

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ ΣΤΗΝ «ΑΜΠΕΛΟΥΡΓΙΑ - ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ»

Επίδραση Πηκτινολυτικών Ενζύμων στα Χρωματικά Χαρακτηριστικά Σταφυλιών Ποικιλίας Αγιωργίτικο



Μεταπτυχιακή Διατριβή

Τιμόθεος Δ. Δούβρης

Αθήνα, Ιούνιος 2010



ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ ΣΤΗΝ «ΑΜΠΕΛΟΥΡΓΙΑ - ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ»

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Επίδραση Πηκτινολυτικών Ενζύμων στα Χρωματικά Χαρακτηριστικά Σταφυλιών Ποικιλίας Αγιωργίτικο

Τιμόθεος Δ. Δούβρης

Πενταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Γ. Κοτσερίδης (Επιβλέπων), Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων Γ.Π.Α.

Χ. Συμινής, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής Γ.Π.Α.

Σ. Παπανικολάου, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων Γ.Π.Α.

Μ. Γαλιώτου, Καθηγήτρια, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων Γ.Π.Α.

Σ. Γιαννιώτης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων Γ.Π.Α.

Αθήνα, Ιούνιος 2010

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Επίδραση Πηκτινολυτικών Ενζύμων στα Χρωματικά Χαρακτηριστικά Σταφυλιών Ποικιλίας Αγιωργίτικο

Τιμόθεος Δ. Δούβρης

Μελετήθηκε η πορεία εξέλιξης των χρωματικών χαρακτηριστικών και των ολικών φαινολών κατά τη διάρκεια εκχύλισης των στεμφύλων της ποικιλίας αμπέλου *Vitis Vinifera* L. Αγιωργίτικο ύστερα από προσθήκη πηκτινολυτικών ενζύμων.

Πραγματοποιήθηκαν οκτώ πειραματικές διαδικασίες, σε εργαστηριακό επίπεδο, ενώ εφαρμόστηκαν διάφορες αναλυτικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό των πολυφαινολών.

Κατά τη διάρκεια της εκχύλισης του Αγιωργίτικου, παρατηρείται αύξηση της έντασης του χρώματος, με υψηλότερες τιμές στα δείγματα με τα ένζυμα. Οι ολικές ανθοκυάνες ακολουθούν ομοίως, ανοδική πορεία, με μικρές διαφορές τιμών των δειγμάτων με τα ένζυμα εν' συγκρίσει με τα δείγματα των αντίστοιχων μαρτύρων, ενώ ο δείκτης ολικών φαινολών, παρόλο που ακολουθεί ανοδική πορεία, στις μισές πειραματικές διαδικασίες παρουσιάζει υψηλότερες τιμές στα δείγματα των μαρτύρων.

ABSTRACT

Effect of Pectolytic Enzyme in Color Characteristics during the maceration process of Agiorgitiko – Variety grape

Douvrís D. Timothy

It was studied the chromatic characteristics' and total phenols' progress during the maceration process of grape variety *Vitis Vinifera* L. Agiorgitiko after adding pectolytic enzymes.

Eight experimental procedures were held in a laboratory level while various analytical methods were applied for the determination of polyphenols.

During the maceration process of Agiorgitiko, it is observed an increase in colour's intensity, with higher values in the samples with enzymes. The levels of total anthocyanin concentration follow a similar pattern, with small differences in the values of samples with enzymes in comparison with the equivalent samples without enzymes. The index of total phenols, even though it follows an increasing progress, in half of the experimental procedures' it presents higher values in samples without enzymes.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή	8
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	10
2. Η αμπελουργική ζώνη της Νεμέας	10
2.1 Η ζώνη παραγωγής οίνων Ο.Π.Α.Π. Νεμέα	10
2.2 Η ποικιλία Αγιωργίτικο	13
2.2.1 Αμπελογραφικοί χαρακτήρες	13
2.2.2 Ιδιότητες και καλλιεργητική συμπεριφορά.....	13
2.3 Ο οίνος Αγιωργίτικο	14
3. Τα Ένζυμα	16
3.1 Γενικά.....	16
3.2 Φύση των Ενζύμων	16
3.3 Μηχανισμός δράσης των ενζύμων.....	16
3.3.1 Μεταβολές στη συγκέντρωση του υποστρώματος.....	19
3.3.2 Μεταβολές στη θερμοκρασία	20
3.3.3 Μεταβολές στο pH	21
3.3.4. Ύπαρξη παρεμποδιστών	22
3.3.5. Μεταβολές στη συγκέντρωση του ενζύμου	22
4. Ένζυμα και Οινοποίηση	23
4.1. Γενικά.....	23
4.2. Πηκτινάσες.....	25
4.2.1. Ενζυμική αποικοδόμηση των πηκτινών	25
4.2.2. Ιδιότητες και ο ρόλος των πηκτινών στις σταφυλές.....	26
4.3. Γλυκοζιδάσες	27
4.3.1. Οι β-γλυκοζιδάσες στις σταφυλές	27
4.4. Μηχανισμός Δράσης των ενζύμων στο γλεύκος	28
4.4.1 Λευκή οινοποίηση.....	28

4.4.2. Ερυθρή οινοποίηση	29
4.5. Απελευθέρωση του χρώματος	30
4.6. Αύξηση των αρωμάτων με τη χρήση ενζύμων	32
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	36
5. Σχεδιασμός Πειράματος.....	36
5.1. Σκοπός του πειράματος	36
5.2. Βασικά στοιχεία του πειράματος.....	36
5.3. Υλικά και Μέθοδοι.....	37
5.4. Μέθοδοι Ανάλυσης.....	38
5.4.1. Αναλυτικές μέθοδοι για τη μέτρηση των ενζυματικών δραστηριοτήτων στα εμπορικά σκευάσματα	38
5.4.1.1. Πολυγαλακτουρονάσες – Κυτταρινάσες	38
5.4.1.2. Ενδοπολυγαλακτουρονάσες	39
5.4.1.3. Πηκτινестεράσες.....	39
5.4.1.4. Πηκτινολυάσες.....	39
5.4.1.5. Β-γλυκοζιδάσες	39
5.4.2. Αναλυτικές Μέθοδοι Μέτρησης Παραμέτρων του Γλεύκουσ	40
5.4.2.1. Ένταση χρώματος – Απόχρωση	40
5.4.2.2. Δείκτης Ολικών Φαινολών (Δ.Φ.Ο.).....	40
5.4.2.3. Ολικές Φαινόλες	41
5.4.2.4. Ολικές ανθοκυάνες	41
6. Αποτελέσματα – Συζήτηση.....	42
6.1. Αποτελέσματα μέτρησης των ενζυμικών δραστηριοτήτων.....	42
6.2. Ένταση χρώματος - Απόχρωση.....	44
6.3.Ολικές Φαινόλες.....	47
6.4. Ολικές ανθοκυάνες	49
6.5. Συζήτηση των αποτελεσμάτων των δειγμάτων εκχύλισης	51

7. Συμπεράσματα	54
7.1. Συμπεράσματα των αποτελεσμάτων	54
7.2. Προοπτικές	55
Βιβλιογραφία	57

1. Εισαγωγή

Οι πολυφαινόλες διαδραματίζουν ένα πολύ σημαντικό ρόλο στην οπτική ποιότητα των ερυθρών οίνων, καθώς είναι ουσιαστικής σπουδαιότητας για την εξασφάλιση της ποιότητας των οίνων. Οι πολυφαινόλες συμβάλλουν στη διαμόρφωση του χρώματος, καθορίζουν τους ιδιαίτερους γευστικούς χαρακτήρες, ενώ πολλά φαινολικά παράγωγα υπεισέρχονται και στους αρωματικούς χαρακτήρες. Επιπλέον, τα πολυφαινολικά συστατικά είναι οι κύριοι υπεύθυνοι για τις θετικές ή αρνητικές μεταβολές της οινικής ποιότητας κατά τις διάφορες φάσεις της παραγωγής, της ωρίμανσης, της συντήρησης και της παλαίωσης των οίνων. Τα πλούσια σε χρώμα κρασιά, με καλή δομή και στρογγυλάδα, είναι σε υψηλή απαίτηση από τους καταναλωτές. Αυτό σημαίνει ότι η εκχύλιση των πολυφαινολών από το τους φλοιούς και τα γίγαρτα, θα πρέπει να είναι όσον το δυνατόν μεγαλύτερη ούτως ώστε να εξασφαλίσει την ένταση και τη σταθερότητα του χρώματος κατά τη διάρκεια της παλαίωσης (Κουράκου-Δραγώνα, 1998).

Οι πολυφαινόλες στις σταφυλές βρίσκονται κυρίως στα κύτταρα των ραγών. Η διαπερατότητα των πολυφαινολών από τα τοιχώματα των κυττάρων μπορεί να αυξηθεί, με υδρόλυση των δομικών πολυσακχαριτών, όπως είναι οι πηκτίνες, οι ημικυτταρίνες και οι κυτταρίνες, μια διαδικασία η οποία μπορεί να επιτευχθεί με τη δράση των ενζύμων. Από το αρχικό στάδιο της έκθλιψης, κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, μετά το πέρας αυτής και τη παλαίωση, τα ένζυμα μπορούν να θεωρηθούν ως οι κύριοι βιοκαταλύτες των διάφορων βιοχημικών αντιδράσεων. Οι βιοκαταλύτες αυτοί δεν προέρχονται αποκλειστικά και μόνο από τις σταφυλές, αλλά και από τις ζύμες και από διάφορους μικροοργανισμούς οι οποίοι ενδημούν στους αμπελώνες ή στα οινοποιεία.

Τα τεράστια άλματα τα οποία έχουν πραγματοποιηθεί στο χώρο της έρευνας κατά το διάστημα των τελευταίων δεκαετιών έχουν επηρεάσει σημαντικά την τεχνολογία της οινοποίησης επιτρέποντας τη παραγωγή οίνων ανώτερης ποιότητας.

Σήμερα, αρκετοί οινοπαραγωγοί δυναμώνουν και διευρύνουν τη δράση των ενδογενών ενζύμων με τη προσθήκη ενός ευρύτατου φάσματος ενζυμικών παρασκευασμάτων¹. Τα ενζυμικά σκευάσματα τα οποία χρησιμοποιούνται στην οινολογία είναι σύνθετα πηκτινολυτικά μίγματα, τα οποία περιέχουν κυρίως πολυγαλακτουρονάσες, πηκτινεστεράσες, πηκτινολυάσες, κυτταρινάσες, ημικυτταρινάσες και πρωτεάσες. Η ανάπτυξη αυτών των μιγμάτων έχει γίνει προκειμένου να επιτευχθεί μια πιο ολοκληρωμένη

¹ Οι ενδογενείς δραστηριότητες των ενζύμων είναι πάρα πολύ χαμηλές για να έχουν μια τεχνολογική επίδραση και πρέπει να ενισχυθούν από εξωγενή ένζυμα (Grassin, 1987).

και γρήγορη λύση των κυττάρων και να ενισχυθεί το χρώμα των οίνων (Gil και Valles, 2001, Clare και λοιποί, 2002), με σκοπό τη βελτίωση της διαδικασίας της διαύγασης και των άλλων κατεργασιών του οίνου καθώς επίσης και την απελευθέρωση των ποικιλιακών αρωμάτων από τις πρόδρομες αρωματικές ουσίες. Τα εξωγενή ένζυμα απελευθερώνουν και περισσότερες ταννίνες, ως αποτέλεσμα των κυτταρινασών. Οι ταννίνες είναι υπεύθυνες για τη σταθεροποίηση του χρώματος του οίνου.

Η παρούσα εργασία αποτελείται κυρίως από τρία μέρη, το θεωρητικό μέρος, το πειραματικό μέρος και τα αποτελέσματα – συμπεράσματα της συγκεκριμένης εργασίας. Στο θεωρητικό μέρος, αρχικά γίνεται αναφορά στην αμπελουργική ζώνη της Νεμέας και τις ιδιομορφίες της και εν συνεχεία, δίδεται το θεωρητικό υπόβαθρο των ενζύμων, ο μηχανισμός δράσης τους και η σημασία τους στους οίνους. Στο πειραματικό μέρος, αναφέρεται ο σχεδιασμός του πειράματος, καθώς και οι αναλυτικές μέθοδοι οι οποίες εφαρμόστηκαν. Τέλος, στα αποτελέσματα – συμπεράσματα παρατίθενται όλα τα αποτελέσματα των αναλυτικών μεθόδων οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν και τα συμπεράσματα τα οποία προέκυψαν.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2. Η αμπελουργική ζώνη της Νεμέας

2.1 Η ζώνη παραγωγής οίνων Ο.Π.Α.Π. Νεμέα

Η Νεμέα είναι κωμόπολη του Νομού Κορινθίας βορειοανατολικά της Πελοποννήσου. Βρίσκεται 45 περίπου χιλιόμετρα νοτιοδυτικά της Κορίνθου, κοντά στο όρος Προφήτης Ηλίας, σε υψόμετρο 320 μέτρων. Η ευρύτερη περιοχή της Νεμέας αποτελεί τη μεγαλύτερη αμπελουργική ζώνη της Ελλάδας, στην οποία καλλιεργείται η φημισμένη και διεθνώς αναγνωρισμένη ποικιλία αμπέλου Αγιωργίτικο (*V. Vinifera* L.) και οι ονομαστοί οίνοι Ονομασίας Προέλευσης Ανώτερης Ποιότητας (Ο.Π.Α.Π.) NEMEA.

Η αμπελουργική ζώνη παραγωγής οίνων Ονομασία Προέλευσης Ανώτερης Ποιότητας (ΟΠΑΠ) «Νεμέα» οροθετήθηκε το 1971 με το Β.Δ. 539/71 με το οποίο αναγνωρίστηκε η Ονομασία Προελεύσεως Νεμέα για δύο τύπους ερυθρών οίνων: ξηρός και γλυκός, ενώ πρόσφατα αναγνωρίστηκε ομοίως και για τον ημίγλυκο.

Στην κατηγορία οίνων Ονομασίας Προέλευσης Ανωτέρας Ποιότητας (Ο.Π.Α.Π.) ανήκουν οίνοι ποιότητας οι οποίοι παράγονται κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες και αυστηρές προδιαγραφές. Για κάθε ένα από αυτά υπάρχει συγκεκριμένη απόφαση ή Π.Δ. το οποίο καθορίζει την περιοχή καλλιέργειας, την ποικιλία (ή τον συνδυασμό ποικιλιών), τη στρεμματική απόδοση, τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του γλεύκους και οίνου, τις καλλιεργητικές τεχνικές, την τεχνική οινοποίησης αλλά και παλαίωσης. Παρ' όλες τις κλιματολογικές διακυμάνσεις από χρονιά σε χρονιά, οι οίνοι Ο.Π.Α.Π. διατηρούν πάντα τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά τα οποία οφείλονται στην καταγωγή τους.

Αρχικά, η ζώνη περιελάμβανε 14 κοινότητες, εν συνεχεία επεκτάθηκε σε άλλες τρεις κοινότητες βάση του (Π.Δ. 457/88). Όλες οι κοινότητες ανήκουν στο Νομό Κορινθίας εκτός από τις Κοινότητες Γυμνό και Μαλανδρένι οι οποίες ανήκουν στο Νομό Αργολίδος. Το κλίμα της αμπελουργικής ζώνης της Νεμέας χαρακτηρίζεται Μεσογειακό ημίξηρο, με μέση ετήσια θερμοκρασία 17 °C, μέση θερμοκρασία για την περίοδο ανάπτυξης 19,9 °C και μέση ετήσια βροχόπτωση 750 mm, εκ της οποίας λιγότερο του 20% λαμβάνει χώρα τη περίοδο ανάπτυξης της αμπέλου (ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε., 1997, Koundouras και λοιποί, 2006).

