι λοιπόν πιθανό να συνεισφέρουν στον καφετί χρωματισμό που δημιουργείται κατά την παλαίωση (Jackson, R. S., 2008, Hakansson, A. et al., 2003, Mateus, N. et al., 2005, Monagas, M. et al., 2006, Vivar-Quintana, A. M. et al., 2002).

Στο πόρτο οι κύριες μονομερείς ανθοκυάνες που παραμένουν σε παλαιωμένους οίνους είναι οι βιτιζίνες. Πρόκειται για προϊόντα αντίδρασης της μαλβιδίνης με το πυροσταφυλικό οξύ (βιτιζίνες A), ή την ακεταλδεϋδη (βιτιζίνες B). όπως και οι ανθοκυάνες, μπορούν να υποστούν αλκυλίωση. Συνήθως σχηματίζονται κατά τα πρώτα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης. Μπορούν επίσης να σχηματίσουν πολυμερή με ταννίνες (Jackson, R. S., 2008, Bakker, J. et al., 1996). Οι πινοτίνες σχηματίζονται μεταξύ ανθοκυανών και κινναμωμικού οξέος, όπως το καφεϊκό οξύ. Συσσωρεύονται μετά την αλκοολική ζύμωση. Οι ποριτσίνες προέρχονται από την ένωση ανθοκυάνης με πυροσταφυλικό οξύ και φλαβανόλες, παρουσία ακεταλδεϋδης. Μετά το σχηματισμό τους κυκλοποιούνται και οξειδώνονται (Fulcrand, H. et al., 1997, Jackson, R. S., 2008, Oliveira, J. et al., 2005).

Οι ανθοκυάνες και οι φλαβανόλες-3 επίσης μπορούν να ενωθούν με γλυοξυλικό οξύ, προς παραγωγή ξανθυλίου που έχει χρώμα κιτρινοπορτοκαλί. Το γλυοξυλικό οξύ παράγεται από το τρυγικό οξύ με οξείδωση που καταλύεται από μεταλλοϊόν. Τα προϊόντα του ξανθυλίου μπορούν να ενωθούν με φλαβανόλες προς σχηματισμό πολύπλοκων ταννικών δομών. Τελικά το γλυοξυλικό οξύ μπορεί να συμπυκνωθεί με προϊόντα αποικοδόμησης ανθοκυανών και κατεχίνες, σχηματίζοντας προϊόντα με κίτρινο χρώμα (Jackson, R. S., 2008).

1.3.4 Χρονική σειρά και συνθήκες πραγματοποίησης αντιδράσεων

Κατά τη διάρκεια της προζυμωτικής εκχύλισης, σε περίπτωση που το γλεύκος δεν προστατεύεται, είναι πιθανή η δημιουργία αποχρωματισμού, 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 $A^+ \rightarrow T^-$, επίσης παράγουν άχρωμες ενώσεις, που αντιδρούν όταν γίνεται η αποστράγγιση του οίνου, μετά την αλκοολική ζύμωση.

Στη διάρκεια της μεταζυμωτικής εκχύλισης, το μέσο εξακολουθεί να είναι κορεσμένο με διοξείδιο του άνθρακα και έτσι πραγματοποιείται ο άλλος μηχανισμός άμεσης αντίδρασης, δηλαδή $T^+ \rightarrow A^-$, που οδηγεί στο σχηματισμό άχρωμων ή κόκκινων προϊόντων. Αυτό δε συμβαίνει στην περίπτωση του αερισμού λόγω μικροοξυγόνωσης, ο οποίος οδηγεί κυρίως σε προϊόντα T-αιθυλ-A (σύνδεση με αιθυλοδεσμό), που έχουν μωβ χρώμα. Εάν έχουμε αυτή την εξέλιξη, ανάλογα με την ποσότητα της ακεταλδεϋδης που σχηματίστηκε και το είδος των ταννινών που έχουν εκχυλιστεί, δηλαδή εάν πρόκειται για ταννίνες γιγάρτων ή φλοιών και ανάλογα με το βαθμό πολυμερισμού τους, αυτά τα σύμπλοκα μπορούν να καθιζήσουν και να σχηματιστούν κόκκινες χρωστικές. Επίσης η μικροοξυγόνωση εμποδίζει τη δημιουργία των αναγωγικών οσμών και βελτιώνει το φρουτώδες άρωμα που γίνεται αντιληπτό μετά την αποστράγγιση (Ribèreau-Gayon, P. et al., 2006).

Όπως ήδη αναφέρθηκε, κατά τη ζύμωση δεν ευνοείται ο σχηματισμός ενώσεων T-A, λόγω του έντονα αναγωγικού περιβάλλοντος. Όμως μετά την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης πρέπει να ευνοηθεί ο σχηματισμός ενδοφλαβονοειδών ενώσεων μεταξύ των συστατικών που εκχυλίστηκαν. Στη διαδικασία αυτή επιδρούν τρεις παράγοντες. Καταρχήν ο θειώδης ανυδρίτης, ο οποίος αφού ενωθεί με τις ανθοκυάνες, εμποδίζει το σχηματισμό του συμπλόκου T-A, το φως, που καταστρέφει τις ελεύθερες ανθοκυάνες και το οξυγόνο, που με τις οξειδώσεις που προκαλεί, ευνοεί τον σχηματισμό των συμπλόκων αυτών. Ως προς τον τελευταίο παράγοντα, όταν οι οίνοι παρασκευάζονται σε βαρέλια, η διείσδυση του αέρα από τους πόρους του ξύλου εξασφαλίζει έγκαιρα αυτή την οξείδωση. Αυτό όμως δεν συμβαίνει στις δεξαμενές, όπου η επίτευξη σταθερού χρώματος επιβάλλει μεταγγίσεις των νέων οίνων κατά τους πρώτους μήνες μετά την οινοποίηση.

Όταν οι οίνοι παραμένουν προς ωρίμανση και παλαίωση σε βαρέλια, με μικρή περιεκτικότητα σε θειώδη ανυδρίτη, πραγματοποιούνται συμπυκνώσεις

σε ακόμα μεγαλύτερο βαθμό, οπότε οι ιδιότητες των ενώσεων T-A μεταβάλλονται και πλησιάζουν αυτές των συμπυκνωμένων ταννινών. Οι πρώτες αποκαλούνται συμπυκνωμένες ανθοκυάνες T-A και οι δεύτερες πολυμερισμένες (ΑΠ) (Κουράκου, Σ., 1998).

Κατά τη διάρκεια της παλαίωσης είναι καθοριστικές οι αλλαγές που γίνονται στο χρώμα των οίνων. Οι αντιδράσεις με την ακεταλδεϋδη θα πρέπει να διευκολυνθούν και αυτό μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους. Καταρχήν με τη χρήση δρύινων βαρελιών, που επιτρέπουν τη διείσδυση του οξυγόνου και έτσι ο οίνος οξειδώνεται, ενώ παράλληλα απελευθερώνονται ελλαγιταννίνες που δρουν σαν συμπαραγόντες οξείδωσης. Ένας ακόμα τρόπος είναι η μικροοξυγόνωση και ο τελευταίος η ανάδευση με αερισμό που γίνεται όταν η παλαίωση πραγματοποιείται σε δεξαμενή.

Είναι σημαντικό να επισημάνουμε πως 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 γλυοξυλικού οξέος και κίτρινων ξανθυλίων. Το τελικό αποτέλεσμα εξαρτάται από τις σχετικές ποσότητες των ανθοκυανών και των ταννινών του οίνου.

Μια αξιοσημείωτη αύξηση της έντασης του χρώματος παρατηρήθηκε σε ισορροπημένους οίνους που παλαίωσαν με το σωστό τρόπο, πρόκειται μετατροπή του χρώματος σε εντονότερο και πιο βαθύ. Οι άμεσες αντιδράσεις $T \rightarrow A$ συμβαίνουν όταν η παλαίωση γίνεται σε αεριζόμενες δεξαμενές, όταν διασφαλίζεται ο ήπιος αερισμός που οδηγεί σε περιορισμένη οξυγόνωση. Τότε οι αντιδράσεις αυτές είναι πολύ αργές, εκτός και αν η θερμοκρασία είναι σχετικά υψηλή ($> 20^{\circ}\text{C}$). Το χρώμα αυξάνεται λίγο και είναι πιθανή η δημιουργία κίτρινης χροιάς κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού. Ο οίνος μπορεί επίσης να πάρει κίτρινες αποχρώσεις και στο βαρέλι, όταν η θερμοκρασία υπερβαίνει τους 20°C . Η αντίδραση αυτή περιλαμβάνει τη θερμική υποβάθμιση της μαλβιδίνης που ευνοεί την παραγωγή κόκκινων χρωστικών.

Κατά τη διάρκεια της παλαίωσης σε φιάλη, η οποία χαρακτηρίζεται από πλήρη έλλειψη οξυγόνου, το χρώμα εξελίσσεται πολύ γρήγορα σε κεραμιδί και πορτοκαλί, εξαιτίας του δεύτερου τύπου αντιδράσεων. Αυτή η τροπή εξαρτάται κυρίως από την περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά.

Το χρώμα του εμφιαλωμένου οίνου που έχει πολλές ταννίνες γιγάρτων είναι πιθανό να εξελιχθεί γρήγορα, καθώς τα μόρια αυτά είναι πολύ δραστικά. Οι έγχρωμες ενώσεις θα πρέπει να σταθεροποιηθούν με οξειδωτικούς μηχανισμούς κατά την παλαίωση, προκειμένου να μην έχουμε απώλεια χρώματος. Πάντως, η εξέλιξη του χρώματος είναι πιο αργή σε οίνους με υψηλή συγκέντρωση με σχετικά λίγο δραστικές ταννίνες φλοιών, όπως συμβαίνει συνήθως στην περίπτωση του Cabernet Sauvignon. Μια δημιουργία κίτρινης απόχρωσης μπορεί να παρατηρηθεί, εάν η θερμοκρασία είναι πολύ υψηλή. Επιπλέον, τέτοιοι οίνοι είναι επιρρεπείς στη δημιουργία έγχρωμων κολλοειδών που καθιζάνουν.

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 οίνου 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 (Ribèreau-Gayon, P. et al., 2006, Gonzalez-Paramas, A. M. et al., 2006).

Μετά από μεγάλο αριθμό μελετών που έγιναν για να διαπιστωθεί η εξέλιξη του χρώματος των οίνων κατά τη διάρκεια συντήρησης και παλαίωσής τους, διαπιστώθηκαν τα ακόλουθα. Οι ελεύθερες ανθοκυάνες διαδραματίζουν μικρό ρόλο στη διαμόρφωση του χρώματος των νέων οίνων, αφού μόνο το 30-40% του χρώματός τους οφείλεται σε αυτές. Αυτό εξηγείται λαμβάνοντας υπόψη πως απουσία θειώδη ανυδρίτη, μόνο το 25% των ελεύθερων ανθοκυανών απαντά σε pH 3,2 υπό την έγχρωμη μορφή του φλαβυλίου και ότι το ποσοστό αυτό μειώνεται σε 12% στις περιπτώσεις οίνων με pH 3,8. Τα ποσοστά αυτά μειώνονται ακόμα παραπάνω παρουσία θειώδη ανυδρίτη. Για το λόγο αυτό, σε συνδυασμό με την παρεμπόδιση του σχηματισμού συμπλόκων T-A, επιβάλλεται πολύ μικρή προσθήκη θειώδη ανιδρύτη στους ερυθρούς οίνους υψηλής ποιότητας. Σχετικά με την αντοχή των T-A στο χρόνο, ένα μέρος τους πολυμερίζεται, οπότε αυξάνεται το ποσοστό των ΑΠ, ενώ νέες ενώσεις T-A σχηματίζονται με μικρό ρυθμό, σε βάρος των ελεύθερων ανθοκυανών (Κουράκου, Σ., 1998).

Ενώ οι νέοι ερυθροί οίνοι χρωματίζονται από ελεύθερες ανθοκυάνες, ενώσεις T-A λιγότερο ή περισσότερο συμπυκνωμένες και ταννίνες συμπυκνωμένες, οι παλιοί οίνοι δεν περιέχουν πια ελεύθερες ανθοκυάνες, ένα μέρος τους αποδομήθηκε και ένα άλλο ενώθηκε με ταννίνες που έχουν και αυτές οξειδωθεί. 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 αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου, ανάλογα με τις συνθήκες αποθήκευσης. Αυτά τα έγχρωμα πολυμερή δίνουν διάφορες αποχρώσεις, κίτρινο, κιτρινοκόκκινο, κιτρινοκαφέ, κόκκινο και βιολετί, ανάλογα με τη φύση τους (Πίνακας 7). Επειδή τα περισσότερα πολυμερή έχουν κίτρινες, πορτοκαλί ή καφέ αποχρώσεις, ο οίνος σταδιακά αποκτάει έναν κεραμιδί χρωματισμό, που είναι πιο έντονος, όσο επικρατεί το κίτρινο χρώμα των ταννινών, που εντείνεται, όσο εντείνεται ο βαθμός πολυμερισμού τους.

Η ένταση του χρώματος, με την πάροδο του χρόνου μειώνεται. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην αποδόμηση των ελεύθερων ανθοκυανών, στις επιπρόσθετες δομικές αλλαγές που τροποποιούν την απόχρωση των πολυμερών ανθοκυανών-ταννινών και στο σχηματισμό και την καθίζηση των έγχρωμων πολυμερών. Εξαιτίας του γεγονότος ότι οι ανθοκυάνες ενώνονται κυρίως με δεσμούς C4-C8 στα τελικά ταννικά άκρα των φλαβονοειδών ενώσεων, τα πολυμερή ανθοκυανών-ταννινών γενικά δεν μεγαλώνουν όσο τα πολυμερή μεταξύ ταννινών. Έτσι, η καθίζηση των έγχρωμων πολυμερών συνήθως απαιτεί συμπλοκοποίηση με διαλυτές πρωτεΐνες του οίνου (Κουράκου, Σ., 1998, Jackson, R. S., 2008).

Όνομα	Χρώμα	Μοριακό βάρος
A+ (ανθοκυάνη)	Κόκκινο	500
AOH	Άχρωμο	500
AO	Βιολετί	500
AHSO3	Άχρωμο	500

P (προκυανιδίνη)	Άχρωμο	600
T (ταννίνη)	Κίτρινο	1000-2000
T-A+	Κόκκινο	1000-2000
T-AOH	Άχρωμο	1000-2000
T-AO	Βιολετί	1000-2000
T- AHSO ₃	Άχρωμο	1000-2000
TC (συμπ. ταννίνη)	Κιτρινοκόκκινο	2000-3000
TtC(συμπ.ταννίνη με πολυσακχαρίτες,+ φλαβύλιο,OH, καρβινόλη,Ο, βάση κινόνης)	Κιτρινοκαφέ	3000-5000
TP	Κίτρινο	5000

Πίνακας 7 : Χρώμα και μοριακά βάρη των σημαντικότερων φαινολών του οίνου.

Ακόμα θα πρέπει να σημειωθεί πως το ποσοστό του πολυμερισμού θεωρείται δείκτης της χημικής ηλικίας του οίνου. Ο χαρακτηρισμός «χημικής» δικαιολογείται γιατί κάποιες φορές, σε νέους οίνους που είτε προέρχονται από ποικιλίες με μεγάλη τάση πολυμερισμού, είτε αποθηκεύτηκαν υπό ακατάλληλες συνθήκες, εμφανίζεται υψηλό ποσοστό πολυμερισμού, χωρίς να έχει ο οίνος τους οργανοληπτικούς χαρακτήρες του ώριμου και παλαιού οίνου. Σε τέτοια περίπτωση, το ποσοστό πολυμερισμού υποδηλώνει το πρόωρο γέραςμα, δηλαδή μεγάλη χημική ηλικία που δεν είναι συμβατή με την πραγματική ηλικία του οίνου.

Έτσι, για να έχουμε ένα νέο οίνο 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 ο οίνος σε συνθήκες που ευνοούν την ένωση ανθοκυανών και ταννινών, αλλά όχι τον έντονο και γρήγορο πολυμερισμό τους. Για αυτό επιβάλλεται παλαίωση σε ξύλινα βαρέλια, απουσία ηλιακού φωτός και χαμηλές θερμοκρασίες.

Εάν ο νέος οίνος δεν έχει επάρκεια ανθοκυανών ενωμένων με ταννίνες, το χρώμα του θα έχει την τάση να αποκτήσει γρήγορα καφεκίτρινες 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 οίνων, και των ερυθρών οίνων πρώιμης κατανάλωσης, όταν έχουν παρασκευαστεί με τη μέθοδο της ανθρακικής αναεροβίωσης (Κουράκου, Σ., 1998, Spranger, M. I. et al., 2004).

1.3.5 Σταθερότητα του χρώματος

1.3.5.1 Καθίζηση των έγχρωμων ενώσεων σε νέους οίνους

Εάν ένας νέος οίνος 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 οίνου. 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 συμπεριφορά των φαινολικών συστατικών σχετίζεται με την κολλοειδή τους κατάσταση, σύμφωνα με διαπίστωση του Ribéreau-Gayon. Είναι δυνατό να αποφευχθεί η κατακρήμνιση με τη διάλυση στον οίνο αναγεννημένης κυτταρίνης (σελοφάν). Συγκεκριμένα, ο Ribéreau-Gayon το 1976 αναφέρει πως η φυσικοχημική μεταβολή που συμβαίνει στον οίνο κατά την παλαίωση σε βαρέλι και σε φιάλη έγκειται στο σχηματισμό αυτής της κολλοειδούς χρωστικής ουσίας, κυρίως κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού και στην κατακρήμνισή της κατά τη διάρκεια του χειμώνα.

Το χαρακτηριστικό αυτό το έχουν όλοι οι οίνοι, ορισμένοι από αυτούς σε μεγαλύτερο βαθμό, ειδικά όταν οι οινοποιητικές μέθοδοι προάγουν την έντονη εκχύλιση. Οι οίνοι έχουν επίσης περισσότερες κολλοειδείς 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 κολλοειδή είναι σχετικά ασταθή, ανάλογα με το μέγεθος του μορίου τους. Σχηματίζουν μια κολλοειδή βάση για τις χρωστικές ουσίες και χρωματίζονται από τα φαινολικά συστατικά κατά την κατακρήμνιση. Ο βαθμός κατακρήμνισης επίσης εξαρτάται από την

περιεκτικότητα του οίνου σε αλκοόλ και τη θερμοκρασία αποθήκευσης.

Τα αποτελέσματα σχετικής έρευνας παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 8), όπου φαίνεται η υψηλή καθίζηση των φαινολικών συστατικών (OD 280) ενός οίνου που παράχθηκε σε αναδευόμενη δεξαμενή, σε σχέση με τον οίνο αναφοράς. Επιπλέον, μετά από 12 μήνες η διαφορά μεταξύ των δύο οίνων εξακολουθεί να είναι έντονη. Ο δείκτης ζελατίνης (δείκτης συτυπικότητας-ταννίνες που ενώνονται με πρωτεΐνες) είναι αυξημένος στο δείγμα της αναδευόμενης δεξαμενής, κάτι το οποίο φανερώνει πως οι ταννίνες που καθιζάνουν είναι λιγότερο δραστικές με τις πρωτεΐνες και συνεπώς λιγότερο επιθετικές. Η καθίζηση είναι περιορισμένη στον οίνο αναφοράς, όπως και η αλλαγή στη δομή, φανερώνοντας μαλάκωμα των ταννινών (μείωση του δείκτη ζελατίνης).

	OD 280	TANNINES (g/L)	ΑΝΘΟΚΥΑΝΕΣ (mg/L)	ΠΟΛΥΣΑΚΧ. (mg/L)	Δ.ΖΕΛΑΤΙΝΗΣ
A					
t=0	56	2.9	600	650	50
t=12 μήνες	55	3.0	400	500	48
ΑΔ					
t=0	65	3.5	900	950	55
t=12 μήνες	52	2.7	550	620	60

A= οίνος αναφοράς, ΑΔ= οίνος αναδευόμενης δεξαμενής

Πίνακας 8 :Επίδραση της οινοποιητικής μεθόδου στο φαινολικό περιεχόμενο διαφορετικών οίνων κατά την παλαίωση (Merlot 1985).

Οι οίνοι δεν σταθεροποιούνται απαραίτητα την πρώτη χρονιά. Εάν υψηλές θερμοκρασίες προάγουν τον συνδυασμό ταννινών με πολυσακχαρίτες και υπάρχουν ακόμα αρκετά κολλοειδή μόρια στο μέσο, πρόκειται να σχηματιστεί περισσότερη κολλοειδής χρωστική. Για να αποφύγουμε την επαναλαμβανόμενη

καθίζηση μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε προστατευτικά κολλοειδή και να εξαλείψουμε όλα τα κολλοειδή με διαύγαση. Τα προστατευτικά κολλοειδή, όπως το αραβικό κόμμι και οι μαννοπρωτεΐνες προλαμβάνουν τη συσσωμάτωση των ασταθών κολλοειδών, διατηρώντας τα μόρια σε αιώρηση, παρά εξαλείφοντάς τα.

Ο μπεντονίτης έχει αρνητικό φορτίο το οποίο ακινητοποιεί τα θετικά φορτισμένα ασταθή κολλοειδή και τα ωθεί προς τα κάτω. Πρόκειται για πολύ αποτελεσματική μέθοδο, αλλά το πρόβλημα είναι διαφορετικό στην περίπτωση των διαυγαστικών παραγόντων που βασίζονται στις πρωτεΐνες. Μερικά από αυτά τα κολλοειδή ωθούνται προς τα κάτω από τα σύμπλοκα των ταννινών με τις πρωτεΐνες, ενώ τα υπόλοιπα σταθεροποιούνται από τις υπολειμματικές πρωτεΐνες, οι οποίες επίσης αποτελούν μέρος της κολλοειδούς δομής του οίνου (Ribéreau-Gayon, P. et al., 2006).

1.3.5.2 Καθίζηση των έγχρωμων ενώσεων σε παλαιωμένους οίνους

Μια μακρά περίοδος παλαίωσης σε φιάλη περιλαμβάνει διάφορες αντιδράσεις οι οποίες συνεχίζονται μέχρι την ολοκλήρωση της εξέλιξης του οίνου. 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 κολλοειδή παρατίθενται σε στοιβάδες, οι οποίες περιβάλλουν τα πλευρικά τοιχώματα των φιαλών. Δοκιμές διαλυτοποίησης των μορίων αυτών έδειξαν πως είναι πολύ διαφορετικά από τις κολλοειδείς χρωστικές, καθώς το φορμικό οξύ σε ανάμιξη με τη μεθανόλη είναι ο μόνος ικανός συνδυασμός για να διαλυθεί ένα μικρό τμήμα των αποθέσεων αυτών. Εκτός από τις ταννίνες και τις ανθοκυάνες, κάλιο και σίδηρος είναι παρόντα, όπως και νιτρικά, και σε ορισμένες περιπτώσεις μικρές ποσότητες πολυσακχαριτών.

Υπό παρόμοιες συνθήκες θερμοκρασίας, αυτές οι καθιζήσεις εξελίσσονται με διάφορες ταχύτητες στους διάφορους οίνους. Οι οίνοι εξαιρετικής ποιότητας εξελίσσονται πιο αργά από τους μέτριους οίνους, ακόμα και αυτοί που έχουν παρόμοιο φαινολικό περιεχόμενο. Στην πρώτη περίπτωση, η κατακρήμνιση

πραγματοποιείται μετά από περίπου είκοσι χρόνια, ενώ στη δεύτερη μπορεί να συμβεί μετά από την παραμονή λίγων ετών στη φιάλη. Η συγκεκριμένη φαινολική σύσταση των εξαιρετικών οίνων εξακολουθεί να επηρεάζει το χαρακτήρα τους και την εξέλιξή τους κατά την διαδικασία της παλαίωσης (Ribèreau-Gayon, P. et al., 2006).

1.3.6 Αντιδράσεις κατά την παλαίωση σε βαρέλι και σε φιάλη

Κατά την παλαίωση χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή σε παράγοντες όπως η οξείδωση, η θερμοκρασία, ο χρόνος και η διαύγαση.