Η Νεμέα είναι μία από τις μεγαλύτερες ζώνες παραγωγής ερυθρών οίνων ΟΠΑΠ στην Ελλάδα, αφού καλύπτει περισσότερο από 25.000 στρέμματα αμπελώνα (Πίνακας 1.1), ο οποίος αρχίζει από ένα υψόμετρο 200 μ. και φθάνει μέχρι 850 μ. Οι μεγάλες, αυτές, υψομετρικές διαφορές διαφοροποιούν την πορεία ωρίμασης των σταφυλιών καθώς και τον

Δυναμικό Αλκοολικό Τίτλο τους (ΔΑΤ), οδηγώντας σε σταφυλική παραγωγή και κατ' επέκταση σε οίνους με διαφορετικά χαρακτηριστικά.

Πίνακας Κοινότητες οι οποίες υπάγονται στην αμπελουργική ζώνη παραγωγής
1.1: οίνων Ο.Π.Α.Π. ΝΕΜΕΑ (Πηγή: ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε., 1997, Δ/ση Γεωργίας Κορινθίας, 2004).

Αρχική Ζώνη (Β.Δ. 539/71)			Επέκταση Ζώνης (Π.Δ. 457/88)		
Κοινότητες	Υψόμετρο (m)	Έκταση (στρ.)	Κοινότητες	Υψόμετρο (m)	Έκταση (στρ.)
1. Αηδόνια	280 -300	1.090	15. Γυμνό	300-400	300
2. Αογαίες	200-450	1.500	16. Κεφαλάρι	600-680	300
3. Αογαία Νευέα	300-400	4.150	17. Μαλανδρένι	480	120
4. Ασπρόκαμπος	640-760	980			
5. Γαλατάς	280-320	380			
6. Δάωνη	300-500	200			
7. Καστράκι	480-850	220			
8. Κούτσι	280-580	3.200			
9. Λεόντιο	280-340	2.700			
10. Μποζικά	400-840	300			
11. Νευέα	250-450	11.000			
12. Πετροί	270-400	1.050			
13. Τιάνη	340-540	780			
14. Ψάρι	680-740	650			
			Συνολική Έκταση:	28.920 στρ.	

Σε μελέτη της αμπελουργικής ζώνης της Νεμέας, η οποία έγινε από το Ινστιτούτο Οίνου Αθηνών και η οποία διήρκεσε 3 χρόνια, οι αμπελώνες της ζώνης κατατάσσονται σε τρεις ζώνες με βάση το υψόμετρο. Κανονικά, θα έπρεπε να γίνει μακροχρόνια μελέτη, ώστε να ληφθούν υπόψη και άλλοι πολλοί παράγοντες όπως το έδαφος και το μικροκλίμα πολλών επιμέρους περιοχών, καθώς και η καλλιεργητική μέθοδος τα οποία όλα μαζί διαμορφώνουν το ζητούμενο αποτέλεσμα (ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε., 1997).

Αλλά και μόνο με βάση το υψόμετρο, παρατηρούμε ότι στη πρώτη ζώνη όπου κατατάσσονται οι αμπελώνες οι οποίοι βρίσκονται σε ορεινές περιοχές (550-850 μ.) η ωρίμαση καθυστερεί πολύ σε σχέση με τους άλλους αμπελώνες και πολλές φορές δεν κατορθώνει να φτάσει τον βαθμό τεχνολογικής ωριμότητας² για οίνους ερυθρούς ΟΠΑΠ Νεμέα. Οι αμπελώνες αυτής της ζώνης αντιπροσωπεύουν περίπου το 15% της συνολικής έκτασης της ζώνης Νεμέας.

Στην δεύτερη ζώνη, περιλαμβάνονται οι αμπελώνες που βρίσκονται σε υψόμετρο από 320-550 μ. Οι αμπελώνες της ζώνης αυτής έχουν συνήθως αρκετή κλίση και είναι καλά στραγγιζόμενοι, ενώ οι στρεμματικές αποδόσεις τους κυμαίνονται σε χαμηλά επίπεδα. Αντιπροσωπεύουν το 30% περίπου της συνολικής έκτασης της ζώνης.

Η τρίτη ζώνη περιλαμβάνει αμπελώνες οι οποίοι βρίσκονται σε υψόμετρο από 200-320μ. και παρουσιάζουν σημαντική ανομοιομορφία στα χαρακτηριστικά τους και κατ' επέκταση στη ποιότητα των παραγόμενων οίνων. Σε αυτή την περιοχή, αμπελώνες οι οποίοι δεν έχουν μεγάλη στρεμματική απόδοση και είναι σε εδάφη καλά στραγγιζόμενα ωριμάζουν πολύ σύντομα, χωρίς προβλήματα και δίνουν οίνους με υψηλό ΔΑΤ, άνω των 14% vol έως και 15% vol. Αποτελούν τον μεγαλύτερο όγκο της αμπελουργικής ζώνης της Νεμέας, αντιπροσωπεύοντας το 55% της συνολικής έκτασής της.

Ο έντονος πολυμορφισμός των εδαφικών συνθηκών της περιοχής (ανάγλυφο, φυσικές και χημικές ιδιότητες εδάφους) και των κλιματικών παραμέτρων οι οποίοι συμβάλλουν στη δημιουργία μεγάλου αριθμού μικροκλιματικών περιοχών, σε συνδυασμό με την πολυκλωνικότητα της ποικιλίας, διαφοροποιούν αισθητά τους χαρακτήρες του γλεύκους και την ποιότητα των παραγόμενων οίνων. Ιδιαίτερο ρόλο φαίνεται να έχει και η αυξημένη ατμοσφαιρική υγρασία υπό την επίδραση των καταβατικών ανέμων, ειδικά στους ημιορεινούς αμπελώνες, επηρεάζοντας σημαντικά το βαθμό της υδατικής καταπόνησης των πρέμνων και συμβάλλοντας στην ομαλή ωρίμανση των σταφυλών και την παραγωγή ποιοτικών οίνων (Σταυρακάκης, 2009).

Η μέση ετήσια παραγωγή σταφυλών από την ποικιλία Αγιωργίτικο ανέρχεται σε 25.000 τόνους, ενώ από το σύνολο των 28.000 και πλέον στρεμμάτων τα 12.300 στρέμματα είναι παλιές φυτείες (ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε., 1997). Αξίζει να σημειωθεί ότι η καλλιέργεια του Αγιωργίτικου καλύπτει το 44,7% της συνολικής καλλιέργειας αμπέλου, η οποία προορίζεται για τη παραγωγή οίνου, του νομού Κορινθίας (Δ/νση Γεωργίας Κορινθίας, 2004). Η μέση

² **Βαθμός τεχνολογικής ωριμότητας:** Είναι εκείνο το στάδιο της ωρίμασης, κατά το οποίο τα σταφύλια δίνουν γλεύκος το οποίο έχει χημική σύσταση κατάλληλη για τον τύπο του οίνου (ξηρό, γλυκό, αφρώδη κ.ά.), του οποίου επιδιώκεται η παραγωγή.

στρεμματική απόδοση παραγωγής Αγιωργίτικου είναι γύρω στα 1.000 Kg/στρ., υπάρχει όμως μεγάλη διακύμανση η οποία, σύμφωνα με στοιχεία από τη Δ/νση Γεωργίας Κορινθίας, κυμαίνονται από 400-2.000 Kg/στρ. Οι υψηλές στρεμματικές αποδόσεις παρατηρούνται στους πεδινούς αμπελώνες της Νεμέας, καθώς και στους νέους αμπελώνες οι οποίοι είναι εγκατεστημένοι σε γόνιμα και υγρά ή αρδευόμενα εδάφη.

2.2 Η ποικιλία Αγιωργίτικο

Αγιωργίτικο η ήρεμη δύναμη της Νεμέας. Το όνομα της ποικιλίας οφείλεται σ' ένα μικρό χωριό (Άγιος Γεώργιος) (όχι αγιωρίτικο Άγιο Όρος) κοντά στην αρχαία πόλη της Νεμέας. Μια περιοχή η οποία ανέδειξε τη ποικιλία αυτή και μας έχει δώσει πολλά από τα καλύτερα δείγματα της, κατά πολλούς, από τα καλύτερα κρασιά της Ελλάδας. Η καλλιέργειά της έχει επεκταθεί τα τελευταία χρόνια και σε άλλα μέρη της Πελοποννήσου αλλά και γενικότερα της Ελλάδας. Θεωρείται η ευγενέστερη ερυθρή ποικιλία της Νότιας Ελλάδας.

2.2.1 Αμπελογραφικοί χαρακτήρες

Το **σταφύλι** είναι μέτριο, κωνικό ή κυλινδροκωνικό, συχνά διπλό, πυκνό έως πολύ πυκνό. Ο ποδίσκος είναι βραχύς ο οποίος κατά κανόνα ξυλοποιείται πλήρως και αποκόβεται δυσχερώς.

Η **ράγα** είναι μικρή έως μέτρια, σφαιρική καλυμμένη με άφθονη ανθηρότητα, ενώ η σάρκα της είναι χυμώδης, γλυκιά έως ελαφρώς υπόξινη και μετρίως μαλακή. Τα γίγαρτα είναι συνήθως δύο ή τρία ανά ράγα, μέτρια, απιοειδή με παχύ ράμφος.

Το **φύλλο** είναι μέτριο, παχύ, σφηνοειδές και πεντάκολπο. Χαρακτηρίζεται κυματώδες, ελαφρώς πομφολυγώδες, παχύ, με βαθύ πράσινο χρώμα και λείο στην άνω επιφάνεια, ενώ η κάτω επιφάνεια είναι καλυμμένη με βαμβακώδη χνοασμό. Ο μισχικός του κόλπος είναι σχήματος U κλειστού, με επικαλυπτόμενους λοβούς (Σταυρακάκης, 2009).

2.2.2 Ιδιότητες και καλλιεργητική συμπεριφορά

Τα πρέμνα του Αγιωργίτικου είναι μέτριας ζωηρότητας και ευρωστίας, γόνιμα, όψιμης ωρίμανσης και πολύ παραγωγική. Ο τυφλός οφθαλμός είναι γόνιμος, ενώ ο καρποφόρος βλαστός φέρει συνήθως δύο σταφυλές, συχνά όμως εμφανίζονται τρεις ή τέσσερις, όπως και οι περισσότερες ποικιλίες αμπέλου οι οποίες είναι πολυκλωνικής σύνθεσης.

Οι παλαιοί αμπελώνες μορφώνονται σε κύπελλο, με 3-5 βραχίονες και δέχονται βραχύ κλάδεμα. Στους νέους αμπελώνες, τα πρέμνα μορφώνονται σε γραμμικά σχήματα

(συνήθως αμφίπλευρο Royal με 6-8 βραχίονες) και επιδέχονται ομοίως βραχύ κλάδεμα, αλλά οι στρεμματικές αποδόσεις είναι αρκετά μεγαλύτερες, χωρίς όμως να παρατηρούνται, εκτός από ακραίες περιπτώσεις, αρνητικές συνέπειες στην ποιότητα των οινικών προϊόντων.

Η ποικιλία παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία στο ωίδιο και τις ιώσεις και μέτρια ευαισθησία στον περονόσπορο, στους ανοιξιάτικους παγετούς και στη ξηρασία (Σταυρακάκης, 2009).

2.3 Ο οίνος Αγιωργίτικο

Τα κρασιά από Αγιωργίτικο είναι πλούσια σε χρώμα (ρουμπινί), οι τανίνες τους είναι μαλακές (ευκολόπιota μαλακά κρασιά) και τα καλύτερα δείγματα επιδέχονται παλαιώση. Στη μύτη μας δίνουν αρώματα μπαχαρικών (μοσχοκάρυδο), βαλσαμικά αρώματα (δεντρολίβανο). Η βανίλια η οποία ίσως διακρίνεται οφείλεται στο βαρέλι και όχι στο σταφύλι.

Έτσι, από τα πρέμνα τα οποία καλλιεργούνται στα υψηλότερα επίπεδα, αυτά της πρώτης ζώνης όπου επικρατούν χαμηλές θερμοκρασίες κατά τη διάρκεια του τρυγητού, ο οποίος εκ των πραγμάτων είναι πάντα όψιμος, δίνει σταφύλια τα οποία έχουν αρκετή συγκέντρωση οξέων (τρυγικού, μηλικού κ.ά.), τα οποία με τη σειρά τους μπορούν να μας δώσουν οίνους ερυθρούς φρέσκους ή ερυθρωπούς (ροζέ), με πλούσια αρώματα φρέσκων φρούτων και λουλουδιών, με τονισμένη οξύτητα και χωρίς να είναι αναγκαίο να αποκτήσουν ένα υψηλό ΔΑΤ (11,5 vol).

Οι αμπελώνες της δεύτερης ζώνης δίνουν συνήθως ερυθρούς οίνους υψηλής ποιότητας, βαθύχρωμους, με αρμονικούς γευστικούς χαρακτήρες. Από πλευράς ωρίμανσης, δεν αντιμετωπίζουν προβλήματα, ενώ θεωρούνται από τους πιο πρώιμους. Σε αυτές τις περιοχές, αμπελώνες με χαμηλή στρεμματική απόδοση δίνουν σταφύλια τα οποία με την ανάλογη, μέθοδο οινοποίησης δίνουν εξαιρετικούς οίνους βαθιάς παλαιώσης, με σύνθετο μπουκέτο, αρμονικές γεύσεις, ισορροπημένη οξύτητα, πληθώρα ευγενών ταννινών και αρκετά υψηλό ΔΑΤ, συνήθως άνω του 13% vol έως και 14% vol, ενώ είναι ιδιαίτερα πλούσιοι σε ολικές φαινόλες, κατεχίνες και ανθοκυάνες, παρουσιάζοντας τις υψηλότερες τιμές έντασης από τις άλλες ζώνες.

Η τρίτη ζώνη διακρίνεται από την ανομοιομορφία της και στην ποιότητα των παραγόμενων οίνων. Τα σταφύλια αυτής της περιοχής, αποκτούν σύσταση η οποία προσφέρεται για την παραγωγή οίνων της κατηγορίας των vins de liqueur. Γι' αυτόν ακριβώς

τον λόγο η ονομασία προέλευσης Νεμέα έχει αναγνωρισθεί εξ αρχής όχι μόνο για τους ερυθρούς ξηρούς οίνους, αλλά και για τους οίνους της κατηγορίας αυτής (VDN).

Η χαρισματική αυτή ποικιλία, το Αγιωργίτικο, είναι όντως πολυδυναμική, διότι μπορεί ανάλογα με το υψόμετρο, με τη σύσταση του εδάφους και με τις εκάστοτε καλλιεργητικές μεθόδους να μας προσφέρει εξαιρετικούς οίνους ροζέ, ερυθρούς φρέσκους, ερυθρούς βαθιάς παλαίωσης, γλυκούς και ημίγλυκους, οι οποίοι θα εκπλήσσουν πάντα ευχάριστα τον ουρανίσκο μας.

3. Τα Ένζυμα

3.1 Γενικά

Ο άνθρωπος χρησιμοποιούσε τα ένζυμα και τους μικροοργανισμούς πριν από μερικές χιλιάδες χρόνια, χωρίς να γνωρίζει ακριβώς τη λειτουργία τους, για τη παραγωγή ορισμένων παραδοσιακών τροφίμων και για τη παραγωγή αλκοολούχων ποτών. Μόλις τον προηγούμενο αιώνα οι επιστήμονες ανακάλυψαν τους μικροοργανισμούς και τα ένζυμα. Μετά το 1940 άρχισε η παραγωγή ενζύμων τα οποία χρησιμοποιούνται στη τεχνολογία των τροφίμων.

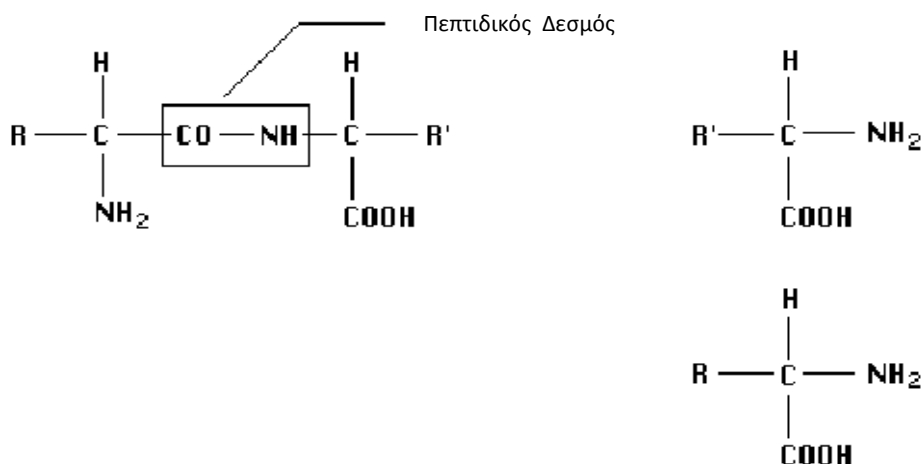
Τα ένζυμα παίζουν έναν καταλυτικό ρόλο στη ποιότητα και ταυτότητα των τροφίμων. Απαντώνται σε όλα τα στάδια της επεξεργασίας τους, από τη πρώτη ύλη μέχρι το τελικό προϊόν και είναι ένας από τους πιο βασικούς παράγοντες ο οποίος επηρεάζει το τελικό αποτέλεσμα του κάθε προϊόντος. Τουλάχιστον 75 τοις εκατό όλων των βιομηχανικών ενζύμων είναι υδρολυτικά στη δράση και χρησιμοποιούνται για τον αποπολυμερισμό των φυσικών ουσιών. Γι' αυτόν ακριβώς το λόγο η μελέτη και η γνώση τους είναι απαραίτητη και αναγκαία προϋπόθεση της σύγχρονης επεξεργασίας των τροφίμων (Γαλιώτου – Παναγιώτου, 1998, Tony Godfrey & Stuart West, 1996).

3.2 Φύση των Ενζύμων

Κάθε ζωντανός οργανισμός διαθέτει έναν μηχανισμό παραγωγής μιας ομάδας καταλυτών πρωτεϊνικής φύσεως τα οποία ονομάζονται ένζυμα. Τα ένζυμα είναι πρωτεΐνες και δρουν ως καταλύτες αντιδράσεων οι οποίες πραγματοποιούνται στο εσωτερικό του κυττάρου. Τα ένζυμα έχουν τη δομή των πρωτεϊνών, η δομική τους μονάδα είναι το α – αμινοξύ το οποίο περιέχει δύο ομάδες, την αμινομάδα – NH₂ και τη καρβοξυλόμαδα – COOH όπως φαίνεται στο σχήμα 3.1. Εκτός από αυτές τις δύο λειτουργικές ομάδες, το κεντρικό άτομο άνθρακα, το οποίο είναι α – άτομο άνθρακα, έχει ένα άτομο H και μία ομάδα – R (Γαλιώτου – Παναγιώτου, 1998, Διαμαντίδης, 2007).

3.3 Μηχανισμός δράσης των ενζύμων

Για να ξεκινήσει μια χημική αντίδραση, θα πρέπει τα αντιδρώντα μόρια να βρίσκονται σε κατάσταση δυναμικής ισορροπίας. Τα μόρια φθάνοντας σε αυτή τη κατάσταση, αντιδρούν, ελευθερώνεται ενέργεια και το σύστημα καταλήγει σε μια κατάσταση ισορροπίας. Ενέργεια ενεργοποίησης είναι η ενέργεια η οποία πρέπει να προσφερθεί στα αντιδρώντα μόρια για να βρεθούν στη κατάσταση ισορροπίας (Γαλιώτου – Παναγιώτου, 1998).

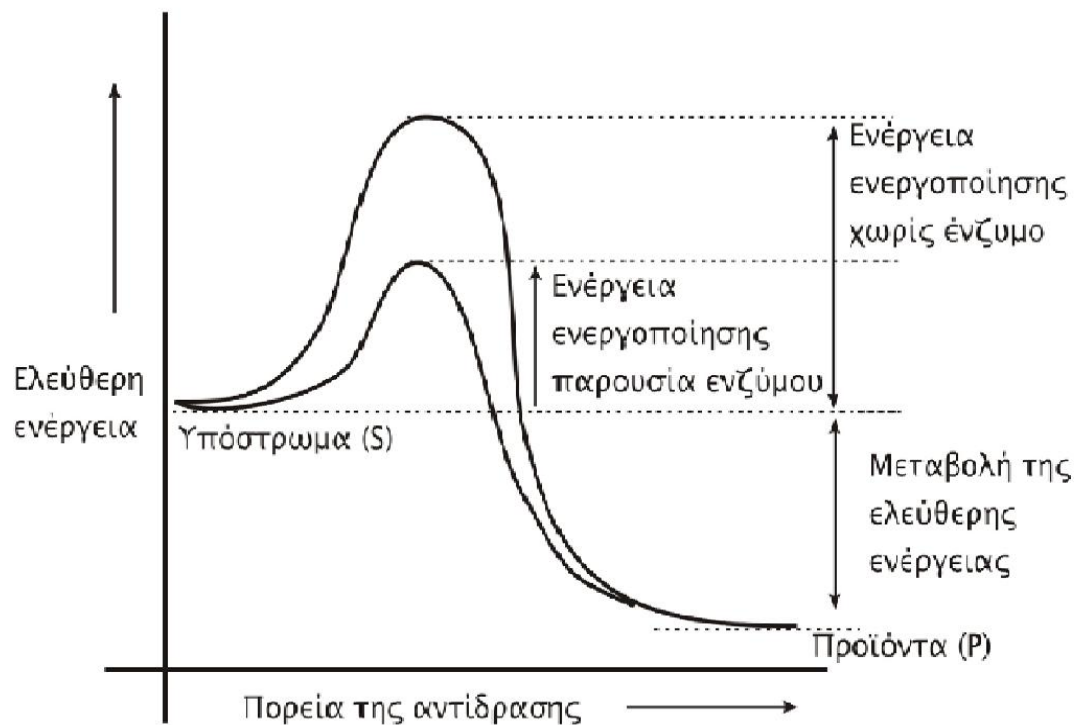


Σχήμα 3.1. Τυπική δομή δύο αμινοξέων ενωμένων με πεπτιδικό δεσμό (Πηγή: *Manual of Clinical Enzyme Measurements*, 1972).

Στο περιβάλλον η ενέργεια ενεργοποίησης μπορεί να εξασφαλιστεί με προσφορά θερμότητας. Αν τις αντιδράσεις του μεταβολισμού τις κάνουμε στο εργαστήριο έξω από το κύτταρο παρατηρούμε ότι απαιτούν μεγάλα ποσά θερμότητας τα οποία θα κατέστρεφαν το κύτταρο. Επίσης ο χρόνος πραγματοποίησης τους είναι πολύ μεγάλος και το κύτταρο δεν μπορεί να περιμένει γιατί οι ανάγκες ενός κυττάρου είναι άμεσες. Τα κύτταρα για να αντιμετωπίσουν τα προβλήματα αυτά διαθέτουν μηχανισμό μείωσης της ενέργειας ενεργοποίησης ο οποίος δεν είναι άλλος από τα ένζυμα. Η ενέργεια ενεργοποίησης είναι το μέγεθος το οποίο καθορίζει ακριβώς πόσο γρήγορα θα προχωρήσει μια αντίδραση. Θεωρείται ότι τα ένζυμα μειώνουν την ενέργεια ενεργοποίησης για την αντίδραση την οποία καταλύουν. Το σχήμα 3.2 επεξηγεί αυτήν την έννοια. Χωρίς αυτά πολλές αντιδράσεις δε θα ήταν δυνατό να πραγματοποιηθούν. Η ταχύτητα μιας αντίδρασης μπορεί να αυξηθεί μέχρι 100 εκατομμύρια φορές (Ντράνος).

Αυτό επιτυγχάνεται με τον κατάλληλο προσανατολισμό των αντιδρώντων μορίων τα οποία λέγονται και μόρια υποστρώματα. Κάθε ένζυμο έχει μια ειδική περιοχή το ενεργό κέντρο στο οποίο ενώνεται το υπόστρωμα. Στα περισσότερα ένζυμα το ενεργό κέντρο έχει ήδη σχηματιστεί και είναι έτοιμο να δεχθεί ένα συγκεκριμένο υπόστρωμα με ορισμένη χωροδιάταξη. Αυτό το μοντέλο σύνδεσης λέγεται κλειδιού – κλειδαριάς, όπως απεικονίζεται και στο σχήμα 3.3. Ενεργό κέντρο και υπόστρωμα ταιριάζουν δομικά. Μερικές φορές αυτό γίνεται μετά την πρόσδεση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο. Όταν το υπόστρωμα συνδεθεί με το ενεργό κέντρο οι δεσμοί μεταξύ των μορίων του εξασθενούν,

σπάνε εύκολα και μπορούν να δημιουργηθούν νέοι οπότε να πάρουμε τα προϊόντα της ενζυμικής αντίδρασης (Ντράνος).



Σχήμα 3.2. Διάγραμμα ενέργειας μιας αντίδρασης με και χωρίς ένζυμο (Πηγή : *Manual of Clinical Enzyme Measurements*, 1972).

Η παρουσία των ενζύμων αυξάνει την πιθανότητα σύγκρουσης των μορίων του υποστρώματος με τη σωστή τους μεριά για να μπορέσουν να αντιδράσουν. Πολλά ένζυμα για να λειτουργήσουν είναι απαραίτητη η παρουσία και κάποιας άλλης χημικής ένωσης ή κάποιου στοιχείου τα οποία ονομάζονται συμπαράγοντες³.

Οι συμπαράγοντες των ενζύμων μπορεί να είναι :

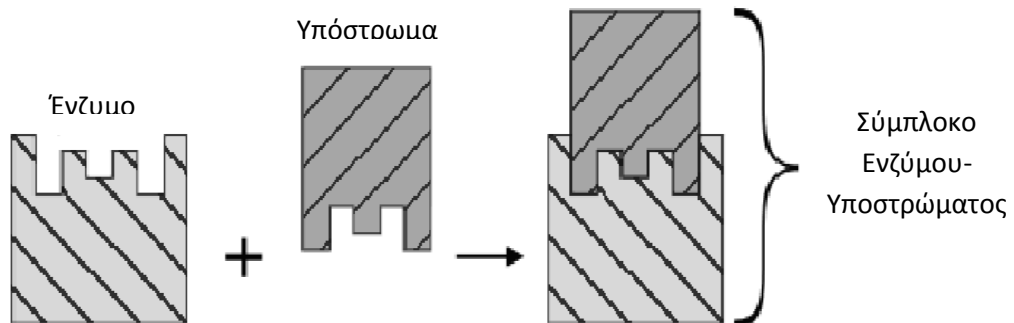
- Ανόργανα ιόντα, όπως K^+ , Fe^{++} , Fe^{+++} , Cu^{++} , Co^{++} , Zn^{++} , Mn^{++} , Mg^{++} , Ca^{++} και Mo^{+++} .
- Προσθετικές ομάδες. . Είναι μη πρωτεϊνικά οργανικά μόρια τα οποία αποτελούν τμήμα του ενζύμου, π.χ. το FAD (φλαβινο – αδενινο – δινουκλεοτίδιο) το

³ Οι **συμπαράγοντες** είναι μη πρωτεϊνικές ενώσεις, οργανικές ή ανόργανες, οι οποίες είναι απαραίτητες για τη λειτουργία του ενζύμου.

οποίο περιέχει τη ριβοφλαβίνη (βιταμίνη B₂) η οποία σχετίζεται με τη μεταφορά υδρογόνου κατά την κυτταρική αναπνοή.

- Συνένζυμα. Είναι οργανικοί συμπράγοντες οι οποίοι δεν αποτελούν τμήμα του ενζύμου, π.χ. τα NAD, NADP, συνένζυμο A,ATP. Οι περισσότερες βιταμίνες είναι συνένζυμα.

Η ταχύτητα μιας ενζυμικής αντίδρασης εξαρτάται από τη συγκέντρωση του υποστρώματος, τη θερμοκρασία, το pH, την ύπαρξη παρεμποδιστών⁴ και τη συγκέντρωση του ενζύμου (Manual of Clinical Enzyme Measurements, 1972).

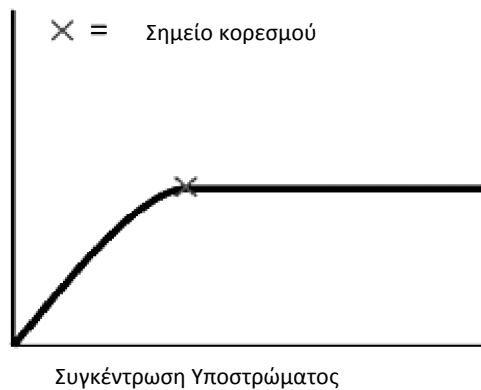


Σχήμα 3.3. Μοντέλο σύνδεσης ενζύμου (E) και υποστρώματος (S).

3.3.1 Μεταβολές στη συγκέντρωση του υποστρώματος

Στο κυτταρόπλασμα υπάρχει περιορισμένος αριθμός μορίων ενζύμου. Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του υποστρώματος τόσο αυξάνεται και η ταχύτητα με την οποία διεξάγεται η αντίδραση μέχρι ενός σημείου (σημείο κορεσμού) στο οποίο η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι τόσο αυξημένη ώστε να γεμίζουν όλα τα ενεργά κέντρα των διαθέσιμων μορίων ενζύμου με υπόστρωμα. Από αυτό το σημείο και μετά η αύξηση της συγκέντρωσης υποστρώματος δεν προκαλεί αύξηση στην ταχύτητα της αντίδρασης (ρυθμός αντίδρασης) επειδή δεν υπάρχουν άλλα διαθέσιμα ενεργά κέντρα. Αυτό απεικονίζεται πολύ καλά στο σχήμα 3.4 (Νικολάου).

⁴ Οι παρεμποδιστές είναι χημικές ενώσεις ή ιόντα των οποίων η παρουσία τους εμποδίζει τη δράση των ενζύμων.