Η οξείδωση προάγεται με τον αερισμό του οίνου, ο οποίος πραγματοποιείται κατά την παλαίωση σε βαρέλι, την ανάδευση και την ελεγχόμενη εισαγωγή οξυγόνου. Άλλος παράγοντας που βοηθά στην οξυγόνωση είναι η παρουσία καταλυτών από το ξύλο, των ελλαγιταννινών. Η οξείδωση είναι επιθυμητή αφού ενισχύει και σταθεροποιεί το χρώμα, ενώ μαλακώνει τη γεύση, θα πρέπει όμως να γίνεται ελεγχόμενα, διαφορετικά μπορεί να προκαλέσει μη αντιστρέψιμη υποβάθμιση του οίνου. Μια υπερβολική οξυγόνωση μπορεί να οδηγήσει είτε σε οξειδωτική διάσπαση των ανθοκυανών, είτε σε μερική σταθεροποίηση των ανθοκυανών με το σχηματισμό μωβ συμπλόκων με αιθυλικούς σταυροδεσμούς, είτε σε παραγωγή πορτοκαλόχρωμων συστατικών με προσθήκη ακεταλδεϋδης, είτε τέλος, σε οξείδωση του τρυγικού οξέος προς σχηματισμό κίτρινου ξανθουλίου. Οι αντιδράσεις που συμβαίνουν εξαρτώνται από τις σχετικές συγκεντρώσεις των ταννινών και των ανθοκυανών, αλλά και από το είδος των ταννινών.

Η θερμοκρασία είναι επίσης σημαντικός παράγοντας. Χαμηλές θερμοκρασίες οδηγούν στην καθίζηση των ασταθών κολλοειδών. Αντίθετα, θερμοκρασίες πάνω από τους 20 °C προάγουν τον σχηματισμό καρβοκατιόντων από τις προκυανιδίνες, οπότε και το σχηματισμό συμπλόκων TA, με χρώμα κόκκινο και πορτοκαλί, όπως και ο ομοιογενής πολυμερισμός. Ακόμα, οι υψηλές θερμοκρασίες διευκολύνουν το συνδυασμό με πολυσακχαρίτες, αλλά και τις αντιδράσεις διάσπασης του χρώματος. Επιπλέον, προάγεται η θερμική υποβάθμιση ορισμένων ανθοκυανών, κυρίως της μαλβιδίνης. Η μεταβολή μιας χαμηλής θερμοκρασίας σε θερμοκρασία γύρω στους 20 °C βοηθάει στην εξέλιξη του οίνου, εάν διατηρηθεί σε ορισμένα όρια.

Η διάρκεια της παλαίωσης σε βαρέλι που απαιτείται για να παραχθεί οίνος με την επιθυμητή ποιότητα εξαρτάται από τον τύπο του οίνου και τις απαραίτητες τροποποιήσεις που γίνονται. Ένας οίνος με ισορροπημένη ταννική δομή, που έχει ήδη διαμορφωθεί σωστά, είναι πιθανό να «στεγνώσει» σε περίπτωση παρατεταμένης παλαίωσης. Αντίθετα, ένας οίνος με υψηλή συγκέντρωση φαινολικών συστατικών απαιτεί πιο μακροχρόνια παλαίωση προκειμένου να μαλακώσουν οι ταννίνες.

Σε πολλά ευρωπαϊκά οινοποιεία, όπου εκχυλίζονται μεγάλες ποσότητες ταννινών κατά την οινοποίηση, οι οίνοι είναι θολοί, αδιαύγαστοι και επιθετικοί, οπότε απαιτείται πολυετής παλαίωση προκειμένου να γίνει διαύγαση. Αυτή είναι η μόνη περίπτωση όπου η καθίζηση των πολυμερισμένων ταννινών κάνει τον οίνο πιο μαλακό.

Κατά τη διάρκεια της παλαίωσης σε αεροστεγή φιάλη, ο οίνος αποτελεί υπόστρωμα ελαφράς οξειδωσης. Στην περίπτωση αυτή επηρεάζεται κυρίως από αντιδράσεις μετατροπής που είναι ανεξάρτητες από το οξυγόνο. Πρόκειται για αντιδράσεις που αφορούν καρβοκατιόντα που σχηματίστηκαν από προκυανιδίνες, συμπύκνωση ανθοκυανών και πολυμερισμό ομοιογενών ταννινών. Θερμοκρασίες που είναι σχετικά υψηλές προάγουν αυτές τις αντιδράσεις και επιταχύνουν την παλαίωση.

Σχετικά με τις αλλαγές του χρώματος είναι σημαντικό πως τα μωβ σύμπλοκα που σχηματίστηκαν με αιθυλοδεσμούς μετατρέπονται σε πορτοκαλί πυρανο-βινυλοπροκυανιδίνες. Η παρουσία των πολυσακχαριτών παρεμποδίζει την εξέλιξη της αντίδρασης, η οποία εξαρτάται από τη θερμοκρασία. Έτσι εξηγείται η διαφορά μεταξύ οίνων εξαιρετικής ποιότητας, οι οποίοι παραμένουν κόκκινοι για πολλά χρόνια και οίνων μέτριας ποιότητας, οι οποίοι γρήγορα αποκτούν μια κίτρινη χροιά, όπως οι οίνοι που έχουν κορεστεί από οξυγόνο κατά τη διάρκεια της οινοποίησης.

Μερικά χρόνια μετά την εμφιάλωση (1 έως 3), παρατηρείται μια αλλαγή στη γεύση σε ορισμένους οίνους, ιδιαίτερα στον ταννικό χαρακτήρα τους. Οι οίνοι αυτοί φαίνονται παροδικά αδύναμοι, με λιγότερο σώμα, παρά το ότι το χρώμα τους παραμένει έντονο και όχι ιδιαίτερα εξελιγμένο. Αναλύσεις έχουν δείξει πως υπάρχει μια αναδιάταξη στη δομή των ταννινών, σε μη οξειδωτικό μέσο, η οποία οδηγεί σε αποπολυμερισμό, κάτι που διαπιστώνεται με αλλαγές

στο αποτέλεσμα της μέτρησης των ταννινών και μείωση του δείκτη υδροχλωρίου που δείχνει τον βαθμό πολυμερισμού. Κάποια μέρη των ετερογενών πολυμερών ενδέχεται να καταστραφούν, πριν την πραγματοποίηση του ακόλουθου ομοιογενούς πολυμερισμού. Αυτό είναι χαρακτηριστικό των οίνων υψηλής ποιότητας, στους οποίους σχηματίζεται μια μεγάλη ποικιλία ταννινών κατά την παλαίωση. Οι αντιδράσεις αυτές επιβραδύνουν την εξέλιξη του οίνου και του προσδίδουν μια πολυπλοκότητα, όσον αφορά τη γεύση και το άρωμα. Αυτή η πολύπλοκη χημεία των ταννινών δεν πραγματοποιείται κατά την εξέλιξη των μέτριων οίνων, οι οποίοι διαμορφώνουν συνεχώς και με μεγάλο ρυθμό έναν ώριμο χαρακτήρα (Ribéreau- Gayon, P. et al., 2006, Matejicec, J. et al., 2005, Makris, D. et al., 2006(a), Kallithraka, S. et al., 2009).

1.4 Χρώμα στους λευκούς οίνους

Σε αντίθεση με τους ερυθρούς οίνους, πολύ λίγα είναι γνωστά σε σχέση με τη φύση του χρώματος των λευκών οίνων. Στους ξηρούς λευκούς οίνους η συνολική περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά κυμαίνεται από 50 μέχρι 250 mg/L, δηλαδή λιγότερο από το 10% της αντίστοιχης τιμής στους ερυθρούς οίνους. Οι τιμές αυτές είναι ακόμα μικρότερες όταν πρόκειται για γλυκούς λευκούς οίνους που έχουν παραχθεί από ευγενή σήψη, ενώ στην περίπτωση των γλυκών λευκών οίνων από σταφύλια που συμπυκνώθηκαν με ξήρανση, το ποσό των φαινολικών συστατικών μοιάζει με αυτό των ερυθρών οίνων (Ribéreau- Gayon, P. et al., 2006).

Από τη μικρή ποσότητα των φαινολικών ενώσεων που υπάρχουν στους λευκούς οίνους, οι περισσότερες είναι άμεσα διαλυτές μη φλαβονοειδείς ενώσεις (υδροξυκινναμωμικές), όπως είναι το καφταρικό οξύ και τα σχετικά παράγωγα, το π-κουμαρικό οξύ και το φερουλικό οξύ. Η επεξεργασία του χυμού με πηκτινολυτικά ένζυμα βοηθάει την υδρόλυση του καφταρικού οξέος στα συστατικά του, το καφεϊκό και το τρυγικό οξύ. Μετά το σπάσιμο των ραγών, το καφταρικό οξύ και οι σχετικές διφαινόλες, οξειδώνονται γρήγορα, παρουσία της πολυφαινολοξειδάσης του σταφυλίου και του οξυγόνου. Οι ενώσεις αυτές και τα οξειδωμένα παράγωγά τους μπορούν να αντιδράσουν με τριπεπτίδια γλουταθειόνης και να σχηματίσουν άχρωμα S-γλουταθειονυλικά σύμπλοκα, τα οποία συνήθως συνδυάζονται με άλλα συστατικά και καθιζάνουν. Σε περίπτωση

που δεν ακολουθήσει και άλλη οξείδωση, από τη λακκάση, τα άχρωμα σύμπλοκα γλουταθειόνης-υδροξυκινναμωμικού οξέος δεν πολυμερίζονται ούτε σχηματίζουν καφέ χρώμα. Συνεπώς η προστασία του γλεύκους από το οξυγόνο κατά το σπάσιμο των ραγών, ή η προσθήκη διοξειδίου του θείου για αδρανοποίηση των πολυφαινολοξειδασών, μάλλον δεν απαιτούνται. Αυτό συμβαίνει γιατί περιορίζοντας ή αποτρέποντας το σχηματισμό συμπλόκων γλουταθειόνης με υδροξυκινναμωμικό οξύ, διευκολύνεται η επακόλουθη καστάνωση του οίνου.

Το περιεχόμενο των σταφυλιών σε γλουταθειόνη αυξάνεται αισθητά κατά την ωρίμανση. Καλλιέργειες με υψηλά ποσά υδροξυκινναμωμικού οξέος και χαμηλή συγκέντρωση σε γλουταθειόνη, παρουσιάζουν αυξημένες πιθανότητες για καστάνωση (Jackson, R. S., 2008, Makris, D. et al., 2002, Ramos, R. et al., 1999, Sioumis, N. et al., 2006).

Η τυροσόλη (π-υδροξυφαινυλαιθυλαλκοόλη) είναι η κύρια φαινολική ουσία που απαντάται σε διάφορα είδη λευκών οίνων. 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.

Εκτός από τις φαινολικές ενώσεις υπάρχουν και μη φαινολικές, σε όλα τα είδη των οίνων. Πρόκειται για διάφορες ενώσεις, κυρίως πολυσακχαρίτες και πρωτεΐνες. Στο μη φαινολικό αυτό τμήμα των ενώσεων αποδίδεται το 50% της απορρόφησης της υπεριώδους ακτινοβολίας των ξηρών ερυθρών οίνων. Συνεπώς, είναι μεγάλη η επίδραση που ασκείται στην οπτική πυκνότητα στα 280 nm, οπότε η τιμή αυτή δεν μπορεί να εκφράσει μόνο τη φαινολική σύσταση των οίνων αυτών. Στους γλυκούς λευκούς οίνους το τμήμα των μη φαινολικών ενώσεων περιλαμβάνει υψηλή συγκέντρωση αζωτούχων ενώσεων, στις οποίες αποδίδεται το 50% της απορρόφησης στα 250 nm (Ribéreau-Gayon, P. et al., 2006).

Επειδή οι φλαβονόλες και άλλες φλαβονοειδείς φαινόλες εκχυλίζονται σχετικά αργά, απαντώνται σε αξιόλογες ποσότητες μόνο σε οίνους που έχουν παραμείνει σε επαφή με τα στέμφυλα. Θεωρείται πως το κύριο μέρος του κίτρινου χρώματος των λευκών οίνων προέρχεται από περιορισμένη εκχύλιση

και οξειδωση φλαβονολών, όπως η κερκετίνη και η καμπφερόλη. Το περιεχόμενο σε φλαβανόλες αποτελείται κυρίως από κατεχίνες και πολυμερή γαλλοκατεχινών. Το ενδεχόμενο της επακόλουθης οξειδωτικής κασπάνωσης των λευκών οίνων σχετίζεται στενά με τις φλαβονοειδείς ενώσεις αλλά όχι με τις μη φλαβονοειδείς. Σε κάποιες περιπτώσεις το καφέ χρώμα μπορεί να αποδοθεί στο σχηματισμό έγχρωμων ξανθυλιοκατιόντων από τις κατεχίνες και το γλυοξυλικό οξύ (μέσω της οξειδωσης του τρυγικού οξέος) (Jackson, R. S., 2008). Σύμφωνα με σχετική έρευνα, μέσα σε ένα χρόνο, η μείωση στη συγκέντρωση των κατεχινών λευκών οίνων μπορεί να φτάσει το 35 με 50% (Hernanz, D. et al., 2008).

Επίσης οι μη φλαβονοειδείς ενώσεις και οι λιγνίνες που εκχυλίζονται από τα δρύινα βαρέλια κατά την ωρίμανση των οίνων, μπορούν να συμβάλλουν στο χρώμα των λευκών οίνων. Για παράδειγμα, κατά την οξειδωση, το καφεϊκό οξύ μπορεί να πολυμεριστεί σχηματίζοντας διμερείς και τριμερείς ενώσεις. Το βαθύ χρυσοκίτρινο χρώμα των παλαιότερων λευκών οίνων προέρχεται από την οξειδωση τέτοιων φαινολικών ενώσεων και πιθανώς από γαλακτουρονικό οξύ.

Οι χρυσωπές αποχρώσεις των γλυκών λευκών οίνων μπορεί να προέρχονται από τον σχηματισμό μελανοειδών συστατικών της αντίδρασης Maillard ή από καραμελοποίηση των σαιχαρών. Αυτή η διαδικασία συμβάλει στον καφετί χρωματισμό των οίνων που εκτίθενται σε θέρμανση, όπως είναι η Μαδέρα, τα baked sherries και το Vin santo. Άγνωστο όμως παραμένει το κατά πόσο έχουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη των παλαιωμένων, ξηρών, λευκών επιτραπέζιων οίνων (Jackson, R. S., 2008).

Από τις φαινολικές ενώσεις που υπάρχουν στους λευκούς οίνους, τα παράγωγα της κερκετίνης, καφεϊκό και π-κουμαρικό οξύ έχουν περισσότερο ή λιγότερο έντονο κίτρινο χρώμα. Το μέγιστο της απορρόφησης παρουσιάζεται μεταξύ των 310 και 350 nm. Οι ταννίνες από προκυανιδίνες είναι επίσης κίτρινες και το χρώμα τους ποικίλει ανάλογα με το επίπεδο της οξειδωσης. Η οξειδωση των ξηρών λευκών οίνων οδηγεί σε κασπάνωση, εξαιτίας των τροποποιήσεων των ταννινών και των ιδιαίτερα ευοξειδωτων παραγώγων του καφταρικού οξέος, καθώς και του ίδιου. Τα υπόλοιπα συστατικά είναι σχετικά ανεπηρέαστα από την οξειδωση.

Το ιδιαίτερα έντονο κίτρινο χρώμα των γλυκών λευκών οίνων είναι

διαφορετικό από αυτό των ξηρών, ακόμα και όταν είναι οξειδωμένοι. Η απορρόφηση είναι συνεχόμενη, με μέγιστο στα 270 nm. Η συμπύκνωση λόγω της εξάτμισης του νερού από τα σταφύλια που έχουν 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 οίνων συνεπώς σχετίζεται με την οξείδωση των φαινολικών συστατικών. Είναι αξιοσημείωτο πως οι συνέπειες από την ενζυματική 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, P. et al., 2006).

2 Άλλες ιδιότητες των φαινολικών ενώσεων

2.1 Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά

Οι ταννίνες έχουν μεγάλη επίδραση στη γεύση και στην αίσθηση που δημιουργεί ο οίνος στο στόμα. Αντίθετα οι ανθοκυάνες, αν και βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες στους ερυθρούς οίνους, έχουν ελάχιστη άμεση συνεισφορά στη γεύση του οίνου. Παρόλα αυτά, ο πολυμερισμός τους με τις ταννίνες επηρεάζει σημαντικά τη διαλυτότητα των ταννινών (Jackson, R. S., 2008). Ο συνδυασμός των ανθοκυανών με ταννίνες δημιουργεί την αίσθηση της πικράδας, κυρίως σε νέους οίνους, όπου οι μοριακές δομές είναι σαφώς σχηματισμένες, αλλά όχι υπερβολικά πολύπλοκες (Ribèreau-Gayon, P. et al., 2006).

Οι κατεχίνες και τα πολυμερή τους, οι προκυανιδίνες και οι συμπυκνωμένες ταννίνες είναι τα πιο σημαντικά συστατικά του οίνου όσον αφορά τα γευστικά χαρακτηριστικά. Αποτελούν την κύρια πηγή της πικρής και στυφής αίσθησης. Οι μονομερείς κατεχίνες έχουν την κύρια συνεισφορά σε πικράδα (Jackson, R. S., 2008). Οι κατεχίνες και οι προκυανιδίνες με μέτριο βαθμό πολυμερισμού (διμερή, τριμερή) είναι πολύ λίγο δραστικές με τις πρωτεΐνες, κυριαρχεί η γεύση του ξινού (Ribèreau-Gayon, P. et al., 2006).

Αντίθετα, πολλές συμπυκνωμένες ταννίνες δημιουργούν αισθήσεις όπως τραχύτητα και ξηρότητα. Το γαλλικό οξύ που συνήθως υπάρχει στις ταννίνες των γιγάρτων δημιουργεί την εντύπωση μιας επιθετικότητας και ξηρότητας που διαφέρει από την επίδραση που έχουν οι ταννίνες των φλοιών.

Οι ταννίνες συνδέονται με τις πρωτεΐνες μέσω δεσμών υδρογόνου που δημιουργούνται μεταξύ υδροξυλομάδων και πεπτιδίων, ή μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Η υψηλή περιεκτικότητα σε προλίνη και η ανοιχτή επιμήκης δομή των πρωτεϊνών του σάλιου είναι αυτά που βοηθάνε την αντίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών και των ταννινών. Οι μεγάλες συμπυκνωμένες ταννίνες δεν επιδρούν πολύ στη γεύση. Αυτό συμβαίνει γιατί είναι πολύ συμπαγείς για να αντιδράσουν με τους υποδοχείς της γεύσης της γλώσσας και για να προκαλέσουν την καθίζηση των πρωτεϊνών του σάλιου (Jackson, R. S., 2008). Ο βαθμός πολυμερισμού των προκυανιδινών είναι καθοριστικός ως προς την ικανότητα αντίδρασης με πρωτεΐνες. Η στυπτικότητα αυξάνεται όσο ο πολυμερισμός εντείνεται, μέχρι τη δημιουργία επταμερών, μετά από το σημείο αυτό μειώνεται, καθώς τα μόρια γίνονται υπερβολικά μεγάλα. Η μέγιστη πικράδα παρατηρείται στις τετραμερείς προκυανιδίνες. Σημαντική είναι και η παρουσία των πολυσακχαριτών, αφού ο συνδυασμός τους με τις ταννίνες δημιουργεί ευχάριστη αίσθηση πληρότητας και στρογγυλότητας.

Οι ταννίνες που εκχυλίζονται από τους φλοιούς αντιδρούν λιγότερο με τις πρωτεΐνες, συγκριτικά με τις ταννίνες των γιγάρτων και των βοστρύχων. Μάλιστα, οι προκυανιδίνες των βοστρύχων μπορούν να πολυμεριστούν σε διάφορους βαθμούς, ανάλογα με την ωριμότητα των σταφυλιών. Οι βόστρυχοι δεν περιέχουν καθόλου ελεύθερες ανθοκυάνες ή σύμπλοκα ταννινών με πολυσακχαρίτες ή πρωτεΐνες που προκαλούν το μαλάκωμα των ταννινών των φλοιών. Η ταννική ισορροπία ενός νεαρού οίνου εξαρτάται από την ισορροπία μεταξύ των ταννινών των φλοιών και των βοστρύχων. Οι ταννίνες των γιγάρτων δίνουν την αίσθηση του σώματος, ενώ οι ταννίνες των φλοιών ενισχύουν τη στρογγυλότητα, τη λιπαρότητα, την πληρότητα και το χρώμα. Βέβαια, υπάρχει ο κίνδυνος να δημιουργηθεί υπερβολική στυπτικότητα σε περίπτωση που οι ταννίνες των γιγάρτων επικρατήσουν, ενώ η πικράδα και η χορτώδης οσμή είναι τυπικά γνωρίσματα της υπερβολικής εκχύλισης ταννινών από τους φλοιούς, ιδιαίτερα εάν τα σταφύλια δεν έχουν ωριμάσει

ικανοποιητικά.

Εάν παρακολουθήσουμε την εξέλιξη των ταννινών, παρατηρούμε πως η συγκέντρωσή τους μειώνεται ή διαφοροποιείται λίγο, κατά την παλαίωση σε βαρέλι, και μετά αυξάνεται κατά την παραμονή στη φιάλη. Ταυτόχρονα ο δείκτης υδροχλωρίου, που αντικατοπτρίζει την ικανότητα των ταννινών να πολυμερίζονται και φανερώνει την ικανότητα παλαίωσης του οίνου, και ο δείκτης ζελατίνης που δείχνει την ικανότητά τους να αντιδρούν με πρωτεΐνες, διαφοροποιούνται πολύ έντονα, επιβεβαιώνοντας την πραγματοποίηση πολλών δομικών αλλαγών.

Καταρχήν γίνονται αντιδράσεις πολυμερισμού που οδηγούν στο σχηματισμό ομοιογενών πολυμερών, όπως ο πολυμερισμός των προκυανιδινών με δεσμούς C4-C8 ή C4-C6 που γίνεται στον οίνο, αφού αποτελεί όξινο περιβάλλον. Οι αντιδράσεις αυτές προάγονται από υψηλές θερμοκρασίες, αλλά είναι ανεξάρτητες από τα επίπεδα του οξυγόνου.

Πολλές είναι και οι αντιδράσεις που συμβαίνουν παρουσία οξυγόνου. Πρόκειται για δεσμούς μεταξύ προκυανιδινών με την παρεμβολή ακεταλδεϋδης και πιθανώς, δεσμούς μεταξύ δομών κινόνης. Τα μόρια που προκύπτουν έχουν πολύ συμπαγείς δομές και οι ιδιότητές τους διαφέρουν κατά πολύ από αυτές των προκυανιδινών, ειδικά η σταθερότητά τους και η ικανότητά τους να αντιδρούν με πρωτεΐνες.

Ο πολυμερισμός περιορίζεται από την καθίζηση των συστατικών που έχουν γίνει πάρα πολύ συμπαγή, υδρόφοβα και αδιάλυτα. Έτσι ο οίνος εξελίσσεται. Η καθίζηση των πολυμερισμένων ταννινών δεν συνοδεύεται πάντα από μείωση της στυπτικότητας του οίνου, αλλά συχνά δίνει μια αίσθηση λεπτότητας.

Εκτός από τις αντιδράσεις πολυμερισμού γίνονται και αντιδράσεις συμπύκνωσης που περιλαμβάνουν και άλλα μόρια, όπως ανθοκυάνες, πολυσακχαρίτες και πρωτεΐνες. Οι συνδυασμοί με τις ανθοκυάνες αυξάνουν και σταθεροποιούν το χρώμα. Οι αντιδράσεις με τους πολυσακχαρίτες και τις πρωτεΐνες εξαρτώνται από τον τύπο του πολυμερούς και επηρεάζονται από τη θερμοκρασία. Διάφορα είδη πολυσακχαριτών, από τα σταφύλια, τις ζύμες και τους μύκητες, είναι πιθανό να υπάρχουν στον οίνο. Πρόκειται είτε για ουδέτερους πολυσακχαρίτες (γλυκάνη, δεξτράνη, μαννάνη, κυτταρίνη), είτε για

όξινους πολυσακχαρίτες (πηκτίνες), είτε για γλυκοπρωτεΐνες (μαννοπρωτεΐνες). Οι ερυθροί οίνοι είναι επίσης πιθανό να περιέχουν πρωτεΐνες από τους παράγοντες διαύγασης που προστίθενται κατά την παλαίωση στο βαρέλι. Είναι προφανές πως οι ταννίνες που είναι συνδεδεμένες με πολυσακχαρίτες και πολυπεπτίδια, αντιδρούν λιγότερο με τις πρωτεΐνες, κυρίως αυτές που βρίσκονται στο σάλιο.