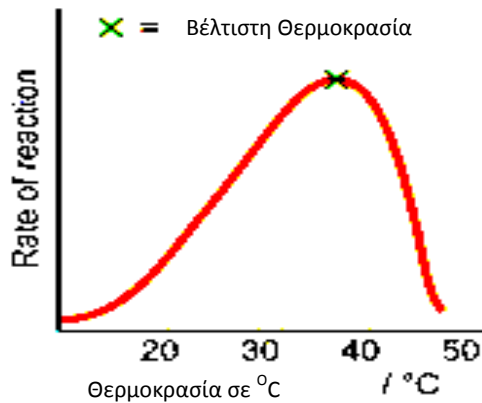


Σχήμα 3.4. Η αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος προκαλεί αύξηση του ρυθμού της αντίδρασης μέχρι την άριστη τιμή. Μετά από την άριστη τιμή με την αύξηση της συγκέντρωσης ο ρυθμός της αντίδρασης παραμένει σταθερός (Manual of Clinical Enzyme Measurements, 1972).

3.3.2 Μεταβολές στη θερμοκρασία

Για κάθε ένζυμο υπάρχει μια άριστη τιμή της θερμοκρασίας στην οποία η ταχύτητα της αντίδρασης η οποία καταλύει γίνεται μέγιστη. Κάτω απ' αυτή την άριστη τιμή, οι δεσμοί υδρογόνου και οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, οι οποίες διαμορφώνουν τη στερεοχημική δομή του ενζύμου, δεν επιτρέπουν στο ενεργό κέντρο να συνδεθεί με το υπόστρωμα με τον καλύτερο δυνατό τρόπο. Πάνω από την άριστη τιμή, οι δεσμοί υδρογόνου και οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις χαλαρώνουν, το σχήμα του ενεργού κέντρου αλλάζει και το ένζυμο καθίσταται ανενεργό. Υπέρμετρη αύξηση της θερμοκρασίας προκαλεί μετουσίωση των ενζύμων, δηλαδή καταστροφή της τρισδιάστατης δομής τους και απώλειας της λειτουργικότητάς τους, επειδή σπάζουν οι χημικοί δεσμοί μεταξύ των πλευρικών ομάδων των αμινοξέων της πρωτεΐνης-ενζύμου (Νικολάου).

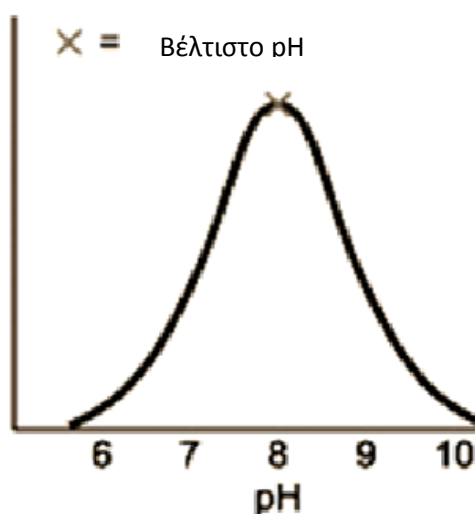
Τα περισσότερα ένζυμα αδρανοποιούνται σε θερμοκρασίες πάνω από 50 °C (Σχήμα 3.5). Γι' αυτόν το λόγο η χρήση των ενζύμων ως καταλύτες πρέπει να γίνεται σε θερμοκρασία κατώτερη από αυτήν, ενώ η συντήρησή τους και επεξεργασία τους στους 5 °C περίπου. Στη θερμοκρασία αυτή παρουσιάζουν μεγάλη σταθερότητα (Γαλιώτου – Παναγιώτου, 1998). Αύξηση της θερμοκρασίας κατά 10 °C θα μπορούσε να αυξήσει τη δράση στα περισσότερα ένζυμα από 50 έως και 100 %. Μεταβολή της θερμοκρασίας αντίδρασης από 1 έως 2 °C θα μπορούσε να προκαλέσει αλλαγές από 10 έως 20 % επί του αποτελέσματος (Manual of Clinical Enzyme Measurements, 1972).



Σχήμα 3.5. Ρυθμός αντίδρασης ενός ενζύμου σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία.

3.3.3 Μεταβολές στο pH

Τα ένζυμα επηρεάζονται από τις μεταβολές του pH. Οι ιοντικοί δεσμοί μεταξύ των πλευρικών ομάδων των αμινοξέων είναι πολύ ευαίσθητοι στις συγκεντρώσεις ιόντων υδρογόνου (H^+) και υδροξυλίου (OH^-) οι οποίοι καθορίζουν το pH. Όταν το διάλυμα είναι όξινο υπάρχει υψηλή συγκέντρωση H^+ ενώ όταν είναι βασικό υπάρχει υψηλή συγκέντρωση OH^- . Τα ιόντα υδρογόνου (H^+) και υδροξυλίου (OH^-) παρεμβαίνουν περικυκλώνοντας τις αρνητικά φορτισμένες και θετικά φορτισμένες πλευρικές ομάδες αμινοξέων αντίστοιχα κι έτσι σπάνε τους ιοντικούς δεσμούς. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να αλλάζει το σχήμα του ενεργού κέντρου και το ένζυμο να καθίσταται ανενεργό. Τα περισσότερα ένζυμα δρουν σε pH 6,5-8,5 δηλαδή σε περίπου ουδέτερο περιβάλλον όπως απεικονίζεται στο σχήμα 3.6 (Νικολάου).



Σχήμα 3.6. Ρυθμός δράσης ενός ενζύμου σε συνάρτηση με το pH.

3.3.4. Ύπαρξη παρεμποδιστών

Η παρεμπόδιση της δράσης ενός ενζύμου καλείται αναστολή ή παρεμπόδιση. **Αναστολείς** είναι εκείνες οι χημικές ουσίες οι οποίες όταν ενωθούν με τα ένζυμα προκαλούν μορφολογικές αλλαγές σ' αυτά και άρα αναστολή στη δράση τους. **Ενεργοποιητές** είναι εκείνες οι χημικές ουσίες οι οποίες όταν ενωθούν με τα ένζυμα διαμορφώνουν το ενεργό τους κέντρο ώστε να μπορεί να δεχτεί το υπόστρωμα. Τόσο με τους ενεργοποιητές όσο και με τους αναστολείς το κύτταρο μπορεί να ελέγξει ποιο ένζυμο πρέπει να είναι ενεργό και ποιο αδρανές σε κάθε χρονική στιγμή. Τα ένζυμα έχουν ειδικές θέσεις στις οποίες ενώνονται οι αναστολείς και οι ενεργοποιητές. **Μόνιμοι Αναστολείς** ή **δηλητήρια** είναι οι χημικές ουσίες οι οποίες όταν ενωθούν με το ένζυμο αναστέλλουν μόνιμα τη δράση του. Ακόμα κι αν αφαιρεθούν, το ένζυμο δεν μπορεί να επανακτήσει την ενεργότητά του. Μόνιμοι αναστολείς θεωρούνται τα ιόντα των βαρέων μετάλλων, όπως του υδραργύρου και του μολύβδου, πολλά από τα αντιβιοτικά φάρμακα όπως η πενικιλίνη, οι ενώσεις κυανίου και το μονοξειδίο του άνθρακα. **Αντιστρεπτοί αναστολείς** είναι οι χημικές ουσίες οι οποίες όταν ενωθούν με το ένζυμο αναστέλλουν τη δράση του για όσο καιρό παραμένουν ενωμένες σ' αυτό.

Υπάρχουν δύο είδη αντιστρεπτών αναστολέων:

- **Συναγωνιστικοί αντιστρεπτοί αναστολείς** : Συνδέονται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και δεν επιτρέπουν στο υπόστρωμα να ενωθεί με το ενεργό κέντρο.
- **Μη συναγωνιστικοί αντιστρεπτοί αναστολείς** : Συνδέονται σε άλλη θέση του ενζύμου και τροποποιούν το σχήμα του με αποτέλεσμα να μην ταιριάζει το υπόστρωμα στο ενεργό κέντρο (Γαλιώτου – Παναγιώτου).

3.3.5. Μεταβολές στη συγκέντρωση του ενζύμου

Η συγκέντρωση των μορίων ενός ενζύμου είναι περίπου εκατό χιλιάδες φορές μικρότερη από την συγκέντρωση των μορίων του υποστρώματος. Συνεπώς, μικρή αύξηση στη συγκέντρωση του ενζύμου μπορεί να επιφέρει μεγάλη αύξηση στο ρυθμό της αντίδρασης (Νικολάου).

4. Ένζυμα και Οινοποίηση

4.1. Γενικά

Η οινολογία πάντα αντιμετωπίζει προβλήματα λόγω της ιδιομορφίας των σταφυλιών, των οποίων η σύνθεση είναι μεταβλητή και διαφορετική για κάθε τρυγητό. Ο οινολόγος προσπαθεί να αποτρέψει την οξείδωση και εργάζεται υπό τέτοιες συνθήκες οι οποίες ευνοούν τη συντήρηση των μερών της σταφυλής, ώστε να υπάρξει μία ισορροπία στο κρασί. Η κατάσταση υγιεινής των σταφυλών κατά τη συγκομιδή παίζει πρωτεύοντα ρόλο, και όχι μοναδικό, για τη μετέπειτα πορεία του γλεύκους. Η σύνθεση της σταφυλής εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, αξίζει να σημειωθεί ότι η σύνθεση της ράγας αλλάζει με την ωρίμανση. Ένα ώριμο, καλής ποιότητας σταφύλι χαρακτηρίζεται από φλοιούς πλούσιους σε ανθοκυάνες και ταννίνες με πολύπλοκη δομή και σχετικά ανενεργές με τα άλλα συστατικά, με μεγάλο βαθμό εκχυλισματικότητας, και από γίγαρτα με μικρό ποσοστό πολυμερισμένων ταννινών οι οποίες αντιδρούν ισχυρά με πρωτεΐνες. Η αναλογία των φαινολικών συστατικών της ράγας και κατ' επέκταση του οίνου, εξαρτάται από την ποικιλία, το βαθμό ωριμότητας της σταφυλής, τις εδαφοκλιματικές συνθήκες, τις καλλιεργητικές τεχνικές, αλλά και την τεχνική οινοποίησης (C. Grassin, P. Fauquembergue, 1996, Arozarena et al., 2000).

Η ετερογένεια της ακατέργαστης σύνθεσης των σταφυλών καθώς επίσης η αξιολόγηση του χαρακτήρα του τρυγητού απαιτούν τη συνεχή παρακολούθηση, τον έλεγχο, τις έγκαιρες αποφάσεις, και μεγάλη εμπειρία. Ο κύριος στόχος για τον οινολόγο είναι να μπορέσει να κρατήσει και παράλληλα να ενισχύσει τα συστατικά των σταφυλών τα οποία θα καθορίσουν την ποιότητα του παραγόμενου οίνου, μεταξύ των οποίων είναι, τα πρωτογενή αρώματα, τα οποία προέρχονται από τον φλοιό της ράγας της σταφυλής και τα δευτερογενή αρώματα της ζύμωσης και της παλαίωσης (C. Grassin, P. Fauquembergue, 1996).

Τα φαινολικά συστατικά αποτελούν ένα από τα σημαντικότερα κεφάλαια της οινολογίας, καθώς παίζουν καθοριστικό ρόλο στην εξασφάλιση της ποιότητας των οίνων. Συμβάλλουν στη διαμόρφωση του χρώματος, καθορίζουν τους ιδιαίτερους γευστικούς χαρακτήρες, ενώ πολλά φαινολικά παράγωγα υπεισέρχονται και στους αρωματικούς χαρακτήρες. Επιπλέον, τα φαινολικά συστατικά είναι οι κύριοι υπεύθυνοι για τις θετικές ή αρνητικές μεταβολές της οινικής ποιότητας κατά τις διάφορες φάσεις της παραγωγής, την ωρίμανση, τη συντήρηση και τη παλαίωση των οίνων (Κουράκου-Δραγώνα, 1998).

Σήμερα χρησιμοποιούνται ευρέως τα εξωγενή ένζυμα κατά τη διάρκεια της οινοποίησης. Για παράδειγμα στα τέλη της δεκαετίας του 1990 το ¼ από τη συνολική παραγωγή κρασιού στη Γαλλία πραγματοποιούνταν με εξωγενή ένζυμα. Παρόλα αυτά, αρκετοί οινοποιοί ακόμη και σήμερα λειτουργούν βάσει εμπειρίας και ακολουθούν την παράδοση, γι' αυτό είναι απαραίτητο να σημειωθεί πρόοδος και να εμβαθύνουμε τη γνώση μας, χρησιμοποιώντας τις ράγες των σταφυλών ως υπόστρωμα και στην ιδιομορφία των ενζύμων, με στόχο να καθορίσουμε καλύτερα τη χρήση τους κατά τη διάρκεια της οινοποίησης. Η σχέση μεταξύ της τεχνολογικής επίδρασης και της αρμόδιας ενζυμικής αντίδρασης, μερικές φορές δεν γίνεται κατανοητή στο σύνολο της (C. Grassin, P. Fauquembergue, 1996).

Τα ένζυμα χρησιμοποιούνται για μια καλύτερη αρχική εξαγωγή των διάφορων συστατικών του γλεύκους, επιταχύνεται η εκχύλιση των υδατοδιαλυτών πολυφαινόλων, βελτιώνεται η παραγωγή με αύξηση του επί της % Πρόρωγου, μειώνεται ο χρόνος εκχύλισης (Lazarani και λοιποί. 1989). Προστιθέμενα στη σταφυλόμαζα, στο γλεύκος ή το κρασί, τα ένζυμα υδρολύουν τις διαλυτές ουσίες υψηλού μοριακού βάρους όπως η πηκτίνη, μειώνουν το ιξώδες του γλεύκους βελτιώνοντας έτσι το διαύγαση και τη διήθηση, με στόχο την εξασφάλιση πιο σταθερών οίνων υψηλής ποιότητας (Tony Godfrey & Stuart West, 1996).

Τα κύρια ένζυμα τα οποία χρησιμοποιούνται κατά τη διάρκεια της οινοποίησης είναι οι πηκτινάσες. Οι πηκτινάσες εμφανίζονται φυσικά σε όλα τα φρούτα, συμπεριλαμβανομένων και των σταφυλιών, είναι εν μέρει αρμόδιες για τη διαδικασία της ωρίμανσης στα φρούτα. Εντούτοις οι πηκτινάσες των σταφυλιών είναι ανενεργές υπό τις συνθήκες pH και SO^2 οι οποίες επικρατούν κατά την οινοποίηση. Οι πηκτινάσες οι οποίες προέρχονται από μύκητες είναι ανθεκτικές υπό αυτές τις συνθήκες οινοποίησης. Οι σχετικές πληροφορίες για την ενζυμική δραστηριότητα κατά τη βιομηχανική επεξεργασία δεν είναι εύκολα προσιτές. Ο διεθνής οργανισμός αμπέλου και οίνου (OIV) έχει καθορίσει ότι μόνο *Aspergillus niger* και *Trichoderma* μπορούν να χρησιμοποιηθούν για παραγωγή ενζύμων τα οποία προορίζονται για την οινολογία (Inmaculada Romero – Cascales και λοιποί, 2008). Οι παραγωγοί οι οποίοι εξάγουν οίνους στην Ευρωπαϊκή Ένωση, εάν χρησιμοποιούν κατά τη διάρκεια οινοποίησης ένζυμα, είναι υποχρεωμένοι να χρησιμοποιούν ένζυμα τα οποία συμμορφώνονται με αυτές τις προϋποθέσεις.

4.2. Πηκτινάσες

Τα πηκτινολυτικά ένζυμα προκαλούν αλλαγές στις πηκτίνες κατά την ωρίμανση των σταφυλών, ενώ συνεισφέρουν στην αυθόρμητη κατακρήμνιση των αιωρημάτων στα γλεύκη και τους οίνους.

Οι πηκτινάσες είναι τα ένζυμα με τα σημαντικότερα τεχνολογικά αποτελέσματα. Τα πηκτινολυτικά ένζυμα τα οποία βρίσκονται στο γλεύκος ή το κρασί έχουν διαφορετική προέλευση : τη σταφυλή, τις ζύμες και άλλους μικροοργανισμούς όπως τον *Botrytis cinerea*. Η πηκτίνη, όπως αναφέραμε ανωτέρω, αυξάνει το ιξώδες του γλεύκους. Η περιεκτικότητα του γλεύκους σε πηκτίνη εξαρτάται από τη ποικιλία των σταφυλιών, την ωρίμανση και τις μηχανικές διεργασίες μετά τον τρυγητό. Οι πηκτίνες δημιουργούν ένα κολλοειδές μέσα στο γλεύκος το οποίο καθιστά αδύνατη τη συσσωμάτωση και τη καθίζηση αυτών των μορίων. Οι εξωγενείς πηκτινάσες ενισχύουν τις ενδογενείς μεθυλεστεράσες και πολυγαλακτουρονάσες της σταφυλής, αυξάνοντας έτσι τον οίνο εκροής αλλά και το τελικό προϊόν, μειώνοντας το χρόνο συμπίεσης των στεμφύλων στο πιεστήριο, μειώνοντας το ιξώδες και βελτιώνοντας τη διαύγαση του γλεύκους και του οίνου καθώς και τη διήθηση αργότερα (V. P. Dzogbefia και λοιποί. 2001).

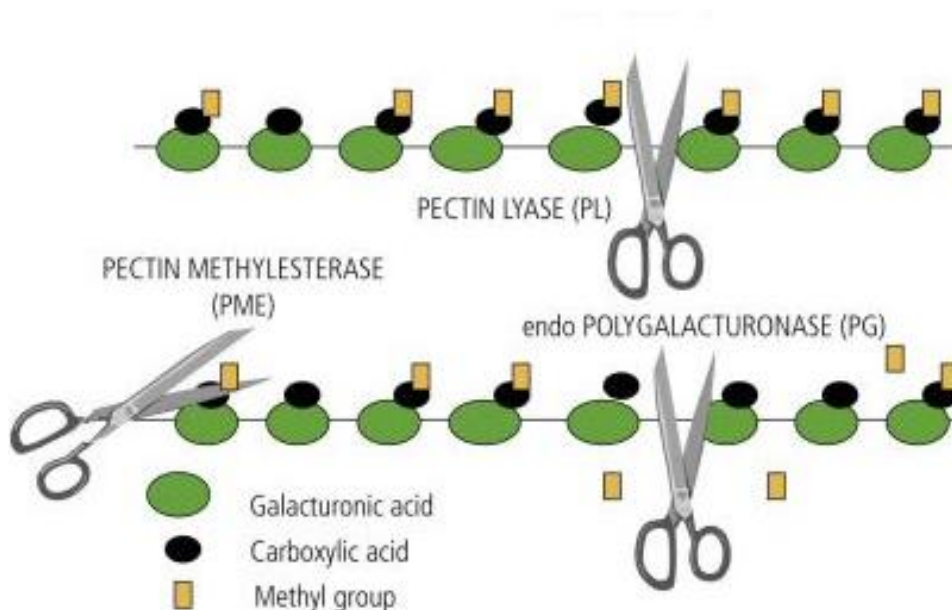
Οι πηκτίνες είναι αρμόδιες για την αύξηση του ιξώδες του γλεύκους. Το μοριακό βάρος τους είναι περίπου 100.000. Ο βαθμός μεθυλίωσης είναι 60-70 τοις εκατό. Η πηκτίνη των σταφυλιών υδρολύεται από τις ενδογενείς πηκτινάσες κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης (Marteau, 1967) εντούτοις, οι ενδογενείς δραστηριότητες είναι πάρα πολύ χαμηλές για να έχουν μια τεχνολογική επίδραση και πρέπει να ενισχυθούν από τις εξωγενείς πηκτινάσες (Grassin, 1987). Η μηχανική επεξεργασία και η πίεση στο πιεστήριο απελευθερώνουν σημαντικές ποσότητες πηκτίνης μέσα στο γλεύκος και προκαλούν το σχηματισμό θολώματος. Το περιεχόμενό του είναι περίπου 3 g l^{-1} σε ένα λευκό γλεύκος, και 15 g l^{-1} σε ένα κόκκινο γλεύκος μετά από θερμοοινοποίηση. Η διαύγαση του γλεύκους καθίσταται σχεδόν αδύνατη, το ιξώδες του γλεύκους αυξάνεται, ενώ κατά το φιλτράρισμα φράσουν τα φίλτρα της αντλίας (C. Grassin, P. Fauquembergue, 1996).

4.2.1. Ενζυμική αποικοδόμηση των πηκτινών

Τα πηκτινολυτικά ένζυμα στις σταφυλές συνεισφέρουν σημαντικά στις μετατροπές οι οποίες λαμβάνουν χώρα στις πηκτικές ύλες κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των ραγών. Ανάλογα με τον τρόπο δράσης τους και το είδος του δεσμού στον οποίο επιδρούν διακρίνονται σε :

- Ένζυμα τα οποία ονομάζονται **πηκτινεστεράσες** και τα οποία υδρολύουν τους εστερικούς δεσμούς αφαιρώντας μια μεθανόλη δίνοντας πηκτίνες με μικρότερο βαθμό εστεροποίησης. Η δράση τους εξειδικεύεται στο γαλακτουρονικό οξύ, αλλά όχι στο σύνολο των εστερικών δεσμών των πηκτινών. Οι πηκτινεστεράσες απαιτούν την ύπαρξη μίας τουλάχιστον καρβοξυλομάδας η οποία να βρίσκεται δίπλα στη μεθυλομάδα η οποία δέχεται επίθεση (Διαμαντίδης, 2007).

- Ένζυμα τα οποία υδρολύουν (**πολυγαλακτουρονάσες**) ή διασπούν (**πηκτικές και πηκτινικές λυάσες**) τους γλυκοζιτικούς δεσμούς της αλυσίδας ελατώνοντας έτσι το βαθμό πολυμερισμού. Οι πολυγαλακτουρονάσες υδρολύουν τους α(1, 4) γλυκοζιτικούς δεσμούς μεταξύ των μη εστεροποιημένων ομάδων του γαλακτουρονικού οξέος. Οι ένδο-πολυγαλακτουρονάσες υδρολύουν πηκτίνες χαμηλού βαθμού εστεροποίησης με τυχαίο τρόπο επιτρέποντας μια γρήγορη μείωση του ιξώδους. Οι λυάσες του πηκτικού οξέος και οι λυάσες της πηκτίνης καταλύουν αντιδράσεις απομάκρυνσης μιας χημικής ομάδας μεταξύ των εστεροποιημένων και μη εστεροποιημένων μονάδων γαλακτουρονικού οξέος. Ο τρόπος δράσης αυτών των ενζύμων φαίνεται στο σχήμα 4.1. (Διαμαντίδης, 2007).



Σχ. 4.1 : Τρόπος δράσης των πηκτινολυτικών ενζύμων,

4.2.2. Ιδιότητες και ο ρόλος των πηκτινασών στις σταφυλές

Το βέλτιστο pH των πηκτινασών οι οποίες προέρχονται από τις σταφυλές κυμαίνεται μεταξύ 2 και 8. Επομένως, η δράση των περισσότερων πηκτινασών δεν

παρεμποδίζεται από τις τιμές του pH οι οποίες επικρατούν στο γλεύκος και στον οίνο (pH 3 – 4). Επίσης, αυτά τα ένζυμα είναι ενεργά σε ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασιών παρουσιάζοντας βέβαια διαφορετικό ρυθμό δράσης. Σε χαμηλή θερμοκρασία οινοποίησης, η πηκτινολυτική δράση των ενζύμων πέφτει σε αμελητέα επίπεδα. Άλλοι παράγοντες οι οποίοι μειώνουν την αποτελεσματικότητα των ενδογενών πηκτινινασών είναι η περιεκτικότητα σε θειώδη ανυδρίτη, οι ταννίνες, η αλκοόλη και η κατεργασία με μπετονίτη.

Έρευνες για τις πηκτινάσες στις σταφυλές έχουν ξεκινήσει από το 1950 με σκοπό την εξήγηση του τρόπου με τον οποίο αποδεσμεύεται η μεθανόλη και μειώνεται το ιξώδες κατά τη διάρκεια της διαύγασης του γλεύκους. Μετρήσεις οι οποίες έγιναν στην ενεργότητα της πολυγαλακτουρονάσης και της πηκτινεστεράσης των σταφυλών έδωσαν μια εξήγηση για αυτή την αυθόρμητη διαδικασία. Όπως αποδείχτηκε, η ενεργότητα της πηκτινεστεράσης είναι μεγαλύτερη από αυτή της πολυγαλακτουρονάσης και κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης αυξάνεται και στα δύο ένζυμα. Αυτή η συνεργιστική δράση μεταξύ των δύο ενζύμων μπορεί να επηρεάσει τη ταχύτητα διαύγασης (Grassin, 1987).

4.3. Γλυκοζιδάσες

Οι γλυκοζιδάσες είναι κυτταρινολυτικά ένζυμα τα οποία υδρολύουν τους γλυκοζιτικούς δεσμούς της κυτταρίνης με τη γλυκόζη. Οι αλυσίδες της κυτταρίνης οι οποίες είναι γραμμικές περιέχουν 8000 – 12000 μόρια γλυκόζης και συνδέονται με δεσμούς υδρογόνου. Τα ένζυμα τα οποία παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον είναι εκείνα τα οποία υδρολύουν τις πρόδρομες αρωματικές ενώσεις της σταφυλής και συγκεκριμένα τους τερπενογλυκοζίτες οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για τον αρωματικό χαρακτήρα πολλών σταφυλιών.

4.3.1. Οι β-γλυκοζιδάσες στις σταφυλές

Η β-γλυκοζιδάση, όπως αναφέραμε και ανωτέρω, υδρολύει την κελλοβιόζη καθώς επίσης και κυτταρινο-ολισακχαρίτες, μέχρι 4 μόρια γλυκόζης. Αρκετές β-γλυκοζιδάσες έχουν μεγάλο μοριακό βάρος και περιέχουν ελάχιστους υδατάνθρακες. Τα ένζυμα αυτά είναι περισσότερο ενεργά σε γλεύκη τα οποία προέρχονται από ώριμες ράγες. Η ενεργότητα της β-γλυκοζιδάσης παρουσιάζει βέλτιστο σε pH 5 και αναστέλλεται από τη γλυκόζη. Επίσης, τα ένζυμα αυτά δεν είναι ιδιαίτερα σταθερά στο χαμηλό pH του οίνου και στα υψηλά επίπεδα αλκοόλης. Τα ενδογενή ένζυμα των β-γλυκοζιδασών αδυνατούν να υδρολύσουν σάκχαρα τα οποία είναι ενωμένα με αλκοόλες όπως η λιναλόλη. Ενώ, οι διάφοροι χειρισμοί όπως η απολάσπωση και η φυγοκέντρωση, μειώνουν την ενεργότητα των β-γλυκοζιδασών.

4.4. Μηχανισμός Δράσης των ενζύμων στο γλεύκος

4.4.1 Λευκή οινοποίηση

Η περιεκτικότητα της πηκτίνης στο λευκό γλεύκος μερικές φορές είναι τόσο υψηλή, η οποία δημιουργεί προβλήματα κατά το στάδιο της εξαγωγής στο πιεστήριο. Ο χρόνος εξαγωγής του χυμού διαρκεί περισσότερο, απαιτούνται υψηλές πιέσεις για τη συμπίεση και η απόδοση είναι χαμηλή. Μελέτη η οποία έχει πραγματοποιηθεί από το INRA Montpellier, με αντικείμενο την ενζυματική ικανότητα υποβιβασμού της επιδερμίδας των ραγών, έχει δείξει ότι στα τοιχώματα των κυττάρων της επιδερμίδας βρίσκονται πολλές ενδιαφέρουσες ενώσεις, όπως οι πολυφαινόλες, αρωματικές ενώσεις και οι πρόδρομες ενώσεις τους. Η επιδερμίδα είναι μια οργανωμένη δομή η οποία διατηρεί τον πολτό μέσα στη ράγα. Οι πολυσακχαρίτες οι οποίοι βρίσκονται στα τοιχώματα των κυττάρων της επιδερμίδας μπορεί να υδρολυθούν μέχρι και 80 τις εκατό από τα διαθέσιμα εξωγενή ένζυμα (C. Grassin, P. Fauquembergue, 1996).

Μετά τη σύνθλιψη των στεμφύλων, τα αρνητικά φορτισμένα μόρια της πηκτίνης δημιουργούν ένα προστατευτικό στρώμα γύρω από τα θετικά φορτισμένα στερεά μόρια του γλεύκος. Αυτό κρατά τα στερεά μόρια σε αναστολή και αιώρηση. Τα ένζυμα των πηκτινασών σπάζουν τα μόρια της πηκτίνης σε μικρότερα μέρη, με αυτόν τον τρόπο τα θετικά φορτισμένα μόρια εκτίθενται και ενώνονται με αρνητικά φορτισμένα μόρια των πηκτινών, δημιουργώντας έτσι μεγαλύτερης μορφής μόρια (Σχήμα 4.2). Όταν τα μόρια γίνουν πολύ μεγάλα, καθιζάνουν.



Σχήμα 4.2 : Μηχανισμός δράσης των πηκτινολυτικών ενζύμων πριν τη καθίζηση.

Οι πηκτινάσες προστίθενται σε αναλογία περίπου 2 g ανά 100 kg σταφυλόμαζας. Επιταχύνουν την καθίζηση του ιζήματος από 18 – 20 h σε περίπου 6 h. Το ποσοστό του ιζήματος μειώνεται, βελτιώνεται η διαύγεια του γλεύκους λόγω της ουδετεροποίησης των ηλεκτροστατικών φορτίων, μειώνοντας τον κίνδυνο από μόλυνση και οξείδωση. Επίσης η δόση του θειώδη ανυδρίτη μπορεί να μειωθεί. Οι πηκτινάσες διευκολύνουν την εξαγωγή και την απελευθέρωση των ενώσεων του γλεύκους, όπως τα ζυμώσιμα σάκχαρα, τις ανθοκυάνες, τις ταννίνες, τις πρωτεΐνες, τους πολυσακχαρίτες και τα οργανικά οξέα τα οποία βελτιώνουν τη ποιότητα του οίνου και διαδραματίζουν έναν σημαντικό ρόλο στη τελική οργανοληπτική ισορροπία του οίνου. Επειδή τα εξωγενή ένζυμα επιταχύνουν τους φυσικούς μηχανισμούς, ο οινοποιός μπορεί να εργαστεί πιο γρήγορα και να κερδίσει χρόνο με μια ευκολότερη και πιο γρήγορη συμπύεση των στεμφύλων (Κοτσερίδης, 2005/β, C. Grassin, P. Fauquembergue, 1996).