Αυτές οι μετατροπές έχουν μεγάλη επίδραση στη γεύση. Ο οργανωμένος πολυμερισμός παράγει πολυμερισμένες προκυανιδίνες που είναι πολύ δραστικές με τις πρωτεΐνες, και έτσι έχουν ιδιαίτερα έντονο ταννικό χαρακτήρα. Αντίθετα, όταν ο πολυμερισμός έχει γίνει με την παρεμβολή ακεταλδεϋδης, η γεύση μαλακώνει. Παρά το γεγονός ότι έχουν την ίδια ποσότητα φλαβονολών, μόρια αυτού του τύπου είναι λιγότερο δραστικά από τις προκυανιδίνες. Οι συνδυασμοί με άλλα συστατικά όπως οι ανθοκυάνες, οι ουδέτεροι πολυσακχαρίτες και οι πρωτεΐνες, μειώνουν τη δραστικότητά τους. Το αντίθετο συμβαίνει όταν πρόκειται για όξινους πολυσακχαρίτες.

Πρέπει να αναφερθεί η δυσκολία που αντιμετωπίζουν οι δοκιμαστές στο να διακρίνουν τη διαφορά μεταξύ στυπτικότητας και πικράδας. Ο Mirabel το 2000 υποστήριξε πως ο δείκτης ζελατίνης είναι ο καταλληλότερος για να συσχετιστεί με την πικράδα και για να εκτιμήσει το γευστικό αυτό χαρακτηριστικό. Πάντως, η στυπτικότητα, που αποτελεί μια πιο απτή αίσθηση, είναι περισσότερο συσχετισμένη με το ταννικό περιεχόμενο. Οι δοκιμαστές αντιλαμβάνονται μια συνολικότερη αίσθηση, η οποία περιγράφεται με τον όρο «επιθετικότητα» (Ribéreau-Gayon, P. et al., 2006).

Η περιεκτικότητα των λευκών οίνων σε φλαβονοειδείς ενώσεις μπορεί να συνεισφέρει στη γεύση, μέσω της δράσης ενώσεων όπως ο φλαβανονικός γλυκοζίτης της ναριγγενίνης. Οι φλαβανόλες ευθύνονται για τη χαρακτηριστική πικράδα των οίνων των ποικιλιών Riesling και Silvaner. Επιπλέον μικρές ποσότητες φλαβανολών-3 και φλαβαν-3,4-οδιολών διαμορφώνουν το σώμα και καθορίζουν την ποιότητα του οίνου. Η κατηγοριοποίηση των γερμανικών οίνων συνήθως στηρίζεται στην ωριμότητα του σταφυλιού και έχει συσχετιστεί με την υψηλή περιεκτικότητα σε φλαβονοειδείς ενώσεις. Εξαιτίας όμως του ρόλου των φλαβονοειδών ενώσεων στην καστώνωση και στη δημιουργία πικράδας,

έχει τεθεί ένα όριο ($>40\text{mg/L}$), πάνω από το οποίο η παρουσία τους παύει να είναι επιθυμητή.

Οι υδρολυόμενες ταννίνες σπάνια ευθύνονται για τη δημιουργία πικράδας και στυπτικότητα στους οίνους. Αν και τείνουν να είναι περισσότερο πικρές από τις συμπυκνωμένες ταννίνες, η συγκέντρωσή τους και το γεγονός ότι από νωρίς υποβαθμίζονται, περιορίζει τη συνεισφορά τους στη διαμόρφωση του οργανοληπτικού χαρακτήρα. Πάντως, τα παράγωγα του υδροξυκινναμωμικού οξέος συνήθως συνδέονται με εστερικούς δεσμούς με το τρυγικό οξύ και μετά από υδρόλυση μπορεί να ελευθερωθούν σε ποσότητες επαρκείς για να συνεισφέρουν στην πικράδα του οίνου.

Τα περισσότερα φαινολικά οξέα, όπως το καφταρικό, απαντώνται σε ποσότητες μικρότερες από το κατώφλι αντίληψής τους στον οίνο. Παρόλα αυτά, οι συνδυασμοί των φαινολικών οξέων έχουν χαμηλότερο κατώφλι αντίληψης από ότι το κάθε ένα χωριστά. Η ιδιότητα αυτή μπορεί να ενισχυθεί από την αλκοολική δύναμη του οίνου. Έτσι, τα φαινολικά οξέα μπορούν να συνεισφέρουν συνδυαστικά στην πικράδα και τη γεύση του οίνου.

Μια τυπική περιεκτικότητα του οίνου σε τυροσόλη, φαινολική ουσία που προέρχεται από τις ζύμες, η οποία είναι περίπου 25mg/L , μπορεί να δημιουργήσει πικράδα σε έναν λευκό οίνο. Αυτό έχει μεγαλύτερη σημασία στους αφρώδεις οίνους, στους οποίους η συγκέντρωσή της αυξάνεται κατά τη διάρκεια της δεύτερης ζύμωσης.

Κάποιες φαινολικές ουσίες μπορούν να συνεισφέρουν στη δημιουργία της αίσθησης πιπεριού που έχουν ορισμένες ποικιλίες. Η φαινυλαιθανόλη και ο ανθραλινικός μαθυλεστέρας έχουν τέτοια επίδραση. Άλλα φαινολικά παράγωγα μπορούν επίσης να δημιουργήσουν μια πικάντικη χροιά και να συμμετέχουν στη δημιουργία του χαρακτηριστικού ποικιλιακού αρώματος, εξαιτίας της πτητικότητάς τους. Εκτός από την άμεση επίδραση στην πικράδα και την στυπτικότητα, οι φαινόλες έχουν πολύπλοκα και έμμεσα αποτελέσματα στη δημιουργία της αίσθησης της γλυκύτητας και της οξύτητας, ενώ επίσης μπορούν να συνεισφέρουν στη δημιουργία του σώματος και στην ισορροπία του οίνου (Jackson, R. S., 2008).

Όπως αποδεικνύεται, η συνεισφορά των φαινολικών συστατικών στις οργανοληπτικές ιδιότητες των ερυθρών οίνων είναι σημαντική και πολύπλοκη.

Αξιζει να επικεντρώσουμε την προσοχή μας στα βασικά συμπεράσματα της σχετικής έρευνας των Glories και Agustin (1994):

Οι κατεχίνες και οι προκυανιδίνες (διμερή, τριμερή) που έχουν πολυμεριστεί μερικώς, αντιδρούν πολύ δύσκολα με τις πρωτεΐνες. Διάλυμά τους έχει γεύση περισσότερο όξινη, παρά στυφή.

Οι ολιγομερείς και πολυμερισμένες προκυανιδίνες δίνουν την εντύπωση του σώματος στη γεύση, με μια αξιοπρόσεκτη πικράδα και στυπτικότητα. Στη γεύση ο συνδυασμός ταννινών και πολυσακχαριτών δίνει την εντύπωση της στρογγυλότητας και της πληρότητας, κάτι που είναι ιδιαίτερα επιθυμητό.

Οι ανθοκυάνες και οι συνδυασμοί τους με τις ταννίνες δε δίνουν πολύ στυφά διαλύματα, αλλά έχουν μια ιδιαίτερη πικράδα, ιδίως στους νέους οίνους, όπου οι μοριακές δομές δεν είναι ακόμα ιδιαίτερα πολύπλοκες.

Οι ταννίνες των φλοιών αντιδρούν λιγότερο με τις πρωτεΐνες, από ότι οι ταννίνες των γιγάρτων και των βοστρύχων. Μάλιστα οι τελευταίες, και ιδιαίτερα οι προκυανιδίνες, πολυμερίζονται σε διαφορετικό βαθμό, ανάλογα με την ωρίμανση των ραγών. Δεν περιέχουν καθόλου ελεύθερες ανθοκυάνες ή σύμπλοκα ταννινών με πολυσακχαρίτες ή πρωτεΐνες, όπως συμβαίνει με τις ταννίνες των φλοιών (Κοτσερίδης, Γ., 2006).

2.2 Άρωμα

Λίγες είναι οι πτητικές φαινόλες που προέρχονται από το σταφύλι. Η ακετοβανιλόνη, που έχει μια διακριτική οσμή βανίλιας είναι μια εξαίρεση. Η πιο σημαντική περίπτωση είναι ο ανθραλινικός μεθυλεστέρας. Αυτός ο φαινολικός προέλευσης εστέρας είναι σημαντικό συστατικό του χαρακτηριστικού αρώματος κάποιων ποικιλιών *V.labrusca*. Επίσης παράγεται σε μικρές ποσότητες σε πολλές καλλιέργειες της *V.vinifera*, όπως είναι Pinot noir, Riesling και Silvaner. Άλλη μια σημαντική πτητική φαινόλη είναι η 2-αμινοακετοφαινόνη, η οποία σχετίζεται με τη δημιουργία δυσάρεστης οσμής που θυμίζει ναφθαλίνη. Αντίθετα, ευχάριστη είναι η οσμή της 2-φαινυλαιθανόλης. Θυμίζει τριαντάφυλλο και απαντάται συχνά σε ποικιλίες *V.rotundifolia*. Η 2-φαινυλαιθανόλη και άλλα πτητικά φαινολικά παράγωγα, όπως η βανιλίνη και η ζινγερόνη, απαντώνται σαν μη πτητικά τμήματα συζεύξεων σε πολλές περιπτώσεις *V. vinifera*. Μπορούν να διασπαστούν από τις ενώσεις τους είτε με όξινη υδρόλυση, είτε με ενζυμική,

κάτι που έχει μεγάλη επίδραση στον οργανοληπτικό χαρακτήρα των παραγόμενων οίνων.

Αν και συνεισφέρουν στο ποικιλιακό άρωμα ορισμένων ποικιλιών, τα φαινορικά παράγωγα με προέλευση το σταφύλι έχουν μεγαλύτερη σημασία σαν πηγές αρώματος κατά την αλκοολική ζύμωση και μετά την ολοκλήρωσή της. Τα παράγωγα των εστέρων του υδροξυκονναμωμικού οξέος, κυρίως το κουμαρικό και το φερουλικό οξύ, είναι πολύ σημαντικά από αυτή την άποψη. Το ξύλο της δρυός είναι μια ακόμα πηγή των οξέων αυτών. Οι υδροξυκινναμωμικοί εστέρες μεταβολίζονται σε πτητικές φαινόλες από έναν μεγάλο αριθμό μικροοργανισμών. Τα παράγωγα, οι βυνιλφαινόλες (4-βυνιλγουαϊακόλη και 4-βυνιλφαινόλη) και οι αιθυλφαινόλες (4-αιθυλφαινόλη και 4-αιθυλγουαϊακόλη), δίνουν οσμή πικάντικη, φαρμακευτική, μπαχαρικού και καπνιστή, φαινολική, ζώου και στάβλου, αντίστοιχα. Σε περίπτωση που η περιεκτικότητα σε αιθυλφαινόλες υπερβεί τα 400 $\mu\text{g/L}$ και σε βυνιλφαινόλες τα 725 $\mu\text{g/L}$, εμφανίζονται δυσάρεστες οσμές. Η μετατροπή τους αρχικά έχει σαν αποτέλεσμα την αποκαρβοξυλίωση των υδροξυκινναμωμικών πρόδρομων ενώσεων σε βυνιλφαινόλες και πιθανώς ακολουθεί η αναγωγή τους σε αιθυλφαινόλες. Αν και πολλά βακτήρια και ζύμες μπορούν να μεταβολίζουν τους υδροξυκινναμωμικούς εστέρες σε βυνιλφαινόλες, μόνο λίγες ζύμες, κυρίως του γένους *Brettanomyces* (*Dekkera*), μπορούν να μεταβολίσουν σημαντικές ποσότητες σε αιθυλφαινόλες. Οι ερυθροί οίνοι συνήθως παρουσιάζουν μεγαλύτερη αναλογία αιθυλφαινολών προς βυνιλφαινόλες και υψηλότερη απόλυτη συγκέντρωση των ενώσεων αυτών, ενώ το αντίθετο συμβαίνει με τους λευκούς οίνους. Αυτό μάλλον αποδίδεται στο γεγονός ότι πιο συχνά οι ερυθροί οίνοι ωριμάζουν σε δρύινα βαρέλια, τα οποία είναι η πηγή των πρόδρομων πτητικών φαινολών.

Η ευγενόλη είναι ένα ακόμα παράγωγο με άρωμα μπαχαρικού. Συνήθως βρίσκεται σε οίνους που ζυμώθηκαν ή ωρίμασαν σε δρύινα βαρέλια, ειδικά όταν έχει προηγηθεί ελαφρά επεξεργασία ψησίματος του ξύλου. Στις συγκεντρώσεις που απαντάται συνήθως, η ευγενόλη απλώς προσθέτει μια διάχυτη πικάντικη χροιά. Η γουαϊακόλη μπορεί να προκύψει από τη θερμική υποβάθμιση της λιγνίνης του ξύλου, αν και συνήθως η συγκέντρωσή της δεν επαρκεί για να επηρεάσει το μπουκέτο άμεσα. Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, συνήθως σαν παραπροϊόν μικροβιακής δράσης, η γουαϊακόλη και τα συναφή συστατικά,

μπορεί να εμπλέκονται σε δημιουργία δυσάρεστων οσμών που προέρχονται από μολυσμένες τάπες. Η γουαϊακόλη έχει μια γλυκιά, καπνιστή οσμή, σε συγκεντρώσεις κοντά στο κατώφλι αντίληψης. Η μαλτόλη είναι ένα ακόμα φαινολικό συστατικό που εκχυλίζεται από τα δρύινα βαρέλια και έχει χαρακτηριστική γλυκιά οσμή καραμέλας.

Ορισμένα γαλακτικά βακτήρια μπορούν να οδηγήσουν στην παραγωγή πτητικών φαινολών από μη φαινολικά συστατικά. Ένα παράδειγμα είναι η σύνθεση κατεχόλης από σικιμικό οξύ.

Εκτός από την 2-φαινυλαιθανόλη, η άλλη πολύ σημαντική φαινολική αλκοόλη είναι η τυροσόλη. Συντίθεται από τις ζύμες και έχει μια ήπια οσμή κηρήθρας που μοιάζει με μέλι.

Ήδη έχει διασαφηνιστεί πως το ξύλο της δρυός είναι η πηγή για πολλά πτητικά και μη φαινολικά οξέα. Επιπλέον, η δρυς είναι η βασική πηγή των φαινολικών αλδεϋδών, οι οποίες είναι πρώτα από όλα παράγωγα της βενζαλδεϋδης και της κινναμαλδεϋδης. Η βενζαλδεϋδη είναι η σημαντικότερη και προσδίδει μια οσμή αμυγδάλου. Απαντάται σε μεγάλα ποσά στα sherries, όπου μετέχει στη διαμόρφωση του αρώματος καρυδιού. Επίσης μπορεί να βρεθεί σε οίνο του οποίου έχει οξειδωθεί η βενζυλική αλκοόλη, από ένζυμα του *Botrytis cynerea*, ή από κάποιες ζύμες. Άλλες επίσης σημαντικές φαινολικές αλδεϋδες είναι η βανιλίνη και η συριγγαλδεϋδη, οι οποίες έχουν άρωμα βανίλιας και σχηματίζονται κατά τη διάσπαση των λιγνινών του ξύλου.

Άλλη πηγή πτητικών φαινολικών αλδεϋδών είναι η θέρμανση του γλεύκους ή του οίνου. Για παράδειγμα, η φρουκτόζη γρήγορα μετατρέπεται σε 5- (υδροξυμεθυλ)-2-φουραλδεϋδη, κατά τη θέρμανση, ή με πολύ αργό ρυθμό κατά την παλαίωση και έχει οσμή χαμομηλιού. Η φουρφουράλη συνήθως παράγεται κατά την απόσταξη και το ψήσιμο των βαρελιών. Τέλος, οι φαινολικές αλδεϋδες προκύπτουν από την ενεργοποίηση του φαινυλπροπανοϊκού μεταβολισμού.

Εκτός από την ιδιότητά τους να αποτελούν πηγή αρωματικών ουσιών, οι φαινολικές ενώσεις μπορούν να αντιδράσουν με άλλες αρωματικές ενώσεις του οίνου. Ένα σημαντικό παράδειγμα είναι η αντίδραση της ακεταλδεϋδης με τα πολυμερή της προκυανιδίνης, κάτι που οδηγεί στη δημιουργία μιας οξειδωμένης

οσμής στον οίνο. Ένα πιο διακριτικό, αλλά το ίδιο σημαντικό αποτέλεσμα είναι η μετατροπή των θειολών σε πολυφαινόλες και κινόνες. Αντίθετα, τα φαινολικά οξέα προσδίδουν σταθερότητα σε πολλούς πτητικούς εστέρες και τερπένια. Τέλος, οι ανθοκυάνες επίσης παρέχουν σταθερότητα στην 3-μερκαπτοεξαν-1-όλη, που είναι ιδιαίτερα σημαντική στο άρωμα των ροζέ Bordeaux οίνων (Jackson, R. S., 2008).

2.3 Οξειδωτική και αντιοξειδωτική δράση

Το ευοξειδωτο της φαινολικής ομάδας είναι μια χαρακτηριστική της ιδιότητα και προσδίδει στις ενώσεις που έχουν τέτοιες ομάδες προστατευτική δράση έναντι των οξειδώσεων. Σύμφωνα με έρευνες, η αντιοξειδωτικές ιδιότητες των παλαιωμένων ερυθρών οίνων δεν οφείλονται απλώς στη δράση μεμονωμένων φαινολικών ουσιών, αλλά κυρίως σε συνεργιστικά φαινόμενα μεταξύ τους (Κοτσερίδης, Γ., 2006, Minussi, R.C. et al., 2003, Arnous, A. et al., 2001, Huisman, A. et al., 2004, Arnous, A. et al., 2002, Katalanic, V. et al., 2004, Echeverry, C. et al., 2005).

Οι μηχανισμοί οξείδωσης που λαμβάνουν χώρα είναι εξαιρετικά πολύπλοκοι, ιδιαίτερα σε όξινο περιβάλλον. Το φως, η θερμοκρασία, η παρουσία υπεροξειδίων και ορισμένα μέταλλα ευνοούν το σχηματισμό ελεύθερων ριζών οξυγόνου. Το μοριακό οξυγόνο έχει τη δομή μιας διπλής ελεύθερης ρίζας και μπορεί να δώσει μια μεγάλη ποικιλία ελεύθερων ριζών που περιέχουν οξυγόνο. Οι ελεύθερες ρίζες (υπεροξειδία) που σχηματίζονται, μπορεί να προκαλέσουν την οξειδωτική αποικοδόμηση πολλών μορίων, όπως πρωτεϊνών, σακχάρων, ακόρεστων λιπιδίων κ.α. Έτσι, η παρουσία των φαινολικών συστατικών συμβάλλει στην εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών, γιατί οξειδώνονται αυτά πρώτα, έναντι των άλλων μορίων. Σε αυτό ακριβώς το γεγονός έγκειται ο θετικός ρόλος των φαινολικών συστατικών έναντι της οξείδωσης.

Οι φλαβανόλες, οι προκυανιδίνες και συνεπώς οι συμπυκνωμένες ταννίνες αντιδρούν περισσότερο ή λιγότερο εύκολα με τις ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου, ανάλογα με τη σύνθεση των τμημάτων τους. Μετά από μια σειρά αλυσιδωτών αντιδράσεων παράγονται πολυμερή χρώματος καφέ που έχουν μεταβαλλόμενη δομή και καταβυθίζονται, ανάλογα με το φαινολικό περιεχόμενο του οίνου (Κοτσερίδης, Γ., 2006).

Τα παραπροϊόντα της φαινολικής οξείδωσης, οι κινόνες, με αργό ρυθμό αλλάζουν δομή και επαναδημιουργούν φαινόλες, οι οποίες μπορούν να αντιδράσουν με επιπρόσθετο οξυγόνο. Συνεπώς το οξυγόνο του γλεύκους προοδευτικά εξαντλείται και δεν υπάρχει πια διαθέσιμο για να προκαλέσει την οξείδωση άλλων ενώσεων. Βέβαια, η οξείδωση των φαινολών σε κινόνες οδηγεί στην παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου, που είναι εν δυνάμει οξειδωτικός παράγοντας.

Στο γλεύκος οι κύριες οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις περιλαμβάνουν την ενζυμική οξείδωση των διυδροφαινολών, κυρίως εστέρων του καφεϊκού και τρυγικού οξέος, σε δικινόνη. Άλλες σημαντικές ενώσεις που αντιδρούν είναι εστέρες του κουμαρικού και τρυγικού οξέος και μονομερή φλαβανολών-3 (κατεχίνες), τα οποία μάλιστα παράγουν ενώσεις κιτρινοκαφέ, οι οποίες σε περίπτωση περαιτέρω συμπύκνωσης οδηγούν σε καστάνωση. Οι πολυφαινολοξειδάσες που καταλύουν αυτές τις αντιδράσεις απελευθερώνονται από τα κύτταρα κατά το σπάσιμο των σταφυλιών. Ενεργοποιούνται παρουσία οξυγόνου και των οξέων που επίσης ελευθερώνονται από το σπάσιμο των σταφυλιών. Οι ο-δικινόνες που παράγονται μέσω της οξείδωσης μπορούν να αναχθούν πάλι σε ο-διφαινόλες (με γειτονικά υδροξύλια) μέσω της οξείδωσης του ασκορβικού οξέος, των κατεχινών ή των προκυανιδινών. Έτσι ενεργοποιείται ο πολυμερισμός και η πρόωμη καθίζηση των ήδη οξειδωμένων φαινολών κατά την αλκοολική ζύμωση (Jackson, R. S., 2008, Orak, H.H. 2007, Kondrashov, A. et al., 2009, Roussis, I. et al., 2008, Sakkiadi, A.V. et al., 2001).

Συνοψίζοντας, οι πολυφαινολοξειδάσες καταλύουν «ζευγαρωτές» οξειδώσεις, όπου ένα απλό φαινολικό συστατικό δρα ως αρχικό υπόστρωμα και οξειδώνεται προς κινόνη. Στη συνέχεια, τα νέα προϊόντα παίρνουν μέρος σε ένα οξειδοαναγωγικό σύστημα ζευγαρωτών αντιδράσεων, όπου οξειδώνουν πιο πολύπλοκα μόρια πολυφαινολών, τα οποία με τη σειρά τους θα καταλήξουν στην αρχική ελεύθερη μορφή τους (Κοτσερίδης, Γ., 2006)

Οι πολυφαινολοξειδάσες των σταφυλιών διατηρούνται δραστικές στο γλεύκος για σχετικά μικρό χρονικό διάστημα. Επειδή παραμένουν για πολύ χρόνο ενωμένες στα κυτταρικά συστατικά των σταφυλιών, η ενζυμική οξείδωση μειώνεται έντονα μετά την πίεση. Επιπλέον οι κινόνες που δημιουργούνται κατά την οξείδωση μπορούν να αδρανοποιήσουν ένζυμα όπως οι

πολυφαινολοξειδάσες. Αυτό συμβαίνει όταν οι καρβονυλικές ομάδες της κινόνης αντιδράσουν με ελεύθερες αμινομάδες ή με θειολικές ομάδες πρωτεϊνών. Οι ταννίνες μπορούν επίσης να αδρανοποιήσουν τις πολυφαινολοξειδάσες. Έτσι μετά την πίεση, η οξείδωση πραγματοποιείται κυρίως με μη ενζυμικούς μηχανισμούς (αυτοοξείδωση). Παρά το γεγονός ότι συμβαίνει με πιο αργό ρυθμό, επηρεάζει έναν μεγάλο αριθμό φαινολικών ενώσεων και όχι μόνο τις ο-διφαινόλες που επηρεάζονται από τις πολυφαινολοξειδάσες του σταφυλίου. Έτσι είναι σαφές πως η οξείδωση στον οίνο είναι κυρίως μη ενζυμική.