Όπως αναφέραμε ανωτέρω, το γλεύκος διαυγάζεται καλύτερα και πιο γρήγορα. Το ιζώδες και η θολερότητα του γλεύκους μειώνονται αισθητά. Η θολερότητα του γλεύκους πρέπει να φθάσει τις 100 – 150 νεφελομετρικές μονάδες (NTU) για να μπορέσουμε να έχουμε μια καλή χωρίς διακοπές αλκοολική ζύμωση (Dubourdieu και λοιποί, 1986). Ο πιο σύντομος χρόνος επεξεργασίας (περίπου 6h με πηκτινάσες αντί 18-20h χωρίς ένζυμα) και η καλύτερη διαύγηση, μειώνουν την οξείδωση του γλεύκους, δεδομένου ότι η επαφή του γλεύκους με τη τυροσινάση η οποία βρίσκεται δεσμευμένη στα μόρια είναι περιορισμένη. Η προσθήκη πηκτινασών καθώς επίσης και γλυκοζιδασών βοηθούν στην απελευθέρωση αρωμάτων από τις πρόδρομες ενώσεις, επιτρέπουν μια αλκοολική ζύμωση λιγότερο παραχώδη, η οποία συχνά είναι πιο σύντομη και αρχίζει νωρίτερα. Δεδομένου ότι ο αφρός αποσυντίθεται πιο γρήγορα επειδή το ιζώδες έχει μειωθεί, οι δεξαμενές ζύμωσης μπορούν να γεμιστούν με μεγαλύτερη ποσότητα γλεύκους, (30-40 τοις εκατό περισσότερο), εν συγκρίσει με επεξεργασία χωρίς ένζυμα (C. Grassin, P. Fauquembergue, 1996).

4.4.2. Ερυθρή οινοποίηση

Στην ερυθρή οινοποίηση, η χρήση των πηκτινασών επιτρέπει μια μείωση του χρόνου εκχύλισης από 30-50 τοις εκατό και την παραγωγή οίνων ποιότητας με πιο έντονο χρώμα. Χρησιμοποιούνται κυρίως στη περίπτωση των θερμικά επεξεργασμένων γλευκών (θερμοοινοποίηση) και στους οίνους πίεσης όπου η περιεκτικότητα σε πηκτίνες είναι αυξημένη. Ο οίνος εκροής αυξάνεται καθώς επίσης και η παραγωγή κατά 10-15 τοις εκατό. Η αλκοολική ζύμωση εμφανίζεται νωρίτερα και πιο έντονα με λιγότερο σχηματισμό του αφρού. Υπάρχει μια μείωση των πτητικών οξέων ενώ η περιεκτικότητα σε αλκοόλη μπορεί να είναι υψηλότερη. Επίσης η μηλογαλακτική ζύμωση ξεκινά κανονικά. Το λαμπικάρισμα

καθώς και το φιλτράρισμα γίνονται καλύτερα, ακόμη και σε οίνους τα οποία συνήθως ήταν δύσκολο να διαυγάσουν (C. Grassin, P. Fauquembergue, 1996).

4.5. Απελευθέρωση του χρώματος

Στην περίπτωση των νέων ερυθρών οίνων, ο οινοποιός προσπαθεί να αυξήσει την εξαγωγή του κόκκινου χρώματος και να μειώσει τον χρόνο εκχύλισης. Η προσθήκη ενζύμων στην φάση της εκχύλισης, έχει ως στόχο την αποδιοργάνωση των κυτταρικών τοιχωμάτων και τη γρηγορότερη διάλυση των φαινολικών συστατικών από την υδάτινη κιάλας φάση. Η υδρόλυση των κυττάρων της επιδερμίδας των ραγών από τις πηκτινάσες έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση ανθοκυανών από τα χυμοτόπια των κυττάρων.

Οι ανθοκυάνες αποτελούν ίσως τη σημαντικότερη κατηγορία των φαινολικών συστατικών της σταφυλής, καθώς είναι οι ερυθρές χρωστικές στις οποίες οφείλουν το πορφυρό, ερυθρό, κυανό ή ιώδες χρώμα τους. Απαντούν μόνο στο φλοιό των ραγών των *cv vinifera*, πλην των 'βαφικών ποικιλιών' στις οποίες βρίσκονται στη σάρκα των ραγών. Στις περισσότερες λευκές ποικιλίες, οι ανθοκυάνες απουσιάζουν τελείως (π.χ. Sauvignon blanc, Chardonnay), ενώ σε ορισμένες απαντούν σε ίχνη (π.χ. Pinot blanc, Ugni blanc, Μοσχοφίλερο) (Ribéreau-Gayon et al., 2000). Από τον ποσοτικό προσδιορισμό των ολικών ανθοκυανών στους φλοιούς των πιο διαδεδομένων ελληνικών ερυθρών ποικιλιών, προέκυψε ότι αυτές κυμαίνονται από 100 mg μέχρι 1.500 mg/Kg ραγών (Κουράκου-Δραγώνα, 1998). Συγκεκριμένα, η σύνθεση και αποθήκευση των ανθοκυανών γίνεται κυρίως στα χυμοτόπια των κυττάρων της πρώτης υποδερμικής στιβάδας των φλοιών της ράγας των ερυθρών σταφυλών. Οι επόμενες δύο υποδερμικές στιβάδες μπορεί να περιέχουν μικρά ποσά ανθοκυανών τα οποία τείνουν στο ελάχιστο έως την έκτη υποδερμική στιβάδα όπου σπάνια εμφανίζεται χρωματισμός. Οι ανθοκυάνες αρχίζουν να εμφανίζονται στο στάδιο του περκασμού. Τη στιγμή αυτή, οι πράσινοι καρποί χάνουν τη χλωροφύλλη και αρχίζουν να χρωματίζονται. Καθώς οι σταφυλές ωριμάζουν καταλαμβάνουν αυξανόμενο χώρο στο κυτόπλασμα. Η συγκέντρωση των ανθοκυανών παρουσιάζει μια θετική μεταβολή από το εξωτερικό προς το εσωτερικό μέρος της ράγας, καθώς τα γειτονικά κύτταρα της σάρκας είναι περισσότερο χρωματισμένα από αυτά της επιδερμίδας (Amrani-Joutei and Glories, 1995).

Κατά τη διάρκεια της εκχύλισης στην ερυθρή οινοποίηση λόγω επίσης και του μεγάλου χρόνου εκχύλισης, απελευθερώνονται μεγάλα ποσά ταννινών, οι ταννίνες μπορούν να δεσμεύσουν τα ένζυμα και με αυτόν τον τρόπο να τα αδρανοποιήσουν. Γι' αυτό το λόγο στην ερυθρή οινοποίηση απαιτείται μεγαλύτερη ποσότητα ενζύμων έναντι των

λευκών. Η εκχύλιση στην ερυθρή οινοποίηση όπως αναφέραμε ανωτέρω αυξάνει την περιεκτικότητα σε ανθοκυάνες μέσα στο γλεύκος, εντούτοις η σημαντικότερη δράση των ενζύμων τα οποία χρησιμοποιούνται στην ερυθρή οινοποίηση, είναι η αύξηση της σταθεροποίησης του χρώματος. Αξίζει να σημειωθεί, ότι η ποσότητα των ανθοκυανών οι οποίες παραλαμβάνει το γλεύκος από τα στέμφυλα κατά την αλκοολική ζύμωση, καθώς και η ένταση του χρώματος του γλεύκους, αυξάνουν στην αρχή μέχρι ένα μέγιστο, στη συνέχεια ελαττώνονται⁵, ενώ συνεχίζεται η αύξηση των ολικών φαινολών (Σχήμα 4.3). Πολλές ποικιλίες σταφυλών έχουν υψηλά επίπεδα χρώματος και αρκετοί οινοποιοί αισθάνονται ότι είναι περιττό να προσθέσουν ένζυμα μέσα στο γλεύκος. Όμως τα ένζυμα αυξάνουν την εξαγωγή ταννίνης η οποία είναι ζωτικής σημασίας για τη σταθεροποίηση του χρώματος.

Η ταυτόχρονη εξαγωγή των ταννινών κατά τη διάρκεια της εκχύλισης επιτρέπουν τη σταθεροποίηση του χρώματος ενός οίνου κατά τη διάρκεια της παλαίωσης (Ribereau-Gayon, 1968). Οι ενώσεις αυτές είναι πολύ σημαντικές για τη δομή του οίνου, η οποία του δίνει δύναμη και σώμα. Η περιεκτικότητά τους εξαρτάται από την ωριμότητα των σταφυλών και τους κλιματολογικούς παράγοντες (Glories, 1984 a, b).

Σύμφωνα με μελέτη η οποία έγινε, προστέθηκαν πηκτινολυτικά ένζυμα σε γλεύκος πριν τη ζύμωση και μελετήθηκαν τα αποτελέσματα όσον αφορά τα χρωματικά χαρακτηριστικά του οίνου ο οποίος πρόεκυψε. Κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα ένζυμα βόηθησαν στην εξαγωγή των χρωστικών κατά τη διάρκεια της εκχύλισης και δεν επηρέασαν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του παραγόμενου οίνου. Οι οίνοι μάρτυρες εμφάνιζαν διαφορές σχετικά με την ένταση του χρώματος, με τους οίνους στους οποίους είχαν προστεθεί ένζυμα να έχουν πιο σκούρο χρώμα. Ύστερα από 15 μήνες παλαίωσης, παρατηρήθηκε μια μείωση του χρώματος σε όλους τους οίνους, αλλά οι οίνοι στους οποίους είχαν προστεθεί ένζυμα εξωγενώς, εμφάνιζαν πιο έντονο χρώμα, αρώματα και γευστικά χαρακτηριστικά από τους οίνους μάρτυρες (Bakker και λοιποί, 1999).

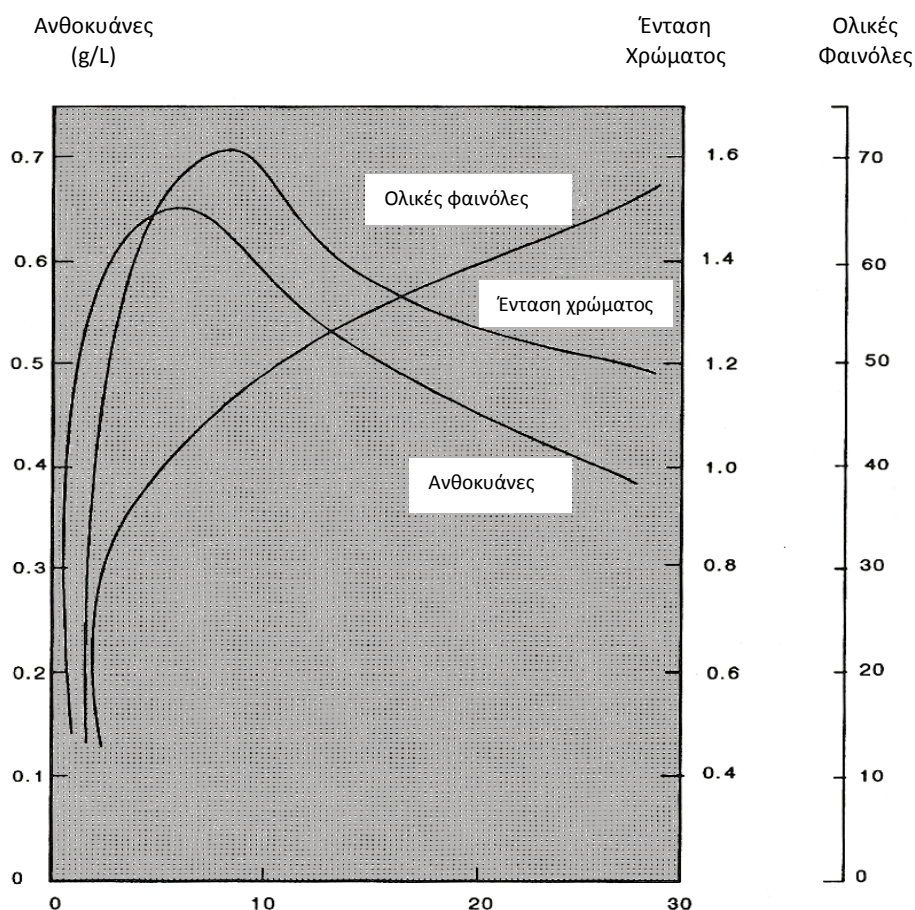
Σε αντιδιαστολή με τη παραπάνω έρευνα, άλλη μελέτη έχει δείξει ότι κάποια σκευάσματα πηκτινολυτικών ενζύμων είναι ικανά να προκαλέσουν μείωση του χρώματος των ερυθρών οίνων μέσω της μετατροπής και αποικοδόμησης των χρωστικών (Wightman και λοιποί, 1997). Επίσης, σε πιο προηγούμενη ερευνητική εργασία, η οποία πραγματοποιήθηκε από τον Leske (1996), συμπέρανε ότι η χρήση πηκτινολυτικών ενζύμων

⁵ Όσον αφορά την παρατηρούμενη ελάττωση των ανθοκυανών της οποίας υπερσχύει της αύξησης από κάποιο στάδιο της αλκοολικής ζύμωσης και μετά, αυτή οφείλεται στην ένωση των ανθοκυανών με πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες, καθώς και σε απορρόφηση τους από τα στέμφυλα και τις ζύμες. (Ελ. Οιν. Χρονικά, 1982)

κατά την διάρκεια της εκχύλισης και την αλκοολική ζύμωση ερυθρών ποικιλιών σταφυλής δεν είναι απαραίτητη, καθώς δεν επιφέρει καμία βελτίωση στα χρωματικά χαρακτηριστικά των παραγόμενων οίνων.

4.6. Αύξηση των αρωμάτων με τη χρήση ενζύμων

Τα αρώματα τα οποία προέρχονται από το σταφύλι και τις ζύμες κατά τη διάρκεια της παλαίωσης είναι ουσιαστικά για τη τελική ισορροπία του οίνου. Βέβαια, ο τελικός τύπος κρασιού οφείλεται κυρίως στα αρώματα τα οποία προέρχονται από τα σταφύλια. Γι' αυτό ο οινοποιός προσπαθεί να ενισχύσει το επίπεδο αυτών των αρωμάτων και να βελτιώσει το φρουτώδες και φρέσκο χαρακτήρα του οίνου. Πολλοί ερευνητές έχουν δείξει ότι οι τερπενόλες αντιπροσωπεύουν ένα σημαντικό μέρος των αρωμάτων των σταφυλών. Αυτές οι ενώσεις είναι παρούσες στην επιδερμίδα των ραγών και είναι ενωμένες με σάκχαρα.



Σχ. 4.3: Μεταβολή της έντασης του χρώματος και της περιεκτικότητας σε ανθοκυάνες και ολικές φαινόλες κατά την οινοποίηση με στέμφυλα προς παραγωγή ερυθρών οίνων (Πηγή: Ελ. Οιν. Χρονικά, 1982).

Αυτά τα μόρια σακχάρων-τερπενολών είναι άοσμες πρόδρομες ενώσεις και μη πτητικές. Όταν αφαιρεθούν αυτά τα σάκχαρα, η γεύση γίνεται πτητική και αρωματική, συμβάλλοντας

στο άρωμα του οίνου. Αυτό επιτυγχάνεται με τη διαδοχική ενζυμική υδρόλυση αυτών των πρόδρομων ενώσεων όπου απελευθερώνονται τα ελεύθερα τερπένια τα οποία έχουν δυνατές αρωματικές οσμές (Gunata και λοιποί, 1985).

Μερικές πρόδρομες πτητικές αρωματικές ενώσεις είναι τα οξείδια του λιναλολικού οξέος, οι τερπενοδιόλες και τριόλες, οι βενζολικές αλκοόλες και οι πτητικές φαινόλες (Schwab και Schreier, 1990). Οι περισσότερες κόκκινες και λευκές ποικιλίες σταφυλιών περιέχουν τέτοιες ενώσεις αλλά οι αρωματικές είναι πλουσιότερες. Τα άρώματα τα οποία απελευθερώνονται από τη δράση των γλυκοζιδιασών, κυρίως το σημαντικότερο μέρος προέρχεται από πρόδρομες ενώσεις. Τα επίπεδα των πρόδρομων αρωμάτων μπορούν να κυμανθούν από 6,5 – 28 mg/l γλεύκους (Baynonne και λοιποί, 1992). Η αναλογία μεταξύ των διαφορετικών τύπων πρόδρομων ενώσεων ποικίλει αρκετά, και είναι ανάλογη με τη ποικιλία των σταφυλιών. Επίσης, αυτές οι ισχυρές αρωματικές ενώσεις στη γλυκοσιδική τους μορφή είναι πολύ σταθερές κατά την αλκοολική ζύμωση και παραμένουν διαλυτές και σταθερές ακόμη και στα κρασιά. Η προσθήκη εξωγενών ενζύμων μπορεί να απελευθερώσει το σημαντικότερο ποσοστό των τερπενολών και να ενισχύσει έναν οίνο με αυτές τις αρωματικές ενώσεις. Η απελευθέρωση αυτών των αρωμάτων όπως αναφέραμε ανωτέρω είναι διαδοχική. Στις ποικιλίες *Vitis Vinifera* υπάρχουν κυρίως δι-γλυκοζίτες, το οποίο σημαίνει ότι τα τερπένια είναι συνδεδεμένα στη γλυκόζη και σε υπολείμματα υδατανθράκων όπως αραμπινόζη, ραμνόζη και απιόζη. Στα σταφύλια υπάρχει ικανή ποσότητα γλυκοζιδιασών για την απελευθέρωση των αρωματικών τερπενίων από τις μη αρωματικές πρόδρομες ενώσεις. Ωστόσο υπό τις συνθήκες οινοποίησης αυτά τα ένζυμα δεν είναι πολύ αποδοτικά, κυρίως επειδή το βέλτιστο pH τους είναι πάνω από 5, ενώ στο κρασί το pH είναι μεταξύ 3 – 4. Αρχικά, μια Άλφα-L-ραμνοσιδάση και μια Άλφα-L-αραμπινοσιδάση ή μια Βήτα-D-απιοσιδάση απελευθερώνουν το τελευταίο σάκχαρο της αλυσίδας της γλυκόζης. Εν συνεχεία η β-D-γλυκοζιδάση απελευθερώνει την αρωματική τερπενόλη από το σάκχαρο (Σχήμα 4.4) Σε μελέτη η οποία έγινε, έδειξε ότι κρασιά τα οποία παρασκευάστηκαν με προσθήκη εξωγενών ενζύμων, στα οποία οι γλυκοζιδάσες ήταν στη σωστή αναλογία, περιείχαν περισσότερες τερπενόλες, τερπενοδιόλες και νορισοπρενοειδή C13 εν' συγκρίσει των κρασιών τα οποία παρασκευάστηκαν χωρίς τη προσθήκη ενζύμων, εντούτοις, το επίπεδο υδρόλυσης εξαρτάται από την ποικιλία των σταφυλιών (Πίνακας 4.1). Είναι επίσης αξιοπρόσεκτο ότι η πλειοψηφία των αρωμάτων τα οποία έχουν απελευθερωθεί από τη δράση των ενζύμων στους οίνους είναι σταθερά ύστερα από ένα έτος. Η προσθήκη των εξωγενών γλυκοζιδιασών ενισχύει κατά πολύ το άρωμα του κρασιού σε σχέση με την

αρωματική δυνατότητα της κάθε ποικιλίας σταφυλιών. Τα κρασιά αποκτούν πιο έντονο και φρουτώδη αρωματικό χαρακτήρα (C. Grassin, P. Fauquembergue, 1996).

Πίνακας 4.1 Απελευθέρωση αρωμάτων σε διάφορες ποικιλίες με προσθήκη ενζύμου (5g hl⁻¹) και εξέλιξη κατά τη διάρκεια της παλαίωσης.

Ποικιλίες			Muscat Frontignan	Muscat Ottonel	Riesling	Gewurtz Traminer	Syrah	Sauvignon
Αρωματικές ενώσεις								
Τερπένια								
	Μάρτυρας	1 μήνα	1784	3583	273	295	24	14
		2 μήνες	2229	3344	446	853	140	71
	ένζυμα	1 μήνα	4210	4961	561	1631	365	59
		2 μήνες	3972	5139	889	1911	347	132
Τερπενοδιόλη								
	Μάρτυρας	1 μήνα	2821	5525	2232	172	121	39
		12 μήνες	2157	3851	674	494	144	51
	ένζυμα	1 μήνα	3916	6355	2693	432	803	139
		12 μήνες	3298	3769	2446	473	370	166
Norisoprenoids C13								
	Μάρτυρας	1 μήνα	0	0	0	0	0	0
		12 μήνες	155	36	155	90	180	0
	ένζυμα	1 μήνα	542	172	542	248	827	141
		12 μήνες	545	176	545	240	324	103

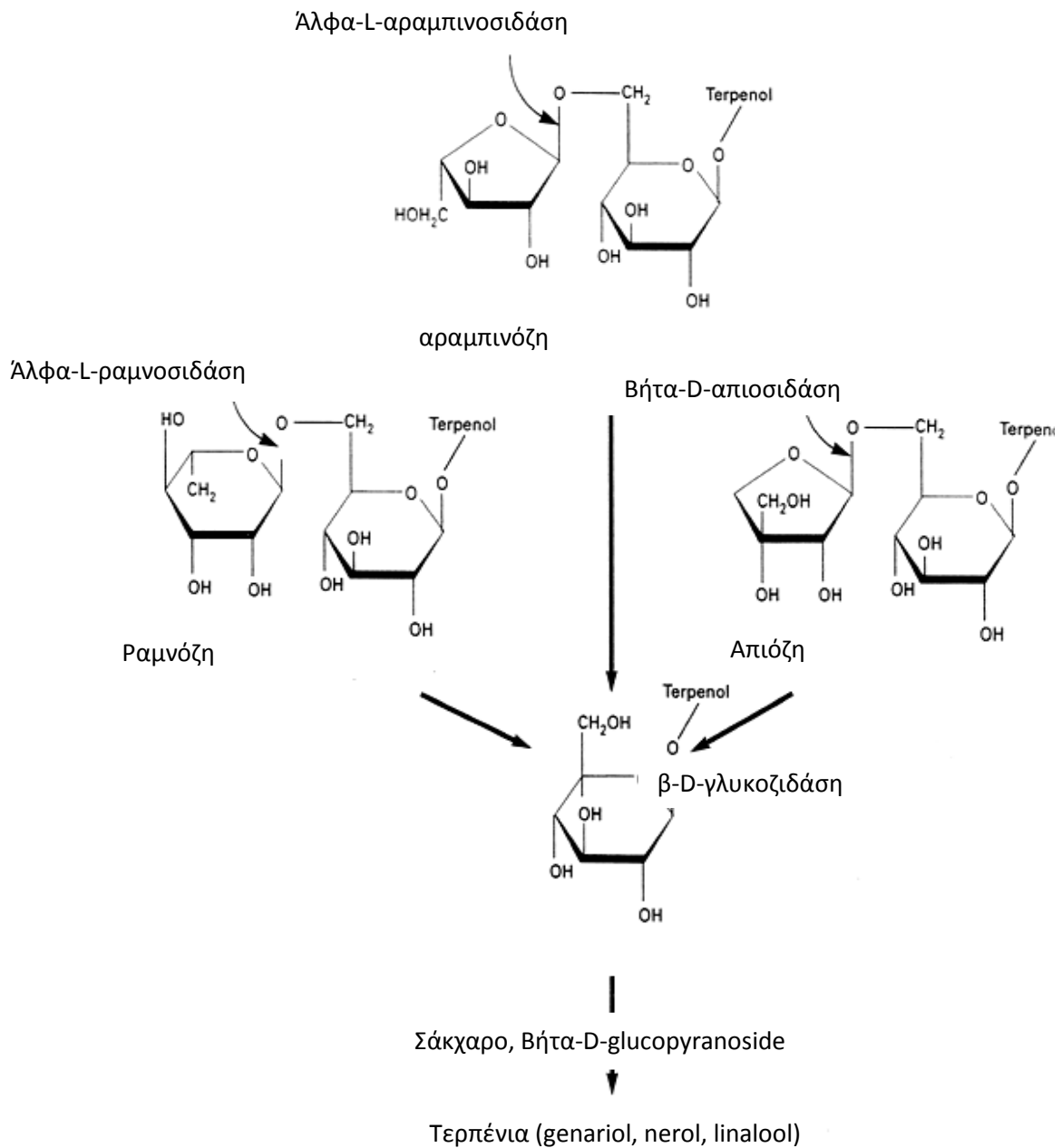
Οι τιμές είναι σε μg^{-1} .

Πηγή : (C. Grassin, P. Fauquembergue, 1996).

Το ανωτέρω θέμα βέβαια χρήζει περισσότερης μελέτης καθώς υπάρχουν αρκετοί παράγοντες οι οποίοι θα πρέπει να ληφθούν υπόψη. Σε οίνους στους οποίους δεν προστίθενται εξωγενώς ένζυμα, τα ενωμένα μονοτερπένια είναι σχετικά σταθερά, υδρολύονται με αργό ρυθμό και επομένως απελευθερώνουν αρώματα για μεγάλο χρονικό διάστημα κατά τη παλαίωση. Αντιθέτως, σε οίνους οι οποίοι ωριμάζουν ύστερα από προσθήκη ενζύμων, τα αρώματα απελευθερώνονται με πιο γρήγορους ρυθμούς, με αποτέλεσμα να μην διατηρείται ένα σταθερό επίπεδο αρώματος στους οίνους.

Επιπλέον, τα τερπένια όπως η λιναλοόλη, γερανιόλη και νερόλη, ουσίες με ευχάριστα αρώματα ανθέων στους οίνους, μπορούν να αλληλο-μετατραπούν σε πιο σταθερά χημικά, αλλά ανεπιθύμητα, συστατικά όπως η α -τερπινεδόλη. Η μετατροπή αυτή

γίνεται επειδή τα μονοτερπένια είναι σχετικά ασταθή και το χαμηλό pH του οίνου προάγει την υδρόλυση και την οξείδωση τους.



Σχήμα 4.4 : Υδρόλυση υδατανθράκων από γλυκοσιδάσες και απελευθέρωση τερπενίων. (Πηγή : C. Grassin, P. Fauquembergue, 1996).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

5. Σχεδιασμός Πειράματος

5.1. Σκοπός του πειράματος

Αν και έχουν γίνει αρκετές μελέτες σχετικά με την εξωγενή προσθήκη πυκτινολυτικών ενζύμων κατά την εκχύλιση σε ξένες ερυθρές ποικιλίες (C. Grassin και P. Fauquembegue 1996), για την διευκόλυνση της εξαγωγής των φαινολικών συστατικών καθώς και για να βοηθήσουν στη σταθεροποίηση του χρώματος στον προκύπτων οίνο, τα αποτελέσματα δεν είναι τόσο σαφή. Ωστόσο δεν έχει εξεταστεί, η πιθανότητα αύξησης των ανθοκυανών και άλλων συνυπάρχουσων φαινολών από την επίδραση αυτών των ενζύμων σε κάποια ελληνική ποικιλία, όπως το Αγιωργίτικο.

Αν και τα εμπορικά σκευάσματα τα οποία περιέχουν πυκτινολυτικά ένζυμα είναι ευρέως διαδεδομένα παγκοσμίως, οι οινοποιοί εξακολουθούν να λειτουργούν από την παράδοση και την γνώση την οποία διαθέτουν. Γι' αυτό είναι απαραίτητο να σημειώσουμε πρόοδο και να εμβαθύνουμε σε γνώση όσον αφορά τη χρήση της σταφυλόμαζας ως υπόστρωμα και την ιδιομορφία των ενζύμων, με στόχο τον καθορισμό της καλύτερης χρήσης των κατά τη διάρκεια της οινοποίησης.

Σκοπός αυτής της ερευνητικής εργασίας ήταν να χαρακτηριστούν οι δραστηριότητες πέντε παρασκευασμάτων πυκτινολυτικών ενζύμων, τα οποία κυκλοφορούν στην αγορά, ώστε να βελτιστοποιηθεί η χρήση τους, καθώς επίσης και η επίδραση τους στα χρωματικά χαρακτηριστικά μιας ποικιλίας, σε εργαστηριακό επίπεδο, η οποία παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την ελληνική οινοποιία, του Αγιωργίτικου, προκειμένου να γίνει καλύτερα κατανοητός ο μηχανισμός δράσης των ενζύμων και της σχέσης τους με τα χρωματικά χαρακτηριστικά.

5.2. Βασικά στοιχεία του πειράματος

Το πειραματικό μέρος της εργασίας αυτής πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Οινολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, κατά τη περίοδο του εαρινού εξαμήνου του σπουδαστικού έτους 2009.

Το πειραματικό υλικό το οποίο χρησιμοποιήθηκε ήταν ράγες σταφυλιών της ποικιλίας Αγιωργίτικο, οι οποίες είχαν προέλευση από κάποιους αμπελώνες της ευρύτερης περιοχής της Νεμέας και οι οποίες από τον τρύγο μέχρι και την πραγματοποίηση του πειράματος βρίσκονταν υπό κατάψυξη στους -18°C σε καταψύκτη του εργαστηρίου.

5.3. Υλικά και Μέθοδοι

Όλα τα αντιδραστήρια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν, υπάρχουν σε απόθεμα στο εργαστήριο. Τα πέντε παρασκευάσματα των πηκτινολυτικών ενζύμων αγοράστηκαν από διάφορες εταιρείες παρασκευής ενζύμων. Τα ονόματα των σκευασμάτων καθώς επίσης και διάφορα άλλα χαρακτηριστικά τους παρατίθενται κατωτέρω.

- **Lallzyme EX-V** : Ενζυμικό παρασκεύασμα το οποίο έχει θετική επίδραση στο χρώμα, στις ταννίνες και στις πρόδρομες αρωματικές ενώσεις του οίνου. Περιέχει πολυγαλακτουρονάσες, πηκτινολυάσες, πηκτινεστεράσες και ημικυτταρινάσες. Προτεινόμενη δόση 1 – 2 g/100 kg σταφυλιών.
- **Ultrazym** : Περιέχει επιλεγμένες πηκτινάσες για χρήση σε γλεύκη πίεσης. Προτεινόμενη δόση 1 – 2 g/100 kg σταφυλιών.
- **Vinozym Vintage FCE** : Περιέχει επιλεγμένες πηκτινάσες για την εξαγωγή του χρώματος και των φαινολικών συστατικών από τον φλοιό των ραγών κατά την ερυθρή οινοποίηση. Προτεινόμενη δόση 3 – 4 g/100 kg σταφυλιών.
- **Progress** : Πηκτινολυτικά ένζυμα με υψηλή ικανότητα εξαγωγής των πολυφαινολών. Ειδικότερα για χρήση κατά την εκχύλιση. Περιέχει πηκτινάσες, κυτταρινάσες και ημικυτταρινάσες. Προτεινόμενη δόση 2 – 4 g/100 kg σταφυλιών.
- **Uvazym** : Πηκτινολυτικά ένζυμα για ερυθρή οινοποίηση. Ειδικά για σταφύλια στα οποία η αναλογία ταννινών/ανθοκυανών δεν είναι σταθερή. Για την αύξηση των φαινολικών συστατικών στο κρασί καθώς επίσης και για τη παραγωγή ερυθρών οίνων με δυνατό φρουτώδη χαρακτήρα. Προτεινόμενη δόση 2 – 4 g/100 kg σταφυλιών. Η μεγαλύτερη δόση επιτρέπει πιο γρήγορη και εντονότερη εξαγωγή των φαινολικών συστατικών.