Στους ερυθρούς οίνους η οξείδωση κυρίως σχετίζεται με διϋδροξυφαινόλες, όπως είναι οι κατεχίνες και οι κυανιδίνες. Οι ενώσεις αυτές μετατρέπονται σε δικινόνες, υπό την καταλυτική επίδραση ιόντων σιδήρου. Ένα παραπροϊόν της αντίδρασης είναι το υπεροξειδίο του υδρογόνου, που είναι εν δυνάμει οξειδωτικός παράγοντας. Αυτές οι αντιδράσεις λέγονται υπεροξειδώσεις. Οι ελλαγιταννίνες που προέρχονται από τα δρύινα βαρέλια, επίσης συμμετέχουν στις υπεροξειδώσεις. Το υπεροξειδίο σχηματίζεται κατά την υπεροξείδωση που οξειδώνει άλλες ενώσεις και κυρίως την αιθανόλη. Η αιθανόλη δρα σαν κύριο υπόστρωμα εξαιτίας του ότι είναι το επικρατέστερο υπόστρωμα του οίνου. Το παραπροϊόν είναι η ακεταλδεϋδη. Άλλα υποστρώματα που οξειδώνονται εύκολα, εκτός από τις φαινόλες και την αιθανόλη, είναι το διοξειδίο του θείου, η γλυκερόλη και τα αμινοξέα. Το υπεροξειδίο του υδρογόνου δεν παράγεται κατά την ενζυμική οξείδωση των ο-διφαινολών.

Επειδή οι κινόνες μπορούν να αντιδράσουν με άλλες φαινόλες, διευκολύνουν τον πολυμερισμό των φαινολών και τη δημιουργία ενώσεων με καφέ χρώμα. Μετά από αργή δομική ανακατανομή, από τα διμερή κινόνης-φαινόλης μπορούν να σχηματιστούν νέα διμερή αποτελούμενα από ο-διφαινόλες. Η αντίδραση αυτή μπορεί να μετατρέψει τις ελαφρά οξειδωμένες φαινόλες σε διμερείς φαινόλες που μπορούν να οξειδωθούν εύκολα. Αυτές αντιδρούν με το επιπλέον οξυγόνο, προς παραγωγή περισσότερων υπεροξειδίων και κατ' επέκταση περισσότερης ακεταλδεϋδης. Τα διμερή ο-κινόνης που παράγονται μπορούν πάλι να αντιδράσουν με φαινολικές ενώσεις, παράγοντας έτσι περισσότερο πολύπλοκες πολυφαινολικές δομές. Εάν οι φαινολικές ενώσεις που οξειδώθηκαν είναι κατεχίνες, οι συμπυκνωμένες ταννίνες που προκύπτουν είναι συχνά συνδεδεμένες μεταξύ του C6' και του C6 ή C8 των διπλανών B και A

δακτυλίων αντίστοιχα. Πάντως, οι συνδέσεις μπορεί εναλλακτικά να περιλαμβάνουν τους C3' , C4' και C5' του B δακτυλίου. Έτσι, οι ταννίνες του οίνου είναι συχνά πολύ πιο πολύπλοκες δομικά σε σχέση με τις ταννίνες του σταφυλίου. Εξαιτίας του μεγάλου βαθμού των δομικών ανακατατάξεων που είναι πιθανές μεταξύ των πολυφαινολικών συμπλόκων, η ικανότητα των ερυθρών οίνων να αφομοιώνουν αργά το οξυγόνο είναι αξιοσημείωτη. Σύμφωνα με σχετική μελέτη, οι ερυθροί οίνοι μπορούν να αντιδράσουν με το οξυγόνο που περιέχεται σε 50-100 λίτρα αέρα, όταν η χαμηλότερη περιεκτικότητα σε φαινολικά των λευκών οίνων τους επιτρέπει να καταναλώσουν μόνο το ένα δέκατο της ποσότητας αυτής.

Ο πολυμερισμός μεταξύ ταννινών και μεταξύ ταννινών-ανθοκυανών επίσης διευκολύνεται άμεσα από την παραγωγή ακεταλδεϋδης, η οποία βοηθάει στη σταθεροποίηση του χρώματος των ερυθρών οίνων, προστατεύοντας τις ανθοκυάνες από την οξείδωση, ή από τον αντιστρέψιμο αποχρωματισμό που προκαλεί το διοξειδιο του θείου. Επιπρόσθετα, η αντίδραση απομακρύνει την ελεύθερη ακεταλδεϋδη που μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία μπαγιάτικης, οξειδωμένης οσμής.

Άλλη μια εν δυνάμει σημαντική πηγή πολυμερισμού φλαβονοειδών ενώσεων είναι η οξείδωση που παρακινείται από μέταλλα, χαλκό ή σίδηρο, του τρυγικού οξέος . Το γλυοξυλικό οξύ είναι παρόμοιο με την ακεταλδεϋδη και μπορεί να προκαλεί συνένωση κατεχινών και άλλων φαινολικών ενώσεων. Καμιά από αυτές τις αντιδράσεις πολυμερισμού δεν απαιτεί άμεση οξείδωση των φαινολών.

Η αντιοξειδωτική δράση (αφομοίωση οξυγόνου) των φαινολών του οίνου βελτιώνεται στην περίπτωση που η απορρόφηση του οξυγόνου είναι αργή ή σπάνια. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, νέες φαινόλες που μπορούν να υποστούν οξείδωση αναδημιουργούνται με ταχύτητα τέτοια που τους επιτρέπει την γρήγορη αφομοίωση του οξυγόνου. Με τη σχετικά γρήγορη απομάκρυνση του οξυγόνου (περίπου μια εβδομάδα χωρίς πολυφαινολοξειδάση), οι ανεπιθύμητες αντιδράσεις οξείδωσης περιορίζονται. Επίσης η κατανάλωση υπεροξειδίου του υδρογόνου κατά την οξείδωση της αλκοόλης σε ακεταλδεϋδη, περιορίζει την οξειδωτική υποβάθμιση σημαντικών αρωματικών ενώσεων. Επιπλέον, μια ελαφρά οξείδωση (~40mg O₂/L/χρόνο) μπορεί να προκαλέσει την καθίζηση

μεγάλης ποσότητας ταννινών, μέσω του σχηματισμού μεγάλων συμπυκνωμένων ταννινών. Έτσι μειώνεται η πικράδα και η στυπτικότητα των οίνων (Jackson, R. S., 2008).

Εξαιτίας της επαρκούς απομάκρυνσης οξυγόνου, οι φαινόλες μπορούν να βοηθήσουν στη διατήρηση του οίνου σε χαμηλό δυναμικό οξειδοαναγωγής. Αυτό είναι καθοριστικής σημασίας στην περίπτωση που θέλουμε να διατηρήσουμε ένα παλαιωμένο μπουκέτο κατά τη διάρκεια μακροχρόνιας ωρίμανσης σε μπουκάλι.

Σε αντίθεση με τους ερυθρούς οίνους, το ελάχιστο χρώμα και ο περιορισμένος αντιοξειδωτικός χαρακτήρας των λευκών οίνων τους καθιστά πολύ πιο ευάλωτους στην οξείδωση και κυρίως στην οξειδωτική αμαύρωση. Αν και το κύριο φαινολικό σε φρεσκοσπασμένα σταφύλια, το καφεϊκό οξύ οξειδώνεται εύκολα από την πολυφαινολοξειδάση, η καστάνωση μπορεί να περιοριστεί από τον συνδυασμό της ο-κινόνης με τη γλουταθειόνη. Έτσι ανάγεται η κινόνη σε μια άχρωμη διφαινόλη. Η απομάκρυνση των κινονών επίσης έχει ως αποτέλεσμα τη συνεχιζόμενη δράση της πολυφαινολοξειδάσης, αφού όταν δεν συσσωρεύονται, δεν μπορούν να αδρανοποιήσουν το ένζυμο. Μετά από την εξάντληση της γλουταθειόνης, οι ο-κινόνες μπορεί να αρχίσουν να συσσωρεύονται, ενεργοποιώντας την οξείδωση και τη συμπίκνωση των φλαβονολών-3 (κυρίως της κατεχίνης και της επικατεχίνης) και άλλων ο-διφαινολών, καθώς και αδρανοποιώντας την πολυφαινολοξειδάση. Σε λευκούς οίνους οι φλαβανόλες-3 είναι οι κύριοι παράγοντες καστάνωσης. Εάν η οξείδωση ξεκινήσει αμέσως μετά το σπάσιμο των σταφυλιών, οι καστανές πολυφαινολικές ενώσεις που παράγονται έχουν την τάση να καθιζάνουν, αφήνοντας τον οίνο περισσότερο ευαίσθητο στην καστάνωση που συμβαίνει μέσα στο μπουκάλι. Η απομάκρυνσή τους μέσω της ένωσης με τα κύτταρα των ζυμών εντείνεται ανάλογα με το μέγεθος των πολυμερών. Αυτό αποτελεί ένα από τα κύρια πλεονεκτήματα της υπεροξείδωσης, δηλαδή της μη αποφυγής της έκθεσης του γλεύκους στον αέρα, κατά το σπάσιμο των ραγών.

Τέλος πρέπει να αναφερθεί πως οι ποικιλίες των σταφυλιών διαφέρουν σημαντικά ως προς την ευαισθησία τους στην οξείδωση και στην οξειδωτική καστάνωση. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί κατά ένα μέρος από το γεγονός ότι υπάρχουν διαφορές στη σύσταση του φαινολικού περιεχομένου, αλλά και από

τις διαφορετικές συνέπειες της οξείδωσης των φαινολών. Επίσης είναι πολύ σημαντικός παράγοντας και η διαφορά που παρουσιάζουν οι ποικιλίες μεταξύ τους όσον αφορά στην παρουσία ενζύμων που οξειδώνουν τις φαινόλες (Jackson, R. S., 2008).

2.4 Αντιμικροβιακή δράση

Η προστατευτική δράση του οίνου ως προς τις γαστρεντερικές προσβολές είναι γνωστή από παλιά. Ακόμα και σήμερα όμως, ο ακριβής τρόπος με τον οποίο ο οίνος, και πιο συγκεκριμένα τα φαινολικά συστατικά του, ασκούν την αντιμικροβιακή αυτή δράση, παραμένει άγνωστος. Δεν γνωρίζουμε ούτε ποιες ακριβώς είναι οι φαινολικές ουσίες που έχουν την ιδιότητα αυτή. Αυτό αποδίδεται στο γεγονός ότι οι φαινολικές ουσίες ασκούν διάφορες επιδράσεις στα ζωντανά συστήματα, αλλά και στις πολυάριθμες δυνατότητες που έχουν να αντιδρούν με άλλες ενώσεις. Εξαιτίας της ικανότητας των ταννινών να ενώνονται με πρωτεΐνες, περιορίζουν τη δράση των ενζύμων, τροποποιώντας την διαλυτότητα και τη δομή τους. Λόγω του ότι τα βακτήρια και οι μύκητες αφομοιώνουν τα διάφορα πολύπλοκα θρεπτικά συστατικά έξω από τα κύτταρά τους, η αδρανοποίηση των ενζύμων που συμμετέχουν στη διαδικασία αυτή μπορεί να έχει παρεμποδιστική δράση, ακόμα και θανατηφόρο. Επιπλέον, οι ταννίνες μπορούν να ενωθούν με τα φωσφολιπίδια και τις πρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης, διαταράσσοντας τη μεμβρανική λειτουργία. Τέλος, οι φαινολικές ουσίες, όπως οι προκυανιδίνες, έχουν ισχυρές χηλικές ιδιότητες που μπορούν να παρεμποδίσουν την πρόσβαση των βακτηρίων σε βασικά μέταλλα, κυρίως ψευδάργυρο και σίδηρο. Μικρότερες φλαβονοειδείς ενώσεις, όπως η κερκετίνη, η ρουτίνη αλλά και μη φλαβονοειδείς ενώσεις, όπως το καφεϊκό οξύ, παρουσιάζουν επίσης αντιμικροβιακές ιδιότητες.

Υπό φυσιολογικές συνθήκες ζύμωσης, οι φαινόλες δεν παρεμποδίζουν την ανάπτυξη και το μεταβολισμό των ζυμών και των γαλακτικών βακτηρίων. Αυτή η ανθεκτικότητα μπορεί να αποδίδεται στο ότι η μεταβολική δράση τους δεν εξαρτάται από εξωτερικά ένζυμα πέψης. Είναι πάντως γνωστό πως οι φαινόλες μπορεί να δημιουργήσουν πρόβλημα στη διεξαγωγή της δεύτερης ζύμωσης του αφρώδους οίνου. Για το λόγο αυτό, είναι σπάνια η χρήση ερυθρών οίνων στην παραγωγή αφρώδους οίνου (Jackson, R. S., 2008).

Πρόσφατα έρευνες έχουν εστιάσει την προσοχή τους σε μια ειδική περίπτωση φαινολικών συστατικών με αντιμικροβιακή δράση. Πρόκειται για τα στυλβένια και κυρίως την ρεσβερατρόλη. Η ένωση αυτή έχει αντιμικροβιακή δράση, όμως δεν είναι αυτός ο λόγος για τον οποίο ερευνάται επισταμένα, αλλά η αντιοξειδωτική δράση που παρουσιάζει σε ζωικά συστήματα. Στη ρεσβερατρόλη μπορούν να αποδοθούν τα οφέλη της ελεγχόμενης κατανάλωσης οίνου. Αν και η σύνθεση της ρεσβερατρόλης είναι η αντίδραση σε καταστάσεις στρες, όπως η προσβολή από *B. cinerea*, η συγκέντρωσή της σε πολύ προσβεβλημένα σταφύλια μπορεί να μειωθεί. Πολλοί παθογόνοι μύκητες μπορούν είτε να παρεμποδίσουν, είτε να καταστρέψουν φυτοαλεξίνες, όπως η ρεσβερατρόλη (Kallithraka, S. et al., 2001, Jackson, R. S., 2008, Rodriguez-Delgado, M.A. et al., 2001, Gambelli, L. et al., 2004, Gurbuz, O. et al., 2005, Chen, J.Y. et al., 2006a, Chen, J.Y. et al., 2006b, Gerogiannaki-Christopoulou, M. et al., 2006).

2.5 Διαύγαση

Η αποτελεσματικότητα των ταννινών στην πρόκληση καθίζησης των πρωτεϊνών και η αντίστροφα, συχνά χρησιμοποιείται για τη διαύγαση του οίνου. Οι ερυθροί οίνοι μπορεί να περιέχουν πολύ μεγάλες ποσότητες ταννινών, με συνέπεια να είναι πολύ στυφοί και να έχουν μεγάλη ποσότητα ιζήματος. Η προσθήκη διαυγαστικών πρωτεϊνών προκαλεί μαλάκωμα του οίνου, εξαιτίας της καθίζησης κάποιας ποσότητας ταννινών. Αντίθετα, κάποιοι λευκοί οίνοι είναι πιθανό να περιέχουν πολύ υψηλές συγκεντρώσεις κολλοειδών πρωτεϊνών, με συνέπεια τη δημιουργία θολερότητας. Οι οινολογικές ταννίνες χρησιμοποιούνται στην περίπτωση αυτή για να προκαλέσουν την καθίζηση των πρωτεϊνών και τη διαύγαση του οίνου (Jackson, R. S., 2008, Castillo-Sanchez, J. J. et al., 2005).

Οι περισσότερες οινολογικές ταννίνες είναι υδρολύμενες και προέρχονται από βελανιδιά, δρυ ή καρυδιά. Η προέλευσή τους καθορίζει τις ιδιότητές τους και τη χρήση τους. Η ταννίνη από βελανιδιά είναι κυρίως γαλλοταννίνη και αποτελείται από σχεδόν ίσες ποσότητες γαλλικού, διγαλλικού και τριγαλλικού οξέος. Οι ταννίνες από ξύλο καρυδιάς είναι κυρίως γαλλοταννίνες που αποτελούνται από γαλλικό οξύ και μικρές ποσότητες διγαλλικού και ελλαγικού

οξέος. Προστίθενται σε ερυθρούς οίνους για την αποφυγή του θολώματος από σίδηρο, ή σε συνδυασμό με ζελατίνη, για τη διαύγαση λευκών και ροζέ οίνων. Αντίθετα, οι ταννίνες από δρυ είναι κυρίως πολυμερή του ελλαγικού οξέος. Συχνά προστίθενται κατά την παραγωγή μπράντι, για την ενίσχυση του χρώματος και την ανάδειξη των αρωματικών συστατικών που προέρχονται από τη λιγνίνη.

Μια σχετικά νέα πηγή οινολογικών ταννινών είναι τα γίγαρτα του σταφυλίου. Ανάλογα με την ποικιλία, την ωριμότητα των γιγάρτων και τη διαδικασία εκχύλισης, οι ταννίνες αυτές μπορεί να έχουν διαφορετικές ιδιότητες όσον αφορά την καθίζηση των πρωτεϊνών, το αντιοξειδωτικό δυναμικό και τη σταθεροποίηση των ανθοκυανών (Jackson, R. S., 2008).

2.6 Ένζυμα που επηρεάζουν τα φαινολικά συστατικά

2.6.1 Ένζυμα σταφυλίου

2.6.1.1 Υδρολυτικά

Οι πολυσακχαρίτες του οίνου προέρχονται είτε από τα κυτταρικά τοιχώματα του φλοιού (πηκτινικοί πολυσακχαρίτες), είτε από τα κυτταρικά τοιχώματα των ζυμών (μαννάνες και μαννοπρωτεΐνες). Διαχωρίζονται σε ομάδες που διαφέρουν ως προς τη σύνθεση και τη δομή τους. Δύο είναι τα κριτήρια που χρησιμοποιούνται ευρέως για τη διάκριση των δύο ομάδων, η οξύτητα και το περιεχόμενο σε πρωτεΐνες.

Οι ουδέτερες πηκτινικές ουσίες κυρίως είναι οι II αραβινογαλακτάνες και τα σύμπλοκά τους με πρωτεΐνες, οι οποίες αντιπροσωπεύουν το 40% του συνόλου των πολυσακχαριτών των ερυθρών οίνων. Το κοινό δομικό χαρακτηριστικό τους είναι ο σκελετός από $(1 \rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-γαλακτάνη}$ με $(1 \rightarrow 6)$ συνδεδεμένες πλευρικές αλυσίδες $\beta\text{-D-γαλακτάνης}$ με υψηλή υποκατάσταση αραβινοφουρανόζης. Τα τυπικά σύμπλοκα αραβινογαλακτάνης με πρωτεΐνες συνήθως περιέχουν λιγότερο από 10% πρωτεΐνες. Άλλοι ουδέτεροι πολυσακχαρίτες είναι οι ελαφρώς διακλαδισμένες $(1 \rightarrow 5)\text{-}\alpha\text{-L-αραβινάνες}$ και οι αραβινογαλακτάνες τύπου I που είναι $(1 \rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-γαλακτάνες}$ με υποκατάσταση στη θέση 6 αραβινοφουρανόζη. Οι όξινοι πηκτινικοί πολυσακχαρίτες χαρακτηρίζονται από υψηλή αναλογία γαλακτουρονικού οξέος

και περιλαμβάνουν ομογαλακτουρονά ν ε ς και ραμνογαλακτουρονάνες. Οι ραμνογαλακτουρονάνες-II, που αποτελούν το 20% των διαλυτών πολυσακχαριτών στους ερυθρούς οίνους, είναι (1→4)-α-D-γαλακτουρονάνες διακλαδισμένες με τέσσερις διαφορετικές πλευρικές αλυσίδες που περιλαμβάνουν κυρίως ραμνοπυρανόζη, αραβινοφουρανόζη και γαλακτοπυρανόζη (B. Ayestarán, et al., 2004, Gunata, Z., et al., 1998, Saulinier, L. and Thibault, J. F., 1987, Villena, M. A. et al., 2006).

Σε σχέση με τα υπόλοιπα φρούτα, το σταφύλι είναι φτωχό σε πηκτινικές ουσίες. Οι ουσίες αυτές βρίσκονται κυρίως στα κυτταρικά τοιχώματα του φλοιού. Κατά συνέπεια, το γλεύκος περιέχει μικρή ποσότητα πηκτινικών ουσιών σε διαλυτή μορφή (0.5-1 g/L εκφρασμένο σε γαλακτουρονικό οξύ). Ανάλογα με τον τρόπο οινοποίησης, ενδέχεται να εκχυλίζονται πηκτινικές ουσίες των φλοιών, οπότε οι πηκτινικές ουσίες του γλεύκους μπορούν να φτάσουν τα 2.5 g/L. Κυρίως σχετίζονται με κυτταρικά κατάλοιπα και ιζήματα του γλεύκους. Οι περισσότερες υδρολύονται γρήγορα με τη δράση των υδρολυτικών ενζύμων του σταφυλίου. Η αιθανόλη, στη συνέχεια προκαλεί καθίζηση των υπολοίπων πηκτινικών ουσιών, στο τέλος της αλκοολικής ζύμωσης. Έτσι, ο οίνος είναι πρακτικά απαλλαγμένος από τις πηκτινικές ουσίες του γλεύκους (Ribéreau-Gayon, P. et al., 2006, Barnavon, L., et al., 2000).

Τα ώριμα σταφύλια είναι πλούσια σε πηκτινομεθυλεστεράση και σε πολυγαλακτουρονάσες, αλλά δεν περιέχουν πηκτινικές λυάσες (EC 4.2.2.10). Η πηκτινομεθυλεστεράση (EC 3.1.1.11) απελευθερώνει τα όξινα μέρη των γαλακτουρονικών μονάδων, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση της μεθανόλης στο γλεύκος. Έχει εξειδίκευση στο γαλακτουρονικό οξύ και δεν αποεστεροποιεί πλήρως την πηκτίνη. Η πηκτινομεθυλεστεράση του σταφυλίου είναι θερμοανθεκτική και έχει βέλτιστο pH 7-8. Η δραστηότητά της μειώνεται στο pH του γλεύκους, αλλά η προηγούμενη δράση της στο σταφύλι έχει σαν αποτέλεσμα την έντονη μείωση του βαθμού εστεροποίησης των πηκτινικών ουσιών που έχουν ελευθερωθεί στο γλεύκος. Αυτή η δράση είναι πολύ σημαντική, γιατί η πολυγαλακτουρονάση (EC 3.2.1.15) μπορεί να δράσει μόνο στα τμήματα των γαλακτουρονικών μονάδων που δεν είναι εστεροποιημένα. Δύο είδη πολυγαλακτουρονάσης υπάρχουν στο σταφύλι, οι

εξωπολυγαλακτουρονάσες που ασκούν τη δράση τους κατ' εξακολούθηση, ξεκινώντας κυρίως από το μη αναγωγικό άκρο της πολυγαλακτουρονικής αλυσίδας, και οι ενδοπολυγαλακτουρονάσες (EC 3.2.1.15) που δρουν τυχαία στο εσωτερικό μέρος της αλυσίδας, υδρολύοντας πηκτίνες χαμηλού βαθμού εστεροποίησης. Στη δεύτερη περίπτωση, παρά το γεγονός ότι η υδρόλυση της πηκτινικής αλυσίδας είναι περιορισμένη, η ενδοπολυγαλακτουρονική δραστηριότητα οδηγεί σε γρήγορη και έντονη μείωση του ιξώδους του γλεύκους. Το ιξώδες μειώνεται κατά το ήμισυ όταν σπάσουν λιγότεροι από το 5% των γλυκοζιτικών δεσμών. Οι πολυγαλακτουρονάσες των σταφυλιών διατηρούν μια αξιοσημείωτη δραστικότητα στο pH του γλεύκους (έχουν μέγιστη δραστικότητα σε pH 4-5) (Canal-Llauberes, R.-M. 1993, Ribèreau-Gayon, P. et al., 2006).

Όταν ο *Botrytis cinerea* προσβάλλει τα σταφύλια, συνθέτει κυτταρινάσες, πηκτινάσες και πρωτεάσες που καταστρέφουν τα κυτταρικά τοιχώματα. Εκτός από τις πηκτινομεθυλεστεράσες και τις πολυγαλακτουρονάσες, ο *Botrytis cinerea* παράγει και μια λυάση, η οποία σπάει τις πηκτινικές αλυσίδες με β-απόσπαση. Αυτή η δραστικότητα ενδολυάσης δεν επηρεάζεται από τον βαθμό εστεροποίησης των καρβοξυλομάδων των γαλακτουρονικών μονάδων. Όλα τα πηκτινολυτικά ένζυμα του μύκητα έχουν βέλτιστο pH κοντά στο 5, και συνεπώς είναι πολύ αποτελεσματικά σε προσβεβλημένα σταφύλια. Έτσι, το γλεύκος που προκύπτει από προσβεβλημένα σταφύλια περιέχει πολύ λίγες πηκτινικές ουσίες. Στη γλυκάνη, πολυσακχαρίτη που εκκρίνεται από τον *Botrytis cinerea*, αποδίδεται το ιξώδες του γλεύκους αυτού (Ribèreau-Gayon, P. et al., 2006, Bhat, M.K., 2000, Kang, H.-C. and Lee, S.-H., 2001).

Τα πηκτινολυτικά ένζυμα που παράγονται από το σταφύλι ή από τους μύκητες, είναι πολύ ανθεκτικά στο διοξείδιο του θείου. Η δραστικότητά τους μειώνεται σε θερμοκρασίες μικρότερες των 15°C και μεγαλύτερες των 60 °C (Ribèreau-Gayon, P. et al., 2006).

2.6.1.2 Οξειδωτικά

Εκτός όμως από τα υδrolυτικά ένζυμα, στο σταφύλι περιέχονται και οξειδωτικά ένζυμα. Η καταστροφή της κυτταρικής δομής των σταφυλιών κατά τις προζυμωτικές διεργασίες συνοδεύεται από ενζυμικές οξειδώσεις. Η

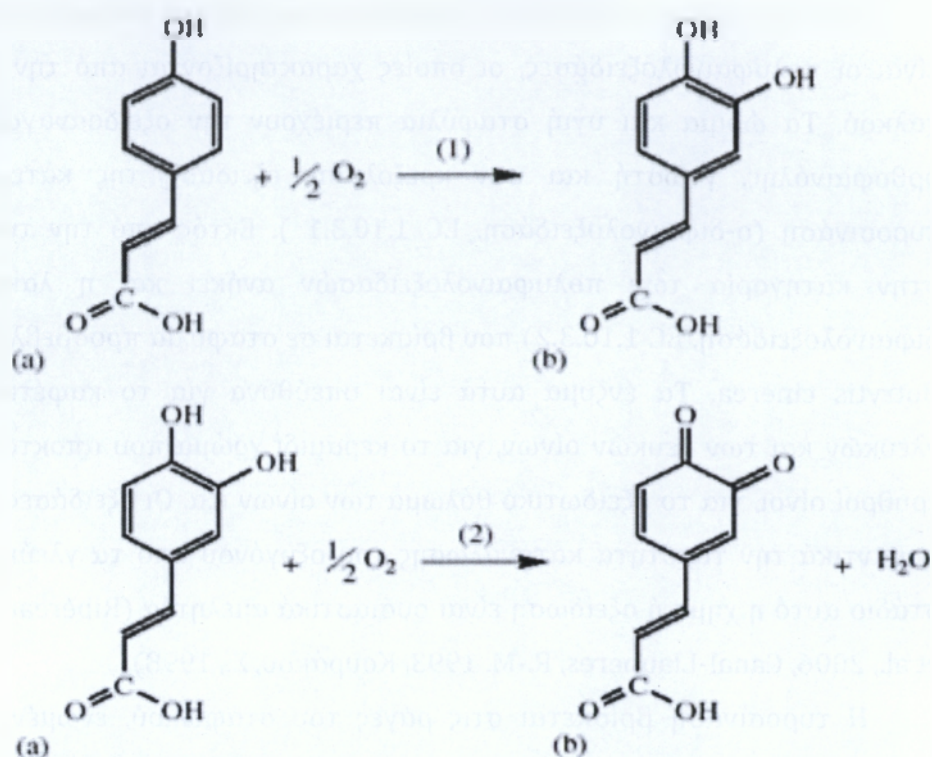
κατανάλωση του οξυγόνου κυμαίνεται από 0.5 μέχρι 5 mg/L/min, ανάλογα με την προέλευση του γλεύκους. Αυτή η διακύμανση οφείλεται κατά κύριο λόγο στην οξείδωση των φαινολικών συστατικών. Η οξείδωσή τους επιταχύνεται πάρα πολύ από την παρουσία οξειδασών και είναι περισσότερο έκδηλη στα γλεύκη και στη σταφυλομάζα, παρά στους οίνους.

Τα ένζυμα που εμπλέκονται στην οξείδωση των φαινολικών συστατικών είναι οι πολυφαινολοξειδάσες, οι οποίες χαρακτηρίζονται από την παρουσία χαλκού. Τα ώριμα και υγιή σταφύλια περιέχουν την οξειδοαναγωγή της ορθοφαινόλης, γνωστή και σαν κρεζολάση, οξειδάση της κατεχόλης και τυροσινάση (ο-διφαινολοξειδάση, EC 1.10.3.1). Εκτός από την τυροσινάση, στην κατηγορία των πολυφαινολοξειδασών ανήκει και η λακκάση (π-διφαινολοξειδάση, EC 1.10.3.2) που βρίσκεται σε σταφύλια προσβεβλημένα από *Botrytis cinerea*. Τα ένζυμα αυτά είναι υπεύθυνα για το καφέτιασμα των γλευκών και των λευκών οίνων, για το κεραμιδί χρώμα που αποκτούν οι νέοι ερυθροί οίνοι, για το οξειδωτικό θόλωμα των οίνων κ.α. Οι οξειδάσες αυξάνουν σημαντικά την ταχύτητα κατανάλωσης του οξυγόνου από τα γλεύκη και στο στάδιο αυτό η χημική οξείδωση είναι ουσιαστικά αμελητέα (Ribèreau-Gayon, P. et al., 2006, Canal-Llauberes, R.-M. 1993, Κουράκου, Σ., 1998).

Η τυροσινάση βρίσκεται στις ράγες του σταφυλιού, ενωμένη με τους χλωροπλάστες. Κατά την έκθλιψη των ραγών ένα μέρος της διαλύεται στο γλεύκος, ενώ το υπόλοιπο παραμένει ενωμένο με τους χλωροπλάστες. Έτσι, κατά τη λευκή οينوποίηση, το μέρος που βρίσκεται ενωμένο με τους χλωροπλάστες απομακρύνεται με την απολάσπωση του γλεύκους, ενώ όταν γίνει προσθήκη μπεντονίτη, προσροφάται σχεδόν όλη η τυροσινάση. Πρέπει να αναφερθεί πως η τυροσινάση καταστρέφεται, κατά μεγάλο μέρος, κατά τη διάρκεια των οξειδώσεων που καταλύει. Σε γλεύκη που δεν έχουν θειωθεί, η επαφή τους με τον αέρα αυξάνει σε πρώτη φάση τη δράση της τυροσινάσης, αλλά στη συνέχεια η δράση της μειώνεται (Κουράκου, Σ., 1998, Ribèreau-Gayon, P. et al., 2006, Nunez-Delicado, E. et al., 2007).

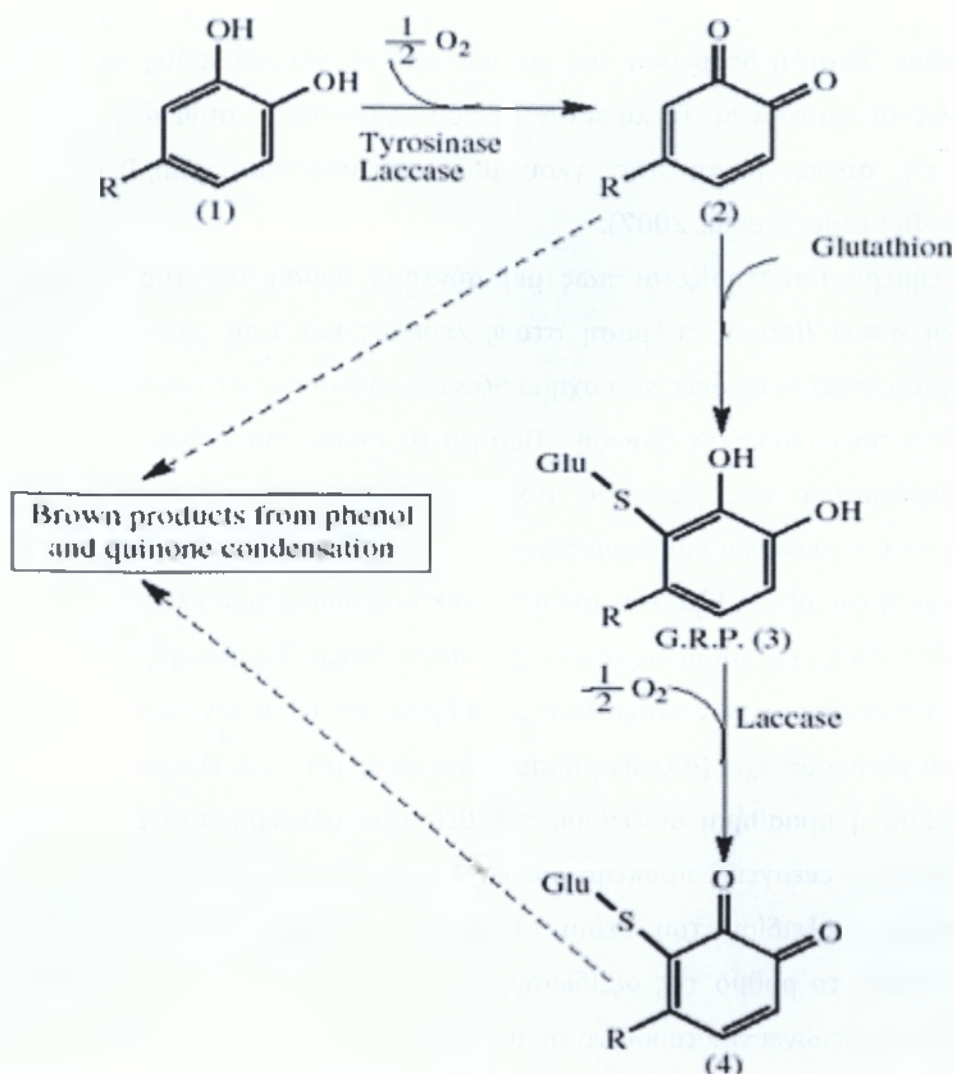
Σε γλεύκος από λευκά σταφύλια, η ενζυμική δράση επικεντρώνεται στην οξείδωση των τρυγικών παραγώγων των υδροξυκινναμωμικών οξέων (κυρίως καφεϊκό και κουμαρικό), που οδηγεί στην παραγωγή κινόνης, αλλά και στην πλειονότητα των φαινολικών συστατικών (Σχήμα 14). Η τυροσινάση οξειδώνει

τις μονοφαινόλες (κρεζολάση και μονοοξυγονάση της μονοφαινόλης EC 1.14.18.1) και τις διφαινόλες (κατεχολάση και κατεχολοξειδάση, EC 1.10.3.1) σε κινόνες.



Σχήμα 14 : Δράση της τυροσινάσης στα υδροξυκινναμωμικά οξέα. (1) Δράση κρεζολάσης (2) Δράση κατεχολάσης: (Ribéreau-Gayon 2006).

Η παραγωγή κινόνης είναι το πρώτο στάδιο της καστανώσης, ενώ οι επόμενες αντιδράσεις που οδηγούν στο σχηματισμό καστανών χρωστικών και άλλων προϊόντων, δεν είναι ενζυμικές (Ribéreau-Gayon, P. et al., 2006, Canal-Llauberes, R.-M. 1993, Rodriguez-Lopez, J. et al., 1991, Sanchez-Ferrer, A. et al., 1988, Weemaes, C. A. et al., 1998).



Σχήμα 15 : Μηχανισμός οξείδωσης από τυροσινάση και λακκάση(Ribereau-Gayon 2006).

Οι κινόνες που προκύπτουν είναι ασταθείς και είναι πιθανό να εμπλακούν σε δύο διαφορετικές αντιδράσεις (Σχήμα 15). Αρχικά, αυτές οι ιδιαίτερα δραστικές κινόνες μπορούν να συμπυκνωθούν με άλλα φαινολικά συστατικά, προς σχηματισμό πολυμερισμένων προϊόντων. Το χρώμα τους εξελίσσεται από κίτρινο σε καφέ, ανάλογα με το βαθμό συμπύκνωσης. Οι κινόνες είναι επίσης επιρρεπείς στην αντίδραση με έντονα αναγωγικά μόρια, όπως η γλουταθειόνη. Η αντίδραση αυτή παράγει ένα άχρωμο παράγωγο, το S-glutathionyl-2-trans-cafeoyltartaric acid, γνωστό σαν Grape Reaction Product. Το προϊόν αυτό δεν

οξειδώνεται από την τυροσινάση και έτσι δεν τροποποιεί το χρώμα του γλεύκους. Έτσι, η δέσμευση της κινόνης από τη γλουταθειόνη περιορίζει τα οξειδωτικά φαινόμενα. Το καφέτιασμα του γλεύκους, συνεπώς εξαρτάται από τη συγκέντρωση της γλουταθειόνης (Ribéreau-Gayon, P. et al., 2006, Nunez-Delicado, E. et al., 2007).

Σήμερα υποστηρίζεται πως μια σύντομη δράση της τυροσινάσης στα γλεύκη ασκεί θετική επίδραση στους λευκούς και τους ροζέ οίνους. Αυτό συμβαίνει γιατί οι κινόνες που σχηματίζονται, ανάγονται στη συνέχεια, κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης. Όσο για τις ενώσεις που είναι υπεύθυνες για το καφέτιασμα του γλεύκους, αυτές προσροφώνται από τις κυτταρικές μεμβράνες των ζυμών και απομακρύνονται με την οινολάσπη, κατά την πρώτη μετάγγιση του οίνου. Εξάλλου, αυτή η μερική οξείδωση των γλευκών περιορίζει την τάση για καφέτιασμα των οίνων που παράγονται (Κουράκου, Σ., 1998).

Η τυροσινάση των σταφυλιών είναι δραστική, αλλά δεν είναι σταθερή στο pH του γλεύκους, έχει βέλτιστη δραστικότητα σε pH 4.75. Θερμοκρασίες πάνω από 55°C ή προσθήκη διοξειδίου του θείου μεγαλύτερη από 50 mg/L είναι απαραίτητες ενέργειες προκειμένου να παρεμποδιστεί η δράση του ενζύμου. Προσθήκη διοξειδίου του θείου σε μικρότερη ποσότητα μπορεί μόνο να επιβραδύνει το ρυθμό της οξείδωσης. Τέλος, η επεξεργασία του γλεύκους με μπεντονίτη μειώνει την τυροσινάση που βρίσκεται σε διαλυτή μορφή (Ribéreau-Gayon, P. et al., 2006, Ramon Ros, J. et al., 1994).

Σύμφωνα με κάποιες απόψεις, στην οينوποίηση για την παρασκευή λευκών και ροζέ οίνων δε χρειάζεται θείωση του γλεύκους, όταν τα σταφύλια είναι υγιή και σε καλή κατάσταση. Στην περίπτωση αυτή αρκεί ψύξη του γλεύκους, άμεση απολάσπωση και εμβολιασμός με καλλιέργεια ζύμης, ώστε να αρχίσει η αλκοολική ζύμωση χωρίς καθυστερήσεις. Όσο για τις ερυθρές οينوποιήσεις, η θείωση είναι ουσιαστικά περιττή, γιατί οι ταννίνες, καθώς ενώνονται με το πρωτεϊνικό μέρος του ενζύμου, απενεργοποιούν την τυροσινάση (Κουράκου, Σ., 1998).

Οι ταννίνες μπορούν να εμπλακούν στη δημιουργία θολώματος, αφού μετά από έκθεση στο οξυγόνο, οξειδώνονται και πολυμερίζονται σε κολλοειδή καφέ χρώματος, που προκαλούν το οξειδασικό θόλωμα. Αμέσως μετά από το σπάσιμο των ραγών οι αντιδράσεις αυτές γίνονται αργά χωρίς τη συμμετοχή ενζύμων και

μπορούν να περιοριστούν με την προσθήκη διοξειδίου του θείου. Όμως τα σταφύλια που είναι προσβεβλημένα από *Botrytis cinerea* είναι ιδιαίτερα επιρρεπή στο οξειδασικό θόλωμα (Jackson, R. S., 2008).

Η οξείδωση των φαινολικών συστατικών είναι πολύ πιο επικίνδυνη όταν τα σταφύλια είναι προσβεβλημένα από *Botrytis cinerea*, ο οποίος οξειδώνει όλα τα φαινολικά οξέα, εκτός από το γαλλικό. Μετά την προσβολή τους, τα σταφύλια περιέχουν λακκάση που είναι οξειδοαναγωγή της π-φαινόλης. Αντίθετα με την τυροσινάση, η λακκάση είναι σταθερή στο pH του γλεύκους, με μέγιστη δράση σε τιμές 3-5. Όσον αφορά στο θειώδη ανυδρίτη, ακόμα και όταν προστίθεται σε υψηλές συγκεντρώσεις, επιφέρει περιορισμένη αναστολή στη δράση της. Αυτό ισχύει στα γλεύκη, διότι στον οίνο, όπου υπάρχει συνέργεια με την αλκοόλη, η δράση του θειώδους ανυδρίτη ενισχύεται σημαντικά. Για το λόγο αυτό, η αύξηση της προσθήκης θειώδους ανιδρύτη σε γλεύκη από σάπια σταφύλια πρέπει να αποφεύγεται (Κουράκου, Σ., 1998).

Η λακκάση, αντίθετα με την τυροσινάση, είναι εξολοκλήρου διαλυτή και έτσι δεν απομακρύνεται κατά την απολάσπωση του γλεύκους, ενώ δεν της ασκούν ιδιαίτερη επίδραση ο μπεντονίτης και οι ταννίνες. Ο μόνος παράγοντας που επενεργεί είναι η θερμοκρασία, έτσι μια σύντομη θέρμανση του γλεύκους ή της σταφυλομάζας, για 5 μόνο λεπτά στους 80 °C, έχει ως συνέπεια να χάσει η λακκάση τη δραστηριότητά της. Στους 50°C η λακκάση καταστρέφεται γρηγορότερα από την τυροσινάση (Ribéreau-Gayon, P. et al., 2006, Κουράκου, Σ., 1998).

Η λακκάση έχει ευρύ πεδίο οξειδωτικής δράσης, και οξειδώνει έναν μεγάλο αριθμό φαινολικών υποστρωμάτων, αλλά και άλλες ενώσεις, σε αντίθεση με την τυροσινάση, που έχει μεγάλη εξειδίκευση. Οξειδώνει τα σύμπλοκα φαινόλης-γλουταθειόνης σε κινόνη. Η γλουταθειόνη με τον τρόπο αυτό δεν μπορεί πλέον να παγιδεύει κινόνη. Πρέπει ακόμα να αναφερθεί πως η λακκάση παράγει πολύ περισσότερα προϊόντα συμπύκνωσης καφέ χρώματος από την ίδια αρχική ποσότητα φαινολικών συστατικών σε σχέση με την τυροσινάση (Ribéreau-Gayon, P. et al., 2006, Goetz, G. et al., 1999, Marbach, I. et al., 1984).

Εάν η συγκέντρωση της γλουταθειόνης είναι υψηλή, η κινόνη μπορεί μερικά να αναχθεί σε φαινόλη με τη δέσμευση ενός ακόμα μορίου γλουταθειόνης. Τα νέα αυτά παράγωγα δεν μπορούν πλέον να οξειδωθούν από

τη λακκάση. Τα οξειδωτικά φαινόμενα και το καφέτιασμα, με τον τρόπο αυτόν περιορίζονται. Η αντίδραση αυτή όμως δεν μπορεί να συμβεί σε γλεύκος που έχει προκύψει από σταφύλια προσβεβλημένα από *Botrytis cinerea*. Ο ρυθμός κατανάλωσης του οξυγόνου δεν θα υπερβεί αυτόν που συμβαίνει σε γλεύκος από υγιή σταφύλια, αλλά η δράση του διοξειδίου του θείου είναι βραδύτερη. Τα προσβεβλημένα σταφύλια περιέχουν πολύ περισσότερες οξειδάσες οι οποίες επίσης καταναλώνουν οξυγόνο (Ribéreau-Gayon, P. et al., 2006).

Οι υπεροξειδάσες των σταφυλίων δραστηριοποιούνται κυρίως στα χυμοτόπια. Ο ρόλος τους είναι σημαντικός όσον αφορά στον οξειδωτικό μεταβολισμό των φαινολικών συστατικών κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης. Κατά τις προζυμωτικές επεξεργασίες, η δραστηριότητά τους περιορίζεται από την έλλειψη του υπεροξειδίου. Μια χαμηλή συγκέντρωση διοξειδίου του θείου είναι αρκετή για να καταστρέψει τις υπεροξειδάσες (Liao, X.R. et al., 1999, Ribéreau-Gayon, P. et al., 2006, Castellari, M., et al., 1997, Commenil, P. et al., 1997, Goetghebeur, M. et al., 1992).

2.6.2 Χρήση εμπορικών σκευασμάτων ενζύμων

Η ευεργετική δράση των διάφορων υδρολυτικών ενζύμων του σταφυλιού συχνά περιορίζεται από το pH του γλεύκους ή από την ανεπαρκή δραστηριότητα 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*). Μάλιστα η έρευνα στον τομέα αυτό εξακολουθεί να επικεντρώνει το ενδιαφέρον των επιστημόνων. Το ενζυμικό προφίλ των παρασκευασμάτων που είναι διαθέσιμα ήδη στην αγορά δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί πλήρως. Η προσθήκη τους γίνεται σε μικρό χρονικό διάστημα μετά το σπάσιμο των σταφυλίων προκειμένου είτε να διασφαλιστεί η αύξηση της απόδοσης σε γλεύκος, είτε να επιτευχθεί η βελτίωση της διαδικασίας του φιλτραρίσματος του οίνου. Επίσης με την προσθήκη κατάλληλων ενζύμων βελτιώνεται η εκχύλιση των χρωστικών αλλά και άλλα ποιοτικά χαρακτηριστικά του γλεύκους, όπως η ικανότητα διαύγασης, η ευκολία διεξαγωγής της ζύμωσης και η ένταση του αρώματος, τόσο στη λευκή όσο και στην ερυθρή οινοποίηση (Jackson, R.S., 2008, Fernandez, M. et al., 2000).

2.6.2.1 Εξαγωγή του γλεύκους

Η προσθήκη πηκτινολυτικών ενζύμων στα σπασμένα σταφύλια μπορεί να βελτιώσει την εξαγωγή του γλεύκους ορισμένων ποικιλιών που είναι πολύ πλούσιες σε πηκτινικές ουσίες. Τα εμπορικά παρασκευάσματα περιέχουν διάφορα ένζυμα, τα οποία είναι ενεργά σε χαμηλά pH: πηκτινομεθυλεστεράσες, πολυγαλακτουρονάσες, πηκτινικές λυάσες και ημικυτταρινάσες. Όταν προστεθούν σε συγκέντρωση 2-4 g/hL, είναι δυνατό να αυξήσουν η 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. Τα παρασκευάσματα αυτά όμως περιέχουν επίσης και διάφορες γλυκοζιδάσες και πρωτεάσες, οι οποίες ευθύνονται για δευτερογενείς τροποποιήσεις. Είναι λοιπόν ευνόητο πως ο βαθμός καθαρότητας των εμπορικών ενζύμων είναι ένα θέμα ιδιαίτερα σημαντικό (Jackson, R.S., 2008, Gil, J.V. et al., 2001, Roldan, A. et al., 2006)

2.6.2.2 Διαύγαση του γλεύκους

2.6.2.2.1 Πηκτινάσες

Οι πηκτινικοί και άλλοι πολυσακχαρίτες μπορεί να προκαλέσουν δυσκολίες κατά τη διεξαγωγή του φιλτραρίσματος, αλλά και να δημιουργήσουν θόλωμα. Οι πολυσακχαρίτες δρουν σαν προστατευτικά κolloειδή, καθώς συνδέονται με άλλα αιωρούμενα σωματίδια και επιβραδύνουν ή αποτρέπουν την καθίζησή τους. Για παράδειγμα, οι αρνητικά φορτισμένες πηκτίνες περιβάλλουν τα θετικά φορτισμένα στερεά σωματίδια του σταφυλιού, εμποδίζοντας τη συσσωμάτωσή τους. Επιπλέον, πολλαπλοί δεσμοί υδρογόνου σχηματίζονται μεταξύ του νερού και την πηκτινών, βοηθώντας έτσι τη διατήρηση αυτών των συμπλοκών σε αιώρηση και αποτρέποντας την καθίζησή τους (Jackson, R.S., 2008, Bryne, N.D., et al., 2001, Guadalupe, Z. et al., 2007, Kammerer, D., et al., 2005, Villano, D. et al., 2006). Η περιεκτικότητα σε πηκτινικές ενώσεις εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, μεταξύ των οποίων οι σημαντικότεροι είναι η ποικιλία, ο βαθμός ωριμότητας, αλλά και τεχνολογικές παράμετροι, όπως οι συνθήκες πίεσης (Canal-Llauberes, R.-M. 1993).

Άλλοι πολυσακχαρίτες του σταφυλιού, όπως οι αραβινάνες, και οι

γαλακτάνες έχουν μικρή επίδραση στη δημιουργία του θαλώματος και στο φιλτράρισμα. Το ίδιο ισχύει και για τις μαννάνες που προέρχονται από τις ζύμες. Παρόλα αυτά, η απομάκρυνσή τους είναι επιθυμητή, καθώς συμβάλλει στην μείωση της απόδοσης σε οίνο κατά τα επόμενα στάδια της οινοποίησης.

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 (Jackson, R.S., 2008).

Τα πηκτινολυτικά παρασκευάσματα μειώνουν το ιξώδες του λευκού γλεύκους και έτσι επιταχύνεται η δημιουργία ιζήματος. Σε λιγότερο από και ώρα η κολλοειδής ισορροπία απορρυθμίζεται, με αποτέλεσμα την ταχεία καθίζηση και την αύξηση της διαύγειας του γλεύκους. Αυτή η επεξεργασία μπορεί να οδηγήσει σε υπερβολική διαύγαση του γλεύκους και έτσι η εφαρμογή της θα πρέπει να καθορίζεται από τη σύσταση του γλεύκους. Η ενζυμική υδρόλυση των πηκτινικών συστατικών γίνεται αντιληπτή με την αισθητή βελτίωση της διαδικασίας του φιλτραρίσματος των γλευκών και των οίνων που προκύπτουν.

Στην ερυθρή οινοποίηση, αυτά τα σκευάσματα χρησιμοποιούνται συγκεκριμένα για οίνους πίεσης, αλλά και για περιπτώσεις όπου υπάρχει θερμική επεξεργασία των σταφυλιών και του γλεύκους. Στη δεύτερη περίπτωση το γλεύκος είναι ιδιαίτερα πλούσιο σε πηκτινικά συστατικά, ενώ του λείπουν τα ενδογενή ένζυμα, τα οποία έχουν καταστραφεί κατά τη θερμική επεξεργασία, αφού είναι θερμοευαίσθητα. Τα πηκτινολυτικά ένζυμα μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν μετά από την ολοκλήρωση της φάσης της παραδοσιακής εκχύλισης (Ribéreau- Gayon, P. et al., 2006, Jackson, R. S., 2008).

Ένα μειονέκτημα της υπερβολικής έκθεσης σε πηκτινολυτικά ένζυμα είναι η παραγωγή λεπτόκκοκων υλικών από το σταφύλι, τα οποία μπορεί να δημιουργήσουν προβλήματα στη διαύγαση (Jackson, R. S., 2008).

2.6.2.2.2 Γλυκανάσες

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 στον παραγόμενο οίνο. 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 (Humbert-Goffard, A. et al., 2004, Palomero, F. et al., 2007).

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 οίνων, όπου η αλκοόλη προκαλεί την έντονη συσσωμάτωση των μορίων της.

Η χρήση εμπορικών σκευασμάτων που περιέχουν β-γλυκανάσες (ένδο-, EC 3.2.1.6.) 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 μέρες 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 οίνου (Ribéreau-Gayon, P. et al., 2006, Jackson, R. S., 2008).

2.6.2.3 Εκχύλιση χρώματος και σταθεροποίηση

Η προσθήκη πηκτινολυτικών ενζύμων στην αρχή του σταδίου της εκχύλισης διευκολύνει την εξαγωγή των φαινολικών συστατικών από τα στερεά μέρη του σταφυλίου. Έτσι, ο οίνος που προκύπτει είναι πλουσιότερος 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. Η επεξεργασία αυτή επίσης βελτιώνει τους οργανοληπτικούς χαρακτήρες, κυρίως τη δομή του οίνου, 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 (Ribéreau-Gayon, P. et al., 2006, Bautista-Ortin, A.B., et al., 2007, Kelebek, H. et al., 2007, Landbo, A.K. and Meyer, A.S., 2001, Landbo, A.K. and Meyer, A.S., 2004, Meyer, A.S. et al., 1998, Pardo, F. et al., 1999, Pinelo, M. et al., 2006, Revilla, I. et al., 2003).

Η δράση των πηκτινολυτικών ενζύμων που προστίθενται κατά την οиноποίηση προκειμένου να βελτιώσουν το χρώμα των παραγόμενων οίνων σχετίζεται με το μούλιασμα των στεμφύλων και συγκεκριμένα 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 στους ελαφρά χρωματισμένους ερυθρούς οίνους, όπου κυρίως ελευθερώνουν περισσότερες ταννίνες, οι οποίες δρουν σταθεροποιώντας το χρώμα (Jackson, R. S., 2008, Munoz, O. et al., 2004, Perez-Lamela, C. et al., 2007).

Κατά την οиноποίηση ερυθρών ποικιλιών τα εμπορικά παρασκευάσματα πηκτινολυτικών ενζύμων πρέπει να περιλαμβάνουν ελάχιστα ή ακόμα καλύτερα καθόλου ένζυμα με δράση επί των ανθοκυανών, όπως η β-γλυκοζιδάση, η οποία μπορεί να μειώσει τα χρωματικά χαρακτηριστικά του οίνου, υποβαθμίζοντας έτσι την ποιότητά του (Todaro, A. et al., 2008, Jackson, R. S., 2008). Επίσης, χρειάζεται προσοχή κατά την επιλογή και χρήση πηκτινολυτικών ενζύμων στην παραγωγή αφρωδών οίνων, αφού προκαλούν μείωση του αφρισμού, εξαιτίας της μείωσης που επιφέρουν στην ποσότητα των πολυσακχαριτών και των πρωτεϊνών του μέσου (Lao, S. et al., 1999).

2.6.2.4 Απελευθέρωση αρώματος

Οι γλυκοζιδάσες που περιέχονται στα εμπορικά πηκτινολυτικά παρασκευάσματα έχουν την ικανότητα να υδρολύουν, σε ένα βαθμό, τους τερπενικούς γλυκοζίτες. Οι πρώτες δοκιμές που έγιναν στα ένζυμα αυτά πραγματοποιήθηκαν σε ξηρούς οίνους, εξαιτίας της παρεμποδιστικής δράσης που ασκεί η γλυκόζη στη β-γλυκοζιδάση.

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 αιθυλοφαινόλων, που έχουν χαρακτηριστική δυσάρεστη οσμή ζώου (Ribéreau-Gayon, P. et al., 2006, Gunata, Z. et al., 1994, Lecas, M. et al., 1991, Palmeri, R. et al., 2006, Pineiro, Z. et al., 2006).

2.6.2.5 Δευτερεύουσες δραστηριότητες παρασκευασμάτων

Τα ενζυμικά παρασκευάσματα εκτός από τα κυρίως ένζυμα, περιέχουν και άλλα, τα οποία έχουν διάφορες επιδράσεις στο παραγόμενο προϊόν, σε κάποιες περιπτώσεις επιθυμητές, ενώ ορισμένες φορές ανεπιθύμητες.

Τα σκευάσματα πηκτινάσης περιέχουν κυρίως πηκτινική λυάση αλλά έχουν και άλλες ιδιότητες. Ανάλογα με τη χρήση τους, διατίθενται διάφοροι συνδυασμοί. Η δράση της πηκτινικής λυάσης στις πηκτίνες του σταφυλίου, οι οποίες είναι πολύ μεθυλιωμένες, απελευθερώνει μεθανόλη, ενώ παρασκευάσματα με πολυγαλακτουρονάση και πηκτινομεθυλεστεράση ελευθερώνουν λιγότερη μεθανόλη. Επιπρόσθετες ενζυμικές δραστηριότητες, όπως αυτές των ημικυτταρινασών, συμβάλλουν στη βελτίωση της εκχύλισης του χρώματος και στην ικανότητα φιλτραρίσματος. (Jackson, R. S., 2008, Revilla, I. and González-San José, M. L. 1998, Zocca, F. et al., 2007).

Ένα ενδεχόμενο πρόβλημα που δημιουργείται με τη χρήση

πηκτινολυτικών παρασκευασμάτων, αλλά και κατά τη διεξαγωγή της μηλογαλακτικής ζύμωσης, είναι η σύνθεση βινυλοφαινολών. Τα περισσότερα πηκτινολυτικά σκευάσματα περιέχουν κινναμωμική εστεράση, η οποία σπάει τους εστερικούς δεσμούς μεταξύ υδροξυκινναμωμικών και τρυγικού οξέος (κυρίως καφεοτρυγικό), με αποτέλεσμα την παραγωγή φαινολικών οξέων. Παρουσία κάποιων στελεχών του *Saccharomyces cerevisiae* που παράγουν αποκαρβοξυλάσες, τα φαινολικά οξέα αποκαρβοξυλιώνονται σε βινυλοφαινόλες (4-βινυλοφαινόλη και 4-γουαϊακόλη). Σε συγκεντρώσεις που υπερβαίνουν το κατώφλι αντίληψης, οι βινυλοφαινόλες δημιουργούν μια δυσάρεστη φαινολική οσμή. Ακόμα πιο σημαντικό είναι το γεγονός ότι μπορούν να μεταβολιστούν σε επίσης δύσσομες αιθυλοφαινόλες, από πολλά στελέχη του *Brettanomyces* (Jackson, R. S., 2008, Cabrita, M.J. et al., 2007).

Ορισμένα σκευάσματα πηκτινάσης μπορεί ακόμα να περιέχουν β-γλυκοζιδάση. Αυτό έχει επιθυμητά αποτελέσματα σε περίπτωση που απελευθερώνονται αρωματικά συστατικά από τους γλυκοζίτες τους. Η δράση της είναι επιθυμητή όταν πρόκειται για τερπένια ή νορισστερπενοειδή, αλλά όχι στην περίπτωση παραγωγής πτητικών φαινολών, αφού η παρουσία τους οδηγεί στην απώλεια του φρουτώδους χαρακτήρα και προσδίδει οσμές δέρματος, βερνικιού και στάβλου. Έτσι είναι φανερό πως τα σκευάσματα πηκτινάσης μπορεί να επιδράσουν στο άρωμα, μερικές φορές με ανεπιθύμητα αποτελέσματα. Οι ερυθροί οίνοι είναι λιγότερο ευάλωτοι σε τέτοιου είδους αλλοίωση του αρώματος. Αυτό οφείλεται σε ένα βαθμό στα πιο έντονα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των ερυθρών οίνων και στην τάση των πτητικών φαινολών να συνδέονται με ταννίνες.

Από τα ενζυμικά παρασκευάσματα που διατίθενται στο εμπόριο περισσότερο έχει μελετηθεί η β-γλυκοζιδάση, αν και συνήθως αποτελεί μίξη μαζί με α-αραβινοζιδάση, α-ραμνοζιδάση, β-ξυλανοζιδάση και β-απιοζιδάση, τα οποία βελτιώνουν τη δράση της β-γλυκοζιδάσης. Η παρουσία τους αποδίδεται στην ύπαρξη αρωματικών ενώσεων, οι οποίες είναι συνδεδεμένες με σάκχαρα εκτός της γλυκόζης. Τα σάκχαρα αυτά πρέπει να απομακρυνθούν πριν την έναρξη της δράσης της γλυκοζιδάσης. Το αποτέλεσμα της βελτίωσης αυτής του αρώματος θα πρέπει να εξακριβωθεί με δοκιμές, αφού τα αρώματα που ενδέχεται να προκύψουν μπορεί να διαστρεβλώσουν τα χαρακτηριστικά αρώματα της

ποικιλίας ή να καταστρέψουν τη δυνατότητα της αργής απελευθέρωσης αρωμάτων κατά την παλαίωση (Jackson, R. S., 2008).

Σύμφωνα με έρευνες, η β-γλυκοζιδάση που έχει παραχθεί από τον *Aspergillus niger*, προκαλεί αύξηση στα επίπεδα της trans ρεσβερατρόλης, η οποία μπορεί να φτάσει και το 75 %, παρουσιάζοντας μεγάλη εξειδίκευση, χωρίς να επηρεάζει τις φυσικοχημικές ιδιότητες του οίνου, αλλά ούτε και το μπουκέτο του. (Todaro, A. et al., 2008).

Κάποια ενζυμικά σκευάσματα προστίθενται συνήθως στο τέλος της αλκοολικής ζύμωσης. Τα σάκχαρα του γλεύκους παρεμποδίζουν την καταλυτική δράση των περισσότερων ενζύμων, παρά το γεγονός ότι η δράση των ενζύμων μπορεί να διακοπεί όταν αυτό χρειαστεί, με την προσθήκη παραγόντων όπως ο μπεντονίτης, η ακινητοποίηση των ενζύμων παρέχει ακόμα περισσότερες δυνατότητες στον έλεγχο της δράσης τους (Jackson, R. S., 2008, Caldini, C. et al., 1993, Tamborra, P. et al., 2004, Yildiz, H. B. et al., 2005).

Ένα άλλο ζήτημα στο οποίο έχει δοθεί ιδιαίτερη σημασία τα τελευταία χρόνια είναι η διαπίστωση της παρουσίας ουρεθάνης σε οίνους , ειδικά στην περίπτωση που έχουν θερμανθεί κατά την οινοποίηση. Η ουρεθάνη έχει απασχολήσει την επιστημονική κοινότητα εξαιτίας της ενδεχόμενης καρκινογόνου δράσης της. Παράγεται σαν παραπροϊόν αντίδρασης μεταξύ της αιθανόλης και της ουρίας. Η ουρία μπορεί να υπάρχει στον οίνο ως αποτέλεσμα του μεταβολισμού της αργινίνης, επειδή προστέθηκε σαν συμπλήρωμα αζώτου, ή λόγω της χρήσης αζωτούχων λιπασμάτων κατά την καλλιέργεια. Αν και η επιλογή του στελέχους της ζύμης και η αποφυγή της χρήσης ουρίας μπορούν να μειώσουν τη συσσώρευση της ουρεθάνης, η προσθήκη ουρεάσης συνίσταται όταν οι δράσεις αυτές δεν είναι αποτελεσματικές (Jackson, R. S., 2008). Η ουρεάση (EC 3.5.1.5) καταλύει την υδρόλυση της ουρίας σε διοξείδιο του άνθρακα και αμμωνία.

2.7 Προσδιορισμός φαινολικών συστατικών και μελέτη εμπορικών σκευασμάτων

2.7.1 Ολικές φαινόλες

Ο οίνος περιέχει πολλά φαινολικά συστατικά σε ευρέως κυμαινόμενες

ποσότητες. Η ιδανική μέθοδος για να εκτιμηθεί η περιεκτικότητα σε αυτά είναι προσδιοριστούν όλα και στη συνέχεια να μετρηθεί το καθένα ξεχωριστά. Κάτι τέτοιο όμως δεν είναι εφικτό, λόγω της ποικιλομορφίας των μορίων, σε συνδυασμό με τη δυσκολία της ανάλυσης του συνόλου τους. Επιπλέον, ακόμα και οι πιο αποτελεσματικές τεχνικές συχνά είναι ιδιαίτερα δύσχρηστες στην εφαρμογή τους, ενώ τα αποτελέσματα είναι ελλιπή και δύσκολα στην ερμηνεία τους. Έτσι, αν και οι μέθοδοι αυτές είναι χρήσιμες για ερευνητικούς σκοπούς, στην πραγματικότητα δεν εφαρμόζονται κατά την οινοποίηση.

Μια σφαιρική εκτίμηση του φαινολικού περιεχομένου του οίνου, εκφρασμένη με νούμερα, αποτελεί μια ιδιαίτερα ελκυστική ιδέα, αφού καθιστά δυνατή την ταξινόμηση των οίνων ανάλογα με το φαινολικό τους περιεχόμενο και εκτιμά τα αποτελέσματα των οινοποιητικών διεργασιών στην εκχύλιση αυτών των συστατικών. Βέβαια, η έκφραση μιας γενικής τιμής, με την έννοια του βάρους ορισμένων συστατικών (οινολογικές ταννίνες, γαλλικό οξύ, κατεχίνη κ.α.), τα οποία αντιπροσωπεύουν ένα μέρος, κάποιες φορές πολύ μικρό, των φαινολικών συστατικών του μέσου, δύσκολα μπορεί να δικαιολογηθεί.

Οι μέθοδοι που θα χρησιμοποιηθούν για την εκτίμηση των φαινολικών συστατικών του οίνου θα πρέπει να πληρούν τρεις βασικές προϋποθέσεις. Να είναι γρήγορες, τα αποτελέσματά τους να είναι επαναλήψιμα και να περιλαμβάνουν όλα τα φαινολικά μόρια. Οι διάφορες μέθοδοι βασίζονται στις χημικές ιδιότητες των μορίων αυτών.

Για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολών εφαρμόζονται δύο μέθοδοι, ο δείκτης ολικών φαινολών των Flanzky και Roux (1958) και Ribéreau-Gayon (1966), και η μέθοδος Folin Ciocalteu του Waterman and Mole (1994). Η μέθοδος του δείκτη των ολικών φαινολών, που γίνεται με τη μέτρηση της απορρόφησης στα 280 nm, είναι προτιμότερη από την Folin Ciocalteu, εξαιτίας των πολλών πλεονεκτημάτων της, τα οποία περιλαμβάνουν ταχύτητα και επαναληψιμότητα. Βέβαια, αν και οι βενζολικοί πυρήνες έχουν τη μέγιστη απορρόφηση σε αυτό το μήκος κύματος, ορισμένα μόρια, όπως τα κινναμωμικά οξέα και οι χαλκόνες, δεν παρουσιάζουν μέγιστο απορρόφησης στο ίδιο μήκος κύματος. Παρόλα αυτά, αφού τα μόρια αυτά απαντώνται στον οίνο σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, το σφάλμα της μέτρησης θεωρείται αμελητέο.

Με την εφαρμογή της μεθόδου του δείκτη των ολικών φαινολών, λοιπόν,

γίνεται και ο προσδιορισμός της συνεισφοράς των φαινολικών οξέων, αλλά και διάφορων μη φαινολικών ενώσεων. Η τιμή που αντιστοιχεί στις ενώσεις αυτές είναι σχεδόν σταθερή, με μέσο όρο το 7, για ερυθρούς και για λευκούς οίνους. Η τιμή αυτή συμφωνεί με την τιμή που προσδιόρισαν ο Somers και ο Ziemelis το 1985, χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Folin Ciocalteu. Αυτό αποτελεί σημαντικό παράγοντα για τους λευκούς και τους ροζέ οίνους, αφού αντιπροσωπεύει το 50 % της συνολικής τιμής τους.

Στους ερυθρούς οίνους μπορούμε να κάνουμε την παραδοχή πως η τιμή της απορρόφησης στα 280 nm ισούται με το άθροισμα της απορρόφησης των φαινολικών οξέων, αλλά και των διάφορων μη φαινολικών ενώσεων, που όπως αναφέρθηκε μπορεί να θεωρηθεί πως έχει την τιμή 7, με τις απορροφήσεις των ανθοκυανών και των ταννινών. Η τιμή αυτή μπορεί να τροποποιηθεί σε ένα βαθμό λόγω της αύξησης που προκαλείται στη συγκέντρωση του γαλλικού οξέος και των ελλαγιταννινών, κατά τη διάρκεια της παλαίωσης σε καινούρια βαρέλια. Ο συντελεστής που αντιστοιχεί στα μόρια αυτά είναι πολύ υψηλός, με τιμές γύρο στο 38 (η τιμή του δείκτη ολικών φαινολών κυμαίνεται από 6 έως 120). Αυτή η αύξηση διαρκεί περιορισμένο χρονικό διάστημα, λόγω της ταχείας οξειδωσης των συστατικών αυτών (Ribéreau-Gayon, P. et al., 2006).

Η μέθοδος Folin Ciocalteu έχει, για τους λόγους που αναφέρθηκαν, πιο περιορισμένη εφαρμογή. Η τιμή που δίνει κυμαίνεται από 10 έως 100. Βασίζεται στην οξείδωση των φαινολών σε αλκαλικό περιβάλλον, με μίγμα φωσφοροβολφραμικού και φωσφορομολυβδαινικού οξέος. Πρέπει να σημειωθεί ότι την ίδια αντίδραση δίνουν και άλλα συστατικά, όπως τα ανάγοντα σάκχαρα και τα νουκλεϊνικά οξέα, αυτό όμως δεν αποτελεί πρόβλημα όταν η μέθοδος εφαρμόζεται σε ξηρούς οίνους, όπου η περιεκτικότητα σε ανάγοντα σάκχαρα είναι της τάξης των 20 mg/L, οπότε η συνεισφορά τους στην τιμή της μέτρησης μπορεί να θεωρηθεί αμελητέα (Χαρβαλιά, Α. και Μπενά-Τζούρου, Ειρ., 1982, Ribéreau-Gayon, P. et al., 2006).

2.7.2 Ολικές ανθοκυάνες

Οι ανθοκυάνες βρίσκονται στον οίνο σε διάφορες μορφές, είτε σαν ελεύθερες ανθοκυάνες, είτε συνδυασμένες με ταννίνες. Από το σύνολο των ανθοκυανών, ορισμένες είναι αποχρωματισμένες από το διοξείδιο του θείου,

ενώ οι υπόλοιπες δεν έχουν επηρεαστεί. Για τον προσδιορισμό των ανθοκυανών δεν υπάρχει ακριβής μέθοδος, οπότε η τιμή τους μπορεί μόνο να εκτιμηθεί. Βέβαια, μια γενική τιμή για τις ελεύθερες ανθοκυάνες και για αυτές οι οποίες έχουν αποχρωματιστεί από το διοξείδιο του θείου, είναι δυνατόν να προσδιοριστεί, με τη χρήση χημικών και χρωματογραφικών μεθόδων.

Οι χημικές μέθοδοι βασίζονται σε συγκεκριμένες ιδιότητες των ανθοκυανών, όπως είναι η διαφοροποίηση του χρώματός τους, ανάλογα με την τιμή του pH και ο αποχρωματισμός τους από το διοξείδιο του θείου, και αναπτύχθηκαν από τους Ribéreau-Gayon και Stonestreet (1965). Και οι δύο αυτές μέθοδοι μετράνε το άθροισμα των ελεύθερων και των αποχρωματισμένων ανθοκυανών. Η μέθοδος που χρησιμοποιεί τις διαφορές ανάλογα με την τιμή του pH είναι πιο ευαίσθητη στην παρουσία ελεύθερου διοξειδίου του θείου στον οίνο, ενώ η μέθοδος του αποχρωματισμού είναι περισσότερο αξιόπιστη, οπότε και έχει ευρεία αποδοχή (Ribéreau-Gayon, P. et al., 2006).

2.7.3 Ολικές Ταννίνες

Οι ταννίνες των ερυθρών οίνων αποτελούνται από αλυσίδες πολυμερισμένων φλαβανολών (προκυανιδίνες). Οι προκυανιδίνες αυτές είτε είναι ομογενείς, με κανονικότητα στους δεσμούς τους, είτε είναι ετερογενείς, με διαφορετικούς δεσμούς. Και στις δύο περιπτώσεις, ορισμένοι δεσμοί σπάνε, όταν τα μόρια των ταννινών θερμανθούν σε όξινο περιβάλλον και τα καρβοκατιόντα που προκύπτουν μετατρέπονται σε κάποιο βαθμό σε μόρια κυανιδίνης, εάν το μέσο ευνοεί την οξειδωση. Η ιδιότητα αυτή χρησιμοποιείται στον προσδιορισμό των ταννινών, με τη μέθοδο LA των Ribéreau-Gayon και Stonestreet (1966), η οποία εφαρμόζεται εδώ και πολλά χρόνια, αφού παρουσιάζει υψηλή επαναληψιμότητα και είναι εύκολη στην εφαρμογή της (Ribéreau-Gayon, P. et al., 2006).

2.7.3.1 Χαρακτηριστικά των ταννινών

Εκτός από τη συγκέντρωση των ταννινών, είναι απαραίτητη η γνώση των χαρακτηριστικών τους που καθορίζουν τις ιδιότητές τους. Η ιδανική προσέγγιση στο ζήτημα αυτό θα ήταν ο διαχωρισμός και ο προσδιορισμός των διάφορων ταννικών μορίων. Χάρη στις τεχνικές υψηλής απόδοσης είναι εφικτή

η πραγματοποίηση τέτοιων αναλύσεων, αλλά η εφαρμογή τους εξακολουθεί να είναι δύσκολη.

Με τα δεδομένα αυτά, η χρήση των ορισμένων τιμών, οι οποίες βασίζονται σε συγκεκριμένες ιδιότητες των ταννινών, μπορούν να συνδράμουν στην ερμηνεία ορισμένων χαρακτηριστικών του οίνου, συμπεριλαμβανομένης της σταθερότητας και των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του. Οι ακόλουθοι δείκτες είναι συμπληρωματικοί και μας δίνουν μια ικανοποιητική γνώση των ταννικών χαρακτηριστικών των ερυθρών οίνων (Ribéreau-Gayon, P. et al., 2006).

2.7.3.1.1 Δείκτης υδροχλωρικού οξέος

Ο Δείκτης Υδροχλωρικού οξέος που προσδιορίζεται με τη μέθοδο του Glories (1978) εκφράζει το ποσοστό των πολυμερισμένων ταννινών του οίνου και εξαρτάται από τις συνθήκες παλαίωσης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η μείωση του πολυμερισμού, που παρατηρείται μετά το χειμώνα και τη διαύγαση, καθώς και μετά την πάροδο κάποιων ετών παλαίωσης σε φιάλη. Βασίζεται στην αστάθεια που εμφανίζουν οι προκυανιδίνες σε ένα έντονα όξινο, λόγω του υδροχλωρικού οξέος, περιβάλλον, όπου η ταχύτητα καθίζησης εξαρτάται από το βαθμό πολυμερισμού. Οι τιμές του δείκτη κυμαίνονται από 5 έως 40. Σε τιμές πάνω από 35-40 οι ταννίνες του οίνου καταβυθίζονται, οπότε η τιμή μειώνεται. Στην αρχή της παλαίωσης σε βαρέλι, ένας πολύ ελαφρύς οίνος έχει χαμηλή τιμή, μεταξύ 5 και 10. Αντίθετα, ο οίνος που είναι κατάλληλος για παλαίωση έχει τιμή 10-25, ενώ ο οίνος που έχει υψηλή συγκέντρωση σε πολύ έντονα πολυμερισμένα φαινολικά συστατικά έχει τιμή μεγαλύτερη από 25 (Ribéreau-Gayon, P. et al., 2006).

2.7.3.1.2 Δείκτης Ζελατίνης

Ο Δείκτης Ζελατίνης που προσδιορίζεται με τη μέθοδο του Glories (1974, 1978) βασίζεται στην ικανότητα των ταννινών να αντιδρούν με πρωτεΐνες, σχηματίζοντας σταθερά σύμπλοκα. Οι συμπυκνωμένες ταννίνες του οίνου καταβυθίζονται παρουσία ζελατίνης, με ομοιογενή τρόπο. Η δραστηριότητα αυτή ευθύνεται για τη δημιουργία της στυπτικότητας του ερυθρού οίνου. Η διαλυτή ζελατίνη που χρησιμοποιείται στον προσδιορισμό αυτό περιλαμβάνει ένα ιδιαίτερα μεγάλο εύρος πρωτεϊνών με διάφορα μοριακά βάρη (5.000-300.000).

Ο Δείκτης αυτός εκφράζει τη δραστικότητα των ταννινών του οίνου, δηλαδή αποτελεί δείκτη στυπτικότητας.

Οι τιμές του Δείκτη Ζελατίνης κυμαίνονται από 25 έως 80, ανάλογα με την προέλευση του οίνου και την οινοποιητική μέθοδο. Μια υψηλή τιμή του, πάνω από το 60 φανερώνει την παρουσία ιδιαίτερα δραστικών ταννινών, οι οποίες ευθύνονται για δημιουργία στυπτικότητας και σκληρότητας. Αντίθετα, μια χαμηλή τιμή, κατώτερη από 35-40, σημαίνει πως ο οίνος στερείται σώματος και μπορεί να αποτελέσει την αιτία δημιουργίας πλαδαρότητας και πικράδας. Τέλος, μέσες τιμές, που κυμαίνονται από 40 έως 60, καταδεικνύουν πως οι ταννίνες είναι αρκετά δραστικές, αλλά οι οίνοι μπορεί να έχουν σώμα ή να είναι επιθετικοί και ανεπαρκείς.

Εκτός όμως από την ικανότητα των ταννινών να αντιδρούν με τις πρωτεΐνες, μεγάλη σημασία ως προς την αίσθηση στυπτικότητας έχει και η ποσότητα των ταννινών αυτή καθαυτή. Η στυπτικότητα είναι πολύ πιο εύκολα αποδεκτή σε έναν οίνο με σώμα, ο οποίος έχει υψηλό ποσό ταννινών, παρά σε έναν αδύναμο οίνο, με χαμηλή συγκέντρωση ταννινών. Με τη λογική αυτή μπορούμε να θέσουμε μια κρίσιμη τιμή στον λόγο του Δείκτη Ζελατίνης προς την ποσότητα των ταννινών, πάνω από την οποία είναι πιθανή η δημιουργία της στυπτικότητας. Η τιμή αυτή είναι το 20. Για παράδειγμα, ένας οίνος με Δείκτη Ζελατίνης 50 μπορεί να χαρακτηριστεί υψηλής στυπτικότητας σε περίπτωση που οι ταννίνες είναι λιγότερες από 2.5 g/L, αλλά δεν ισχύει το ίδιο αν οι ταννίνες είναι 3 g/L (Ribéreau-Gayon, P. et al., 2006).

2.7.3.1.3 Δείκτης αιθανόλης

Ο δείκτης αιθανόλης είναι μια ένδειξη του ποσοστού των ταννινών που είναι ενωμένες με πολυσακχαρίτες και αποτελεί δείκτη λιπαρότητας του οίνου. Ο προσδιορισμός αυτού του δείκτη γίνεται σύμφωνα με τη μέθοδο του Glories (1978) και βασίζεται στην ιδιότητα των πολυσακχαριτών να είναι αδιάλυτοι στην αιθυλική αλκοόλη, οπότε σε υψηλές συγκεντρώσεις αλκοόλης καταβυθίζονται παρασέρνοντας μαζί τους και τις ταννίνες με τις οποίες είναι ενωμένοι.

2.7.4 Κατεχίνες

Η μέθοδος προσδιορισμού των κατεχινών (φλαβανόλες-3)

προσδιορίζονται σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται από τη Χαρβαλιά και Μπενά-Τζούρου (1982). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην αντίδραση της βανιλίνης με τον πυρήνα της φλωρογλυκίνης των κατεχινών. Μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί το ότι με τη βανιλίνη αντιδρούν και άλλες ενώσεις του οίνου που έχουν πυρήνα φλωρογλυκίνης (Χαρβαλιά, Α. και Μπενά-Τζούρου, Ειρ., 1982).

2.7.5 Ένταση χρώματος και απόχρωση

Το φάσμα των ερυθρών οίνων 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 οι νέοι ερυθροί οίνοι 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 καφεκόκκινο, οπότε επέρχεται μείωση της απορρόφησης σε αυτό το μήκος κύματος. Όσο για την απορρόφηση που προκαλείται στα 420 nm, χαρακτηριστικό μήκος κύματος του κίτρινου χρώματος, αυτή οφείλεται κυρίως στις διάφορες μορφές ταννινών, το χρώμα των οποίων επικρατεί στους παλαιωμένους οίνους.

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 οίνου. 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 και στα 520 nm, αλλά και στα 620 nm, προκειμένου να περιληφθεί και το μπλε χρώμα των νέων ερυθρών οίνων, 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 οίνου. Με τον τρόπο αυτό υπολογίζονται οι τιμές που περιγράφουν το χρώμα του οίνου.

Η χρωματική ένταση 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 ανοιχτόχρωμους οίνους, από 6-10 μέτρια ερυθρούς οίνους και από 10 και πάνω βαθιά ερυθρούς.

Η απόχρωση αντιπροσωπεύει την εξέλιξη του χρώματος προς το πορτοκαλί. Οι νέοι οίνοι 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.

Στην περίπτωση των λευκών οίνων η εκτίμηση του χρώματος 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 οίνων δείχνει το βαθμό οξειδωσής τους, όσο πιο οξειδωμένος είναι ένας λευκός οίνος, τόσο μεγαλύτερη είναι η απορρόφηση σε αυτό το μήκος κύματος (Χαρβαλιά, Α. και Μπενά-Τζούρου, Ειρ., 1982, Ribéreau-Gayon, P. et al., 2006, Κουράκου, Σ., 1998, Castaneda-Ovado, A. Et al., 2009).

2.7.6 Δείκτης Ιονισμού

Ο Δείκτης Ιονισμού που προσδιορίζεται με τη μέθοδο του Glories (1978) και βασίζεται στη δουλειά των Somers και Evans (1974), χρησιμοποιείται στον καθορισμό του ποσοστού των ελεύθερων και ενωμένων ανθοκυανών που μετέχουν στη δημιουργία του χρώματος του οίνου, πρόκειται δηλαδή για τις ολικές ανθοκυάνες που βρίσκονται στην ερυθρά μορφή (φλαβύλιο).

Για τον υπολογισμό της τιμής του Δείκτη Ιονισμού ο οίνος αποχρωματίζεται με περίσσεια διοξειδίου του θείου στο κανονικό pH του οίνου, οπότε και προσδιορίζεται το ποσό των ελεύθερων και ενωμένων με ταννίνες ανθοκυανών που είναι χρωματισμένες και αντιδρούν με το διοξείδιο του θείου. Η διαδικασία του αποχρωματισμού επαναλαμβάνεται και σε pH 1.2, όπου το σύνολο σχεδόν (95 %) των ανθοκυανών μετατρέπεται στην έγχρωμη μορφή

του φλαβυλίου.

Η τιμή του Δείκτη Ιονισμού για νέους οίνους κυμαίνεται από 10 έως 30 % και αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου, φτάνοντας το 80 με 90 % σε παλαιωμένους οίνους.

Εάν οι χρωστικές ενώσεις του ερυθρού οίνου αποτελούνται μόνο από ελεύθερες ανθοκυάνες, στο σύνηθες pH (3.4-4.0) και με μια μέση συγκέντρωση ελεύθερου διοξειδίου του θείου (10-30 mg/L), το ποσοστό των χρωματισμένων ανθοκυανών θα είναι χαμηλότερο (3-14 %). Οι νέες χρωστικές που παράγονται όταν οι ανθοκυάνες ενώνονται με ταννίνες είναι σημαντικά λιγότερο ευαίσθητες στον αποχρωματισμό λόγω του pH και του διοξειδίου του θείου, οπότε το ποσοστό των χρωματισμένων ανθοκυανών αυξάνεται. Αυτό το φαινόμενο συνεχίζεται σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας παλαίωσης. Μια υψηλή τιμή του δείκτη σε έναν πολύ νέο οίνο αποτελεί ένδειξη της εμπλοκής των ταννινών με τα κατιόντα του φλαβυλίου (Χαρβαλιά, Α. και Μπενά-Τζούρου, Ειρ., 1982, Ribéreau-Gayon, P. et al., 2006).

2.7.7 Δείκτης Εκχυλισματικότητας ανθοκυανών των ραγών και Δείκτης

Συνεισφοράς των Ταννινών των Γιγάρτων

Μέχρι σήμερα έχουν προταθεί διάφορες μέθοδοι εκτίμησης του συνολικού φαινολικού περιεχομένου του σταφυλίου, οι οποίες όμως δεν μπορούν να δώσουν μια ακριβή πρόβλεψη του αντίστοιχου περιεχομένου στον οίνο. Επιπλέον, οι μέθοδοι αυτές δεν εκτιμούν την φαινολική ωριμότητα, η γνώση της οποίας θα ήταν ιδιαίτερα χρήσιμη στον χρονικό προσδιορισμό της συγκομιδής. Μια μέθοδος που προτάθηκε για την εκτίμηση της φαινολικής ωριμότητας και τον καθορισμό της ημερομηνίας συγκομιδής, προσδιορίζει το χρόνο στον οποίο η συνολική συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών έχει φτάσει στη μέγιστη τιμή της και μόλις αρχίζει να μειώνεται. Μια άλλη μέθοδος ιδιαίτερα απλή, η οποία δίνει αποτελέσματα που είναι αναλυτικά και πιο εύκολα στην ερμηνεία τους, προτάθηκε από τον Glories (1990).

Στη μέθοδο αυτή πραγματοποιείται γρήγορη εκχύλιση των ανθοκυανών από τους φλοιούς, με ήπιο τρόπο στην αρχή και στη συνέχεια εφαρμόζοντας πιο δραστική τεχνική. Η οξύτητα χρησιμοποιείται σαν μέσο για τη διευκόλυνση της εκχύλισης. Επίσης συνίσταται τα σταφύλια να έχουν υποστεί έντονο σπάσιμο

και ο πολτός που προκύπτει χωρίζεται σε δύο μέρη. Το σπάσιμο των γιγάρτων έχει σαν αποτέλεσμα την μερική εκχύλιση των ταννινών τους, η οποία είναι απαραίτητη προκειμένου να εκτιμηθούν τα χαρακτηριστικά των σταφυλιών. Χρησιμοποιούνται δύο υδατικά διαλύματα με pH 1 και 3.6.

Σε όξινο περιβάλλον διαρρηγνύεται η πρωτεοφωσφολιπιδική μεμβράνη, σπάνε οι πρωτεϊνικοί δεσμοί και έτσι ελευθερώνεται το περιεχόμενο των χυμοτοπίων. Στην κατάσταση αυτή όλες οι ανθοκυάνες είναι εκχυλίσιμες και διαλυτές στο διάλυμα με pH1, οπότε πραγματοποιείται ολική εκχύλιση των ανθοκυανών από τα χυμοτόπια. Σε pH 3.6 η εκχύλιση είναι παρόμοια με αυτή που πραγματοποιείται στις οινοποιητικές συνθήκες, δηλαδή εκχυλίζεται το ποσοστό των ανθοκυανών που θα εκχυλιζόταν στο εν ζυμώσει γλεύκος υπό φυσιολογικές συνθήκες οινοποίησης. Εάν η μεμβράνη δεν είναι πορώδης, οι ανθοκυάνες διακινούνται πολύ λίγο, αλλά στην περίπτωση που η διάρρηξη είναι ολοκληρωμένη με τη χρήση ενζύμων, οι χρωστικές ελευθερώνονται από τα χυμοτόπια και η εκχύλιση πραγματοποιείται στα ίδια επίπεδα με την πρώτη περίπτωση. Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται στα δύο διαφορετικά pH αντικατοπτρίζει την ευαισθησία των μεμβρανών, η οποία σχετίζεται με τη δυνητική εκχύλιση των έγχρωμων ενώσεων και αποτελεί ένδειξη του επιπέδου ωριμότητας των σταφυλιών.

Έχει ενδιαφέρον να επισημάνουμε το γεγονός πως οι ανθοκυάνες και οι ταννίνες εκχυλίζονται από τους φλοιούς κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Σε περίπτωση που το εκχύλισμα έχει υψηλή συγκέντρωση ανθοκυανών, θα έχει και πολλές ταννίνες. Για το λόγο αυτό οι ανθοκυάνες θεωρούνται δείκτες των ταννινών των φλοιών. Με δεδομένο ότι ο λόγος της οπτικής πυκνότητας (Ο.Π.) στα 280 nm προς τις ανθοκυάνες του εκχυλίσματος στο διάλυμα με pH 3.6 είναι μεταξύ 35 και 45 για ώριμα σταφύλια όλων των ποικιλιών που μελετήθηκαν σε σχετική έρευνα, η μέση τιμή 40 είναι αυτή που χρησιμοποιείται. Από τη στιγμή που είναι γνωστή η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών συστατικών (οπτική πυκνότητα στα 280nm), όπως και οι ανθοκυάνες (A) του εκχυλίσματος σε pH 3.6, είναι εφικτός ο υπολογισμός του ποσοστού των φαινολικών συστατικών που προέρχονται από τους φλοιούς:

$$\text{Ο.Π. 280} = A_{\text{pH 3.6}} * 40$$

Το υπόλοιπο συνεπώς είναι οι ταννίνες των γιγάρτων. Ο τύπος που

εκφράζει το Δείκτη Εκχυλισματικότητας των ανθοκυανών είναι ο ακόλουθος:

$$A.E(\%) = \frac{(ApH1ApH3,6)}{ApH1} \times 100$$

Όσο χαμηλότερη είναι η τιμή του Δείκτη, δηλαδή όσο μικρότερη είναι η διαφορά μεταξύ των δύο μετρήσεων, τόσο περισσότερο εκχυλίσσιμες είναι οι ανθοκυάνες. Ο Δείκτης Εκχυλισματικότητας των ανθοκυανών κυμαίνεται από 70 μέχρι 20, ανάλογα με την ποικιλία και την ωριμότητα των σταφυλιών. Το Cabernet Sauvignon, που χαρακτηρίζεται από λεπτούς και σκληρούς φλοιούς, έχει πάντα μεγαλύτερες τιμές από το Merlot. Ο Δείκτης Εκχυλισματικότητας των ανθοκυανών μειώνεται κατά την ωρίμανση. Ορισμένες τεχνικές που εφαρμόζονται στο αμπέλι, όπως το αραίωμα των τσαμπιών, ή η καθυστερημένη απομάκρυνση των φύλλων, διευκολύνει την ωρίμανση και έτσι μειώνεται η τιμή του Δείκτη της Εκχυλισματικότητας των ανθοκυανών. Η περιεκτικότητα σε ανθοκυάνες και το χρώμα του οίνου αυξάνεται, ακόμα και αν το περιεχόμενο σε ανθοκυάνες του σταφυλιού δεν αυξηθεί.

Η συνεισφορά των ταννινών των γιγάρτων στην ολική περιεκτικότητα σε φαινόλες του εκχυλίσματος προκύπτει από το Δείκτη Συνεισφοράς των Ταννινών των Γιγάρτων, μέσω του τύπου:

$$M.P(\%) = \frac{\Delta\Phi O - (ApH3,6 \times 40)}{2 \times \Delta\Phi O} \times 100$$

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η οπτική πυκνότητα του εκχυλίσματος των φλοιών στα 280 nm σχετίζεται με τη συγκέντρωση των ανθοκυανών μέσω του τύπου:

$$O.P.280 = ApH3,6 \times 40$$

Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή του Δείκτη Συνεισφοράς των Ταννινών των Γιγάρτων, τόσο υψηλότερη είναι η περιεκτικότητα των γιγάρτων σε ταννίνες,

οπότε τόσο μεγαλύτερος είναι και ο κίνδυνος να δημιουργηθεί αρνητική επίδραση στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου. Ο Δείκτης Συνεισφοράς των Ταννινών των Γιγάρτων μειώνεται κατά την ωρίμανση. Η τιμή του κυμαίνεται από 60 μέχρι 0, ανάλογα με την ποικιλία, τον αριθμό των γιγάρτων και την ωριμότητα των σταφυλιών. Για παράδειγμα, οι ποικιλίες Pinot noir, Tempranillo και Grenache έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε ταννίνες γιγάρτων, ενώ τέλειας ωριμότητας Cabernet Sauvignon αντίθετα, έχει πολύ λίγες, λιγότερες από το Merlot.

Η αναλογία στεμφύλων προς το χυμό, εκφρασμένη σε g/L, αντικατοπτρίζει την αραίωση των σταφυλιών. Είναι δυνατό να διαπιστωθεί κατά πόσο η αναλογία αυτή θα πρέπει να τροποποιηθεί κατά την οινοποίηση. Κυμαίνεται μεταξύ 100 και 300 g/L, ανάλογα με την ποικιλία, το μικροκλίμα και τις καλλιεργητικές συνθήκες.

Όλες αυτές οι πληροφορίες μπορούν να αποκτηθούν μέσα σε μια μέρα μετά τη λήψη του δείγματος, οπότε και να χρησιμοποιηθούν στον καθορισμό της ημερομηνίας συγκομιδής, αλλά και στην επιλογή των οινοποιητικών τεχνικών που θα εφαρμοστούν (Ribéreau-Gayon, P. et al., 2006).

2.7.8 Ταννίνες φλοιών και γιγάρτων

Η ανάλυση των διάφορων ταννινών ξεχωριστά δεν είναι δυνατή, εξαιτίας του ότι ο αριθμός τους είναι πολύ μεγάλος. Οι ταννίνες των σταφυλιών αποτελούνται από 15 υπομονάδες, ενώ περιλαμβάνουν περισσότερες από 105 διαφορετικές χημικές δομές, ακόμα και αν περιορίσουμε τον αριθμό τους μόνο σε αυτές που φέρουν δεσμούς C4-C8. Ευτυχώς όμως, η γνώση τέτοιων λεπτομερειών δεν είναι απαραίτητη στην πράξη. Αυτό που χρειάζεται είναι ο καθορισμός της ολικής ποσότητας των ταννινών των φλοιών και των γιγάρτων, ενώ για τους οίνους θεωρείται αρκετή η γνώση της ολικής ποσότητας των ταννινών που δημιουργούν τη στυπτικότητα.

Πολλοί ερευνητές έχουν ασχοληθεί με τη μελέτη των ταννινών. Ο Romeyer και η ομάδα του (1986) προσδιόρισαν με HPLC τις αλλαγές στα επίπεδα της κατεχίνης, της επικατεχίνης και διμερών προκυανιδινών των γιγάρτων τεσσάρων ποικιλιών κατά την ωρίμανση. Επίσης μπόρεσαν να ανιχνεύσουν την τριμερή C2, αλλά όχι να την προσδιορίσουν ποσοτικά, εξαιτίας του γεγονότος

ότι βρίσκεται σε πολύ μικρά ποσά. Αργότερα, οι De Freitas και Glories ασχολήθηκαν με τον προσδιορισμό των στην σύνθεση των προκυανιδινών των φλοιών και των γιγάρτων δύο λευκών ποικιλιών. Μέτρησαν την συνολική ποσότητα των προανθοκυανιδινών των ιστών, τα Β διμερή και την τριμερή προκυανιδίνη C1. Όμως οι διμερείς και τριμερείς προκυανιδίνες αποτελούν μόνο ένα μικρό μέρος των συνολικών προανθοκυανιδινών των φλοιών και των γιγάρτων, οπότε η μέτρηση των συνολικών ταννινών των φλοιών και των γιγάρτων ακόμα δεν είχε επιτευχθεί. Ακολούθησαν και άλλες μελέτες, όπως αυτή του Kennedy (2000) και της ομάδας του, που ασχολήθηκαν με την εξέλιξη των ταννινών των γιγάρτων του Cabernet Sauvignon κατά την ωρίμανση, αλλά και πάλι δεν έγινε προσδιορισμός της εξέλιξης των ταννινών των φλοιών.

Υπάρχουν πολλές μέθοδοι για τον προσδιορισμό των ταννινών συνολικά, ορισμένες από τις πιο χρήσιμες βασίζονται στην ικανότητα των ταννινών να καθιζάνουν με πρωτεΐνες. Μια από τις πιο διαδεδομένες αναπτύχθηκε από τους Hagerman και Bulter (1978) και αποδείχθηκε ιδιαίτερα αξιόπιστη, με υψηλή επαναληψιμότητα, χρησιμοποιώντας ένα μεγάλο εύρος φυτικών συστατικών και εκχυλισμάτων. Βασίστηκε στην καθίζηση των ταννινών από ένα διάλυμα που περιέχει αλβουμίνη ορού βοοειδών (bovine serum albumin BSA), την αναδύαση του ιζήματος και τέλος τον προσδιορισμό του ποσού των ταννινών με αντίδραση με χλωριούχο σίδηρο. Η διαδικασία αυτή οδηγεί στην παρασκευή έγχρωμου προϊόντος το οποίο προσδιορίζεται ποσοτικά μέσω της απορρόφησής του στα 510 nm.

Το 1999 από τους Adams και Habertson περιγράφηκε μια εύκολη μέθοδος προσδιορισμού των ταννινών, η οποία βασίζεται στην συγκαθίζηση της αλβουμίνης του ορού βοοειδών και του ενζύμου αλκαλική φωσφατάση. Η ποσότητα του ενζύμου που καθιζάνει είναι ανάλογη της ποσότητας των υπάρχουσών ταννινών, οπότε η ποσότητα των ταννινών σε άγνωστα δείγματα μπορεί να προσδιοριστεί έμμεσα από τη μέτρηση της δραστηριότητας της αλκαλικής φωσφατάσης. Η μέθοδος πρωτεϊνικής καθίζησης είναι εύκολη διαδικασία, κατάλληλη για αναλύσεις ρουτίνας σε οινολογικά εργαστήρια. Βέβαια ήταν απαραίτητη η προσαρμογή της σε εκχυλίσματα σταφυλιού και οίνους, και με αυτό ασχολήθηκε ο Habertson και η ομάδα του (2002), προκειμένου να προσδιοριστεί η ποσότητα των ταννινών που καθιζάνουν με

πρωτεΐνες στα σταφύλια (Habertson, J. F. et al., 2002).

2.7.9 Ανθοκυάνες με HPLC

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό πολύπλοκων ανόργανων και οργανικών μιγμάτων καθώς και στην ποιοτική και ποσοτική ανάλυση, με τη χρήση μίας κινητής φάσης (διαλύτης ή μίγμα διαλυτών) και μίας στατικής φάσης (στήλη). Η μεγαλύτερη απόδοση στην υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης επιτυγχάνεται με χαμηλές ταχύτητες ροής (και συνεπώς μεγάλη διάρκεια διαχωρισμού), με την εφαρμογή υψηλής πίεσης και τη χρήση μικρών σωματιδίων ως υλικό πλήρωσης της στήλης. Επίσης, για την επίτευξη καλού διαχωρισμού πολλών συστατικών ενός δείγματος συνίσταται η βαθμιδωτή έκλυση, όπου η ισχύς της κινητή φάσης μεταβάλλεται (Pecsok, R.L. et al., 1980).

Η HPLC χρησιμοποιείται ευρέως στην ανάλυση των φαινολικών συστατικών των σταφυλιών και των οίνων (Del Alamo, M. et al., 2004, Kallithraka, S. et al., 2005, Lopez, M. et al., 2001, Roussis, I.G. et al., 2008, Sakkiadi, A.B. et al., 2004, Versari, A. et al., 2008, Luque-Rodriguez, J. M. et al., 2007, Garcia-Falcon, M. S. et al., 2007, Alvarez, I. et al., 2006).

2.7.10 Περιεκτικότητα εμπορικών σκευασμάτων σε ένζυμα που επηρεάζουν τα φαινολικά συστατικά του οίνου

Εφαρμογή των κατάλληλων μεθόδων προκειμένου να προσδιοριστεί το περιχόμενο επιλεγμένων εμπορικών σκευασμάτων σε ένζυμα που επηρεάζουν τα φαινολικά συστατικά του παραγόμενου οίνου.

2.7.11 Επίδραση εμπορικών ενζυμικών σκευασμάτων στα φαινολικά συστατικά του οίνου

Πραγματοποίηση μικροοινοποιήσεων με την προσθήκη διαφορετικών εμπορικών σκευασμάτων, προκειμένου να διαπιστωθεί η επίδρασή τους στα φαινολικά συστατικά του οίνου. Για το σκοπό αυτό εφαρμόστηκε ο προσδιορισμός της Έντασης του χρώματος με τη μέθοδο του Glories (1984), του Δείκτη Ολικών Φαινολών με τη μέθοδο των Flanzky και Roux (1958) και Ribéreau-Gayon (1966), των Ολικών Ανθοκυανών με τη μέθοδο Ribéreau-Gayon and Stonestreet (1965) και των Ταννινών με τη μέθοδο των Ribéreau-Gayon and

3 ΠΑΛΑΙΩΣΗ

3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η καταναλώσιμη ποσότητα ενός προϊόντος εξαρτάται άμεσα από την ποιότητά του. Αυτό το γεγονός είναι ακόμη πιο ρεαλιστικό στην περίπτωση του οίνου, ο οποίος είναι ένα προϊόν που αρχικά προορίζεται για να ευφραίνει, αλλά και να ικανοποιεί ένα σημαντικό αριθμό θρεπτικών αναγκών του καταναλωτή.

Παράλληλα, μετά την ένταξη της χώρας μας στην ενωμένη Ευρωπαϊκή οικογένεια και τη φιλελευθεροποίηση του παγκόσμιου εμπορίου, ο οίνος δέχεται τόσες πιέσεις, που για να μπορέσει να επιβιώσει και να φέρει περισσότερα κέρδη στον αμπελοοινικό τομέα, αναμφίβολα πρέπει, μεταξύ άλλων, να είναι σταθερής και ανώτερης ποιότητας.

Η μετατροπή του νωπού σταφυλιού (γλευκοποίηση και οينوποίηση) είναι η κύρια φάση της παραγωγής του οίνου. Ολόκληρη η δυναμική ποιότητα του βρίσκεται αρχικώς μέσα στον καρπό και ανάλογα παλλαπλασιάζεται κατά τη διάρκεια της οينوποίησης ή, αντίθετα, εξαφανίζεται. Η παλαίωση των οίνων που προκύπτουν είναι κεφαλαιώδους σημασίας και καθορίζει τον οργανοληπτικό χαρακτήρα του τελικού προϊόντος.

Παλαίωση (ωρίμανση και μεγάλωμα του οίνου) καλείται ο συνδυασμός όλων εκείνων των χημικών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της ζωής του οίνου, κάτω από την επίδραση ή συνεργία συγκεκριμένων παραμέτρων, διαφοροποιώντας/εξελίσσοντας τον οργανοληπτικό του χαρακτήρα (χρώμα, άρωμα, γεύση). Αυτή διακρίνεται σε:

- α) Μικροξυγονωτική παλαίωση σε δρύινο βαρέλι και
- β) Αναγωγική παλαίωση σε γυάλινη φιάλη.

Το κεφάλαιο αυτό επικεντρώνεται στην ανάλυση των παραγόντων που σχετίζονται με την επίδραση της παλαίωσης στην ποιότητα των οίνων. Σ' αυτό δίνονται απαντήσεις σε πολλά ερωτηματικά ιδιαίτερα όσον αφορά το ρόλο του δρύινου βαρελιού στη βελτίωση της ποιότητας των κρασιών μας.

3.2 Μικροοξυγονωτική παλαίωση σε δρύινο βαρέλι

Αναμφίβολα, ένα στοιχείο που επιδρά στην ποιότητα του οίνου, και κατ'επέκταση στην ολοκλήρωση του οργανοληπτικού του χαρακτήρα, είναι το δρύινο βαρέλι. Η χρήση του είναι στενά αλληλένδετη με την ιστορία του οίνου. Φυσικά, σε κάποιες σκοτεινές περιόδους της ανθρωπότητας, όπου ο οίνος εξαφανίστηκε από το προσκήνιο, η παραγωγή και η χρήση δρύινων βαρελιών πέρασε στην αφάνεια. Επανήλθε όμως δριμύτερη χάρη στην εξέλιξη της οινολογίας, με αποτέλεσμα να κατέχει στις μέρες μας μια ξεχωριστή θέση ως παράγοντας εξέλιξης και ωρίμανσης.

3.2.1 2.2.1 Η επίδραση του δρύινου βαρελιού στις φαινολικές ουσίες των οίνων

Το κυριότερο φαινόμενο που παρατηρείται κατά την παραμονή του οίνου στο βαρέλι είναι η μικροοξυγόνωση. Η σταδιακή και μικρή διάλυση οξυγόνου στον όγκο του οίνου γίνεται διαμέσου των πόρων του βαρελιού, ανάλογα με το βοτανικό είδος από το οποίο προέρχεται.

Ο *Quercus sessiflora* είναι δρυς αργής ανάπτυξης και αποτελείται από πόρους μικρότερης διαμέτρου. Ο *Quercus pedunculata* επιτρέπει μεγαλύτερη οξυγόνωση, αφού είναι δρυς γρήγορης ανάπτυξης με πολυπληθείς και μεγάλους πόρους, εξελίσσοντας έτσι γρηγορότερα τον οίνο. Βαρέλια που παράγονται από το είδος αυτό χρησιμοποιούνται κυρίως για παλαίωση αποσταγμάτων στεμφύλων (Marc, Grappa κτλ) ή οίνων (Cognac, Armagnac).

Έχουμε προαναφέρει ότι η μικροοξυγόνωση έχει άμεση σχέση με την εξέλιξη (ωρίμανση, παλαίωση) του οίνου, αφού ανεβάζει το δυναμικό όξιδο – αναγωγής. Παράλληλα, έχει άμεση επίδραση πάνω στα πολυφαινολικά συστατικά, αφού το οξυγόνο παίζει το ρόλο του καταλύτη στις αντιδράσεις ανθοκυανών (χρωστικές) – τανίνων (στιφές ουσίες), με αποτέλεσμα τη δημιουργία σταθερού και συμπαγούς χρώματος των ερυθρών οίνων κατά τη διάρκεια του χρόνου. Επιπλέον, το οξυγόνο παίζει καταλυτικό ρόλο για τον πολυμερισμό των τανίνων, με αποτέλεσμα τη μείωση της ανεπιθύμητης στιφάδας, κάνοντας τον οίνο μαλακότερο.

3.2.2 Η επίδραση του δρύινου βαρελιού στις αρωματικές ουσίες των οίνων

Εξίσου σημαντικό φαινόμενο που παρατηρείται κατά την παλαίωση σε δρύινο βαρέλι είναι ο εμπλουτισμός σε αρωματικές ουσίες. Σαν αποτέλεσμα είναι ο οίνος να αποκτά ένα μεθυστικό και πολύπλοκο άρωμα που ονομάζεται bouquet (μπουκέτο).

Οι αρωματικές ουσίες ανήκουν σε διάφορες χημικές οικογένειες. Διακρίνουμε τις λακτόνες, που προέρχονται από τον ίδιο το δρυ και έχουν χαρακτηριστικό άρωμα ινδοκάρυδου. Παρατηρείται εμπλουτισμός σε φαινολικές αλδεΐδες, που δημιουργούνται κατά τη συναρμολόγηση του βαρελιού (κάψιμο) με πιο διαδεδομένη τη βανιλίνη. Αναφέρουμε τα φουρανικά παράγωγα, που παράγονται από το μεταβολισμό των μικροοργανισμών και κυρίως τη φουρφουράλη (άρωμα καβουρδισμένου αμυγδάλου), αλλά και αρωματικές φαινόλες που δίνουν αισθήσεις κανέλας, ξηρού γαρίφαλου, καπνού, καφέ, καραμέλας κτλ.

3.2.3 Τι πρέπει να προσέχουμε κατά την παλαίωση σε δρύινο βαρέλι

Αν και η παλαίωση σε δρύινο βαρέλι είναι ευεργετική και συνεισφέρει τα μέγιστα στην εξέλιξη και ποιότητα του οίνου, κάποιες προϋποθέσεις που πιθανόν να μη ληφθούν υπόψη από τον οινοποιό/χρήστη μπορούν να οδηγήσουν σε αρωματικές και όχι μόνο, αποκλίσεις, με αρνητικά αποτελέσματα για τον οργανοληπτικό χαρακτήρα.

Βασική αρχή είναι ότι το βαρέλι πρέπει να χρησιμοποιείται είτε καινούριο είτε, στη χειρότερη περίπτωση, όχι περισσότερο από 4 χρονιές. Στην αντίθετη περίπτωση, το βαρέλι χάνει όλα τα αρωματικά του συστατικά, καθώς και την ιδιότητα της μικροοξυγόνωσης καθώς οι πόροι κλείνουν από τις συνεχείς χρήσεις.

Ένα άλλο φαινόμενο που παρατηρείται κατά τη διάρκεια της παλαίωσης είναι η μείωση του όγκου του οίνου που οφείλεται είτε στην εξάτμιση διαμέσου των πόρων είτε από την απορρόφηση. Για το λόγο αυτό ο οινοποιός πρέπει να συμπληρώνει το βαρέλι με τον ίδιο οίνο όποτε διαπιστώσει μείωση του όγκου, καθώς και να φροντίζει στη διατήρηση του ελεύθερου θειώδους στα 20-30mg/l για αντιοξειδωτικούς λόγους.

Η χρονική διάρκεια της παλαίωσης είναι στην κρίση του οينوποιού/οινολόγου ο οποίος, μετά από τακτικές μηνιαίες γευστολογήσεις, θα αποφασίσει τη στιγμή που θα αποσύρει τον οίνο από το βαρέλι και προχωρήσει στις οινολογικές πρακτικές και επεξεργασίες.

Κατά τη διάρκεια της παραμονής του οίνου στο βαρέλι θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν τεχνικές οينوποίησης, όπως η μηλογαλακτική ζύμωση και η αυτόλυση των μυκήτων. Παράλληλα, παρατηρείται εμπλουτισμός από τανίνες (στιφές ουσίες του ξύλου), έτσι οι οίνοι που προορίζονται για παλαίωση είναι συνήθως οι ερυθροί που έχουν το σχετικό δυναμικό (ψηλό οينوπνευματικό βαθμό, οξύτητα και πολυφαινόλες), αλλά και οίνοι από λευκές πολυδύναμες ποικιλίες, όπως το Chardonnay, Sauvignon, Semillon, Riesling, Gewurtztraminer κτλ.

3.3 Αναγωγική παλαίωση σε γυάλινη φιάλη

Χρονολογικά, κατά την παραγωγική διαδικασία, η παλαίωση σε γυάλινη φιάλη αποτελεί τον τελευταίο σταθμό του οίνου πριν να φθάσει στο τραπέζι του καταναλωτή. Ο οίνος παλαιωμένος μικροξυγονωτικά στο δρύινο βαρέλι, σταθεροποιείται / διαυγάζεται και εμφιαλώνεται σε γυάλινες φιάλες, όπου και θα παραμείνει για ένα χρονικό διάστημα που θα κρίνει ο οينوποιός / οινολόγος μετά από τακτικές γευστολογήσεις κατά τη διάρκεια του χρόνου.

Η αναγωγική παλαίωση αφορά την εξέλιξη του οίνου σε συνθήκες «ασφυξίας», σε χαμηλό δηλαδή δυναμικό οξειδοαναγωγής, όπου παρατηρούνται κυρίως πολύ αργές αντιδράσεις εστεροποίησης της αλκοόλης μαζί με τα οργανικά οξέα του οίνου. Ως αποτέλεσμα έχουμε τη δημιουργία εξειδικευμένων και πολύπλοκων αρωμάτων που παραπέμπουν σε μπαχαρικά, ξηρούς καρπούς, άνθη κτλ. αποτελώντας το “bouquet” (μπουκέτο, συνδυασμός αρωμάτων του σταφυλιού, ζύμωσης και παλαίωσης).

Εδώ πρέπει να αναφέρουμε ότι η περιεκτικότητα του οίνου σε συνένζυμα π.χ. μεταλλικά κατιόντα (σίδηρος, χαλκός) ή βιταμίνες ενισχύουν και επιταχύνουν την εξέλιξη και το μεγάλωμα του οίνου («elevage»). Οι ουσίες αυτές μειώνονται κατά τη διάρκεια ανεπιθύμητα έντονων οινολογικών επεξεργασιών, που έχουν ως αποτέλεσμα την ταλαιπωρία και αφαίμαξη του οίνου σε ποιοτικά συστατικά.

3.3.1 2.3.1 Τι πρέπει να προσέχουμε κατά την παλαίωση σε φιάλη

Επιγραμματικά, πρέπει να έχουμε υπόψη τις πιο κάτω σημαντικές παραμέτρους:

– Σκοτεινό υπόγειο κελλάρι, χωρίς κραδασμούς και υπέρμετρο φωτισμό, αφού είναι

γνωστό ότι τα στοιχεία αυτά εξελίσσουν τους οίνους πολύ βίαια.

– Συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας 12-14°C.

– Συνθήκες υγρασίας 70-75%.

– Ορθή επιλογή φιάλης και πώματος, έχοντας υπόψη ότι η διαφορά της διαμέτρου του φελλού με την εσωτερική διάμετρο, του λαιμού της φιάλης πρέπει να είναι τουλάχιστον 6mm.

Συμπερασματικά, πρέπει να έχουμε υπόψη ότι ο οίνος είναι ένας ζωντανός οργανισμός, ο οποίος δημιουργείται από το σταφύλι και την οινοποίηση, εξελίσσεται, ωριμάζει και παλαιώνει κάτω από την υπομονετική φροντίδα του οινοποιού - οινολόγου για να φθάσει στον καταναλωτή, παρουσιάζοντας όλη τη δυναμική του ποιότητα.

Αυτός πρέπει να είναι και ο μοναδικός σκοπός μας, δηλαδή η παραγωγή οίνων με ψηλή προστιθέμενη αξία, ανάλογη των χρημάτων που διεκδικούμε από τον καταναλωτή.

4 Βιβλιογραφία

4.1 Ξενόγλωσση

Andrade, P.B., Mendes, G., Falco, V., Valentao, P. and Seabra, R.M. (2001), Preliminary study of flavonols in port wine grape varieties, *Food Chemistry*, 73, 397-399.

Arnous, A., Makris, D.P. and Kefalas, P. (2001), Effect of Principal Polyphenolic Components in Relation to Antioxidant Characteristics of Aged Red Wines, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 49, 5736-5742.

Arnous, A., Makris, D.P. and 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.

Atanasova, V., Fulcrand, H., Cheynier, V. and Moutounet M. (2002), Effect of oxygenation on polyphenol changes occurring in the course of wine-making, *Analytica Chimica Acta*, 458, 15-27.

Ayestaran, B., Guandalupe, Z. and Leon, D. (2004), Quantification of major grape polysaccharides (Tempranillo v.) released by maceration enzymes during the fermentation process, *Analytica Chimica Acta*, 513, 29-39.

Gambelli, L. and Santaroni, G.P. (2004), Polyphenols content in some Italian red wines of different geographical origins, *Journal of Food Composition and Analysis*, 17, 613-618.

Gil, J. and Salvador, V. (2001), Effect of macerating on red wine aroma at laboratorys: Exogenous addition or expression by transgenic wine yeasts, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5515-5523.

Gil-Munoz, R., Gomez-Plaza, E., Martinez, A., and Lopez-Roca, J. M. (1999), Evolution of phenolic compounds during wine fermentation and post-fermentation: influence of grape temperature, *Journal of Composition and Analysis*, 12, 259-272.

Goetghebeur, M., Nicolas, M., Brun, S. and Galzy, P. (1992), Production and excretion of benzyl alcohol oxidase in *Botrytis cinerea*, *Phytochemistry*, 31, 413-416.

Gonzalez-Manzano, M., Rivas-Gonzalo, J. and Santos-Buelga, C. (2004), Extraction of flavan-3-ols from grape seed and skin into wine using simulated maceration, *Analytica Chimica Acta*, 513, 283-289.

Gonzalez-Manzano, S., Duenas, M., Rivas-Gonzalo, J., Escribano-Bailon, M.T. and Santos-Buelga, C. (2009), Studies on the copigmentation between anthocyanins and flavan-3-ols and their influence in the colour expression of red wine, *Food Chemistry*, 114, 649-656.

Gonzalez-Neves, G., Charamelo, D., Balado, J., Barreiro, L., Bochicchio, R., Gatto, G., Gil, G., Tessore, A., Carbonneau, A. and Moutounet, M. (2004), Phenolic potential of Tannant, Cabernet Sauvignon and Merlot grapes and their correspondence with wine composition, *Analytica Chimica Acta*, 513, 191-196.

Hakansson, A., Pardon, K., Hayasaka, Y., de Sa, M. and Marcus Herderich (2003), Structures and colour properties of new red wine pigments, *Tetrahedron Letters*, 44, 4887-4891.

Hermozin Gutierrez, 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.

Hermozin Gutierrez, I., Lorenzo, E. and Vicario Espinoza, A. (2005), Phenolic composition and magnitude of copigmentation in young and shortly aged red wines made from cultivars, Cabernet Sauvignon, Cencibel and Syrah, *Food Chemistry*, 92, 269- 283.

Jackson, R.S. (2008), *Wine Science, Principles and Applications*, 3d Edition, Academic Press, San Diego, California.

Kallithraka, S., Arvanitogiannis, I.S., Kefalas, P., El-Zagouli, A., Soufleros, E. and Psarra, E. (2001), Instrumental and sensory analysis of Greek wines; implementation of principal component analysis (PCA) for classification according to geographical origin, *Food Chemistry*, 73, 501-514.

Kallithraka, S., Mohdaly, A., Makris, D. and Kefalas, P. (2005), Determination of major anthocyanin pigments in Hellenic native grape varieties (*Vitis vinifera* sp.): association with antiradical activity, *Journal of Food Composition and Analysis*, 18, 375- 386.

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

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

Makris, D., Kallithraka, S. and Kefalas, P. (2006), Flavonols in grapes, grape products and wines: Burden, profile and influential parameters, *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 396-404.(a)

Makris, D., Psarra, E., Kallithraka, S. and Kefalas, P. (2002), The effect of polyphenolic composition as related to antioxidant capacity in white wines, *Food Research International*, 36, 805-814.

Makris, D.P., Kallithraka, S. and Mamalos, A. (2006), Differentiation of young red wines based on cultivar and geographical origin with application of chemometrics of principal polyphenolic constituents, *Talanta*, 70, 1143-1152.(b)

Mantell, C., Rodriguez, M. and de la Ossa, M. (2002), Semi-batch extraction of anthocyanins from red grape pomace in packed beds: experimental results and process modeling, *Chemical Engineering Science*, 57, 3831-3838.

Marbach, I., Harel, E. and Mayer, A. (1984), Molecular properties of extracellular *Botrytis cinerea* laccase, *Phytochemistry*, 23, 2713-2717.

Nunez, V., Monagas, M., Gomez-Cordoves, M.C. and Bartolome, B. (2004), *Vitis vinifera* L. cv. Graciano grapes characterized by its anthocyanin profile, *Postharvest Biology and Technology*, 31, 69-79.

Nunez-Delicado, E., Serrano-Megias, M., Perez-Lopez, A.J. and Lopez-Nicolas, J.M. (2007), Characterization of polyphenol oxidase from Napoleon grape, *Food Chemistry*, 100, 108-114.

Prier, C., Rigaud, J., Cheynier, V., Moutounet, M. (1994), Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds, *Phytochemistry*, 36, 781-784.

Revilla, I. and Gonzalez-SanJose, M. (1998), Methanol release during fermentation of red grapes treated with pectolytic enzymes, *Food Chemistry*, 63, 307-312.

Ribèreau – Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A. and Dubourdieu, D. (2006), *Handbook of Enology, 2, The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments*, John Wiley & Sons Ltd.

Rodriguez-Lopez, J., Serna-Rodriguez, P., Tudela, J., Varon, R. and Garcia-Canovas, F. (1991), A continuous spectrophotometric method for the determination of diphenolase activity of tyrosinase using 3,4-dihydroxymandelic acid, *Analytical Biochemistry*, 195, 369-374.

4.2 Ελληνική

Γκουράβας, Δ. (2004), Προζυμωτική εκχύλιση εν ψυχρώ της ποικιλίας Εινόμαυρο, *Ημερίδα: Η Αμπελοοινική Ελλάδα αυτοπροσώπως, Σύνδεσμος Ελληνικού Οίνου*, Αθήνα.

Ζαχαριά, Α. (2009), Ανάλυση Πολυφαινολικών Συστατικών και Κινητική Εκχύλισής τους κατά την Οινοποίηση Σταφυλιών Ποικιλίας Αγιωργίτικο, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθήνας.

Καραγιάννη, Μ.Ι. (1987), Επεξεργασία Αξιολόγηση και Παρουσίαση Αναλυτικών Δεδομένων, Εκδόσεις Θεοδωρίδη, Αθήνα.

Κοτσερίδης, Γ. (2005), Σημειώσεις/Εργαστηριακές Ασκήσεις Οινολογίας Ι, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Αθήνα.

Κοτσερίδης, Γ. (2006), Σημειώσεις Οινολογίας ΙΙ, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Αθήνα.

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

Σταυρακάκης, Μ.Ν. (2004), Ειδική Αμπελουργία, ΙΙΙ. Θέματα Αμπελογραφίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Εργαστήριο Αμπελολογίας, Αθήνα.

Χαρβαλιά, Α. και Μπενά - Τζούρου, Ε. (1982), Τα φαινολικά συστατικά και το χρώμα των ελληνικών οίνων, Ελληνικά Οινολογικά Χρονικά, 2, 1-77, Ινστιτούτο Οίνου, Αθήνα.