Αρχικά έγινε ποσοτικός προσδιορισμός των ενζύμων στα ενζυμικά παρασκευάσματα. Ακολουθήθηκαν διάφορες πειραματικές διαδικασίες, με διαφορετικές αναλογίες ραγών – ενζύμου, διαφορετική θερμοκρασία και διαφορετικό τρόπο παραλαβής του προκύπτοντος γλεύκου. Στις παραπάνω πειραματικές διαδικασίες έγινε επιλογή και χρήση των παρασκευασμάτων **Lallzyme Ex-V** και **Vinozym Vintage FCE** επειδή θεωρήθηκε ότι περιέχουν την ιδανικότερη ποσότητα ενζύμων για την επιτέλεση των πειραμάτων. Στο πίνακα 5.1 φαίνονται κάποια βασικά στοιχεία τα οποία θα μας βοηθήσουν να κατανοήσουμε καλύτερα τις συνθήκες διεξαγωγής των επί μέρους πειραμάτων. Στο προκύπτον γλεύκος μετρήθηκαν η ένταση και η απόχρωση, οι ολικές ανθοκυάνες και οι ολικές φαινόλες σύμφωνα με τις μεθόδους οι οποίες αναφέρονται παρακάτω.

Πίνακας 5.1 : Βασικά στοιχεία κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων.

	Βάρος ραγών σε g	Διάλυμα ενζύμου σε μl	Θερμ. διεξαγωγής σε °C	Χρόνος διεξαγωγής	Τρόπος παραλαβής γλεύκους	Τρόπος διεξαγωγής
ΑΓ 1 Lallzyme Ex-V	25	5*	25	40 (h)	Με υθμό 0,2 μm	Υπό ανάδευση
ΑΓ 2 Lallzyme Ex-V	40	5	25	21 (h)	Με υθμό 0,2 μm	Υπό ανάδευση
ΑΓ 3 Lallzyme Ex-V	30	6	25	44 (h)	Με υθμό 0,2 μm	Υπό ανάδευση
ΑΓ 4 Lallzyme Ex-V	30	6	60	30 (min)	Με υθμό 0,2 μm	Υπό ανάδευση
ΑΓ 5 Vinoxym Vintage FCE	30	9	60	30 (min)	Με υθμό 0,2 μm	Υπό ανάδευση
ΑΓ 6 Lallzyme Ex-V	30	9	60	30 (min)	Με φυγ/ση	Υπό ανάδευση
ΑΓ 7 Lallzyme Ex-V	30	9	50	30 (min)	Με υθμό υπο σταθερή πίεση	Υπό ανάδευση
ΑΓ 8 Lallzyme Ex-V	30	9	25	24 (h)	Με υθμό υπο σταθερή πίεση	Υπό ανάδευση

*5 μl διάλυμα ενζύμου = 2 g ενζύμου / 100 kg σταφυλιών, 6 μl διάλυμα ενζύμου = 2,4 g ενζύμου / 100 kg σταφυλιών, 9 μl διάλυμα ενζύμου = 3,6 g ενζύμου / 100 kg σταφυλιών.

5.4. Μέθοδοι Ανάλυσης

5.4.1. Αναλυτικές μέθοδοι για τη μέτρηση των ενζυματικών δραστηριοτήτων στα εμπορικά σκευάσματα

5.4.1.1. Πολυγαλακτουρονάσες - Κυτταρινάσες

Η ενζυμική δράση των πολυγαλακτουρονασών και των κυτταρινασών διαπιστώνεται από την απελευθέρωση αναγωγικών σακχάρων από υπόστρωμα πολυγαλακτουρονικού οξέως και μεθυλιωμένης κυτταρίνης αντίστοιχα. Η ενζυμική αντίδραση έγινε με συγκέντρωση υποστρώματος 0,5% (w/v) σε 50 mM ρυθμιστικού διαλύματος οξικού οξέος με pH 3,8 θερμοκρασία 37 °C και αναλογία ενζύμου –

υποστρώματος 1/5 (v/v). Η μέτρηση των αναγωγικών σακχάρων έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο του Nelson, (1944).

Ενα Unit (U) πολυγαλακτουρονάσης ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου που απελευθερώνει 1 μμολ γαλακτουρονικό οξύ ανά λεπτό υπό τις συνθήκες της αντίδρασης. Ενα Unit (U) κυτταρινάσης ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου που απελευθερώνει 1 μμολ γλυκόζης ανά λεπτό υπό τις συνθήκες της αντίδρασης.

5.4.1.2. Ενδοπολυγαλακτουρονάσες

Η δράση της ενδοπολυγαλακτουρονάσης προσδιορίστηκε με τη μέτρηση του ιξώδους του υποστρώματος. Τα μόρια της πηκτίνης υδρολύονται σε μόρια μικρότερου μοριακού βάρους προκαλώντας πτώση του ιξώδους της. Μία μονάδα (Unit) ενεργότητας ενδοπολυγαλακτουρονάσης, ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου η οποία προκαλεί πτώση του ιξώδους του υποστρώματος κατά 50 % σε 20 λεπτά και σε θερμοκρασία 30 °C. (Tuttobelo R and Mill PJ Biochem J, 1961).

5.4.1.3. Πηκτινεστεράσες

Οι πηκτινεστεράσες καθορίστηκαν με τιτλοδότηση των ελεύθερων καρβοξυλομάδων οι οποίες ελευθερώνονται (από τα ένζυμα) σε υψηλό βαθμό εστεροποίησης σε συγκέντρωση 0,5 % w/v σε απεσταγμένο νερό σύμφωνα με τον (Forster, 1988) . Η αναλογία ενζύμου – υποστρώματος ήταν 1/4 v/v και η αντίδραση έγινε στους 25 °C. Μία μονάδα (Unit) ενεργότητας πηκτινεστεράσης ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου που ελευθερώνει 1 μμολ καρβοξυλομάδων ανά λεπτό υπό τις συνθήκες της αντίδρασης.

5.4.1.4. Πηκτινολυάσες

Οι πηκτινολυάσες καθορίστηκαν μετρώντας την αύξηση της απορροφητικότητας στα 235 nm σε πηκτίνη κίτρου σύμφωνα με τη μέθοδο των (Membre & Burlot, 1994). Οι συνθήκες αντίδρασης είναι οι ίδιες όπως και στις υδρολάσες, εκτός της θερμοκρασίας η οποία είναι στους 25 °C. Μία μονάδα (Unit) ενζυμικής ενεργότητας της πηκτινολυάσης δημιουργεί 1 μμολ διπλών δεσμών ανά λεπτό υπό τις συνθήκες της αντίδρασης.

5.4.1.5. Β-γλυκοζιδάσες

Η β-γλυκοζιδάση μετρήθηκε φασματοφωτομετρικά στα 400 nm σε υπόστρωμα π-νιτρο-φαινυλογλυκοκυρανόζης σύμφωνα με τη μέθοδο η οποία περιγράφεται από τους Spragma et al (2002). Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν οι ίδιες όπως και για την ανάλυση των υδρολασών. Μία μονάδα (Unit) ενζυμικής ενεργότητας β-γλυκοζιδάσης είναι η ποσότητα του ενζύμου που απελευθερώνει 1 μμολ π-νιτρο-φαινόλης ανά λεπτό υπό τις συνθήκες της αντίδρασης.

5.4.2. Αναλυτικές Μέθοδοι Μέτρησης Παραμέτρων του Γλεύκους

5.4.2.1. Ένταση χρώματος – Απόχρωση

Για τον προσδιορισμό του χρώματος των ερυθρών οίνων έχει θεσπιστεί μια συμβατική μέθοδος η οποία περιλαμβάνει φασματοφωτομετρικές μετρήσεις. Έτσι, για τον προσδιορισμό της έντασης του χρώματος, καθώς και της απόχρωσης του γλεύκους, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Glories (1984), όπου γίνεται μέτρηση απορροφήσεων με φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού στα μήκη κύματος 420nm, 520nm, και 620nm. Η ένταση του χρώματος προκύπτει από το άθροισμα των τριών απορροφήσεων, ενώ η απόχρωση από το κλάσμα της απορρόφησης στα 420nm δια της απορρόφησης στα 520nm.

Το μήκος κύματος στα 520nm, εκφράζει το ερυθρό χρώμα των ιονισμένων ανθοκυανών, ενώ τα 420nm είναι χαρακτηριστικό μήκος κύματος του κίτρινου χρώματος, που οφείλεται στις συμπυκνωμένες ταννίνες. Η μέτρηση στα 620nm εκφράζει το κυανό χρώμα που αποδίδεται στις μορφές της βάσης της κινόνης των ελεύθερων και των ενωμένων ανθοκυανών (Glories, 1984). Τιμές έντασης από 0-6 χαρακτηρίζουν ανοιχτόχρωμους οίνους, από 6-10 μέτρια ερυθρούς οίνους και από 10 και πάνω βαθιά ερυθρούς (Ribéreau-Gayon et al., 2000).

Η Απόχρωση (A) εκφράζει το βαθμό οξειδωσης των οίνων. Όσο πιο οξειδωμένος είναι ο οίνος, τόσο μεγαλύτερη είναι η τιμή της απόχρωσης. Οι νέοι οίνοι παρουσιάζουν τιμές απόχρωσης μεταξύ 0,5 - 0,7 που αυξάνονται κατά την παλαίωση, φθάνοντας σε ένα ανώτερο όριο, περίπου 1,2-1,3.

Για τον προσδιορισμό της έντασης του χρώματος χρησιμοποιήθηκε και μια δεύτερη μέθοδος, η μέθοδος του Sudraud (1958). Ουσιαστικά, η δεύτερη μέθοδος είναι παρόμοια με την πρώτη, αλλά δεν λαμβάνει υπ' όψιν την απορρόφηση του οίνου στο μήκος κύματος 620nm.

5.4.2.2. Δείκτης Ολικών Φαινολών (Δ.Φ.Ο.)

Ο Δείκτης Ολικών Φαινολών αποτελεί μια γρήγορη και εύκολη ένδειξη των ολικών φαινολικών συστατικών που βρίσκονται στον οίνο. Γίνεται εφαρμογή της μεθόδου ΔΦΟ όπως περιγράφεται από τους Ribéreau-Gayon et al. (2000), με την οποία μετράται με φασματοφωτόμετρο η απορρόφηση του ερυθρού οίνου (αραιωμένο 1/100 με νερό) στο μήκος κύματος 280nm του υπεριώδους φωτός. Σε αυτό το μήκος κύματος οι βενζολικοί δακτύλιοι των φαινολικών ενώσεων παρουσιάζουν μέγιστο. Μοναδικό μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι ορισμένες ενώσεις, όπως τα κινναμωμικά οξέα και οι χαλκόνες, δεν παρουσιάζουν μέγιστο απορρόφησης στα 280nm, αλλά θεωρείται μηδαμινό, καθώς οι ουσίες αυτές παρουσιάζονται στους οίνους σε χαμηλές συγκεντρώσεις.

5.4.2.3. Ολικές Φαινόλες

Οι ολικές φαινόλες προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο των Iland et al. (2004), όπου μετράται η απορρόφηση στα 280nm, ύστερα από αναμονή τριών ωρών, ενός διαλύματος 10ml HCl 1M που περιέχει μια μικροποσότητα δείγματος οίνου (100μL). Από την τιμή της απορρόφησης αφαιρείται η τιμή 4 που αντιπροσωπεύει την απορρόφηση σε αυτό το μήκος κύματος, των μη φαινολικών ουσιών.

5.4.2.4. Ολικές ανθοκυάνες

Ο προσδιορισμός των ολικών ανθοκυανών των δειγμάτων των γλευκών, γίνεται με τη μέθοδο η οποία περιγράφεται από τους Ribéreau-Gayon and Stonestreet (1965). Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην ιδιότητα των ανθοκυανών να δίνουν με το ιόν HSO_3^- άχρωμες ενώσεις. Έτσι, μετά από προσθήκη ικανής περίσσειας όξινου θειικού άλατος, η αλλαγή του χρώματος του γλεύκους είναι ανάλογη προς την περιεκτικότητα των ανθοκυανών. Η μέτρηση γίνεται με φασματοφωτόμετρο της απορρόφησης του δείγματος στο μήκος κύματος 520nm.

Επίσης, έγινε προσδιορισμός των ολικών ανθοκυανών στα γλεύκη και σύμφωνα με τη μέθοδο των Iland et al. (2004), σύμφωνα με την οποία, η απορρόφηση στα 520nm, ύστερα από αναμονή τριών ωρών, ενός διαλύματος 10ml HCl 1M το οποίο περιέχει 100μl δείγματος οίνου, δίνει μια εκτίμηση των ολικών ανθοκυανών στον οίνο.

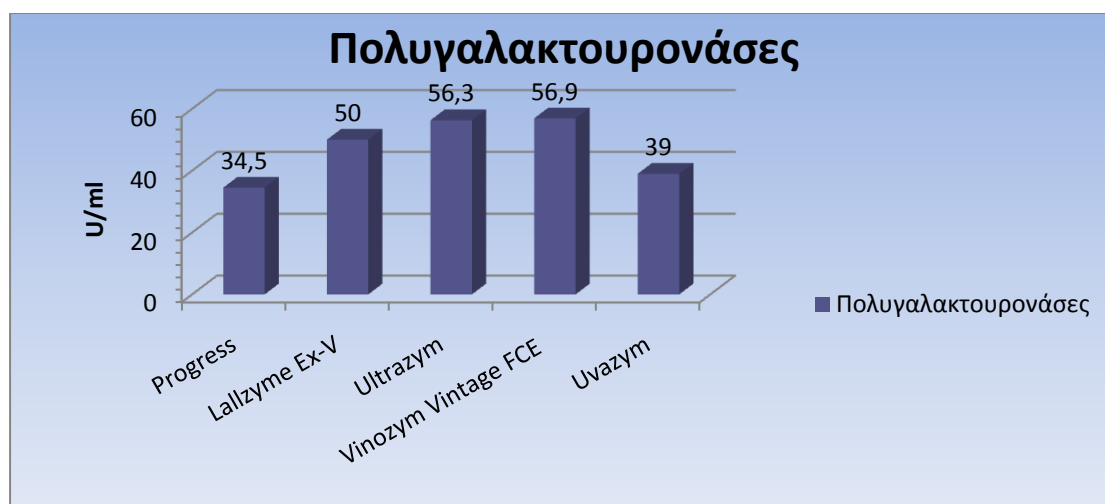
6. Αποτελέσματα - Συζήτηση

6.1. Αποτελέσματα μέτρησης των ενζυμικών δραστηριοτήτων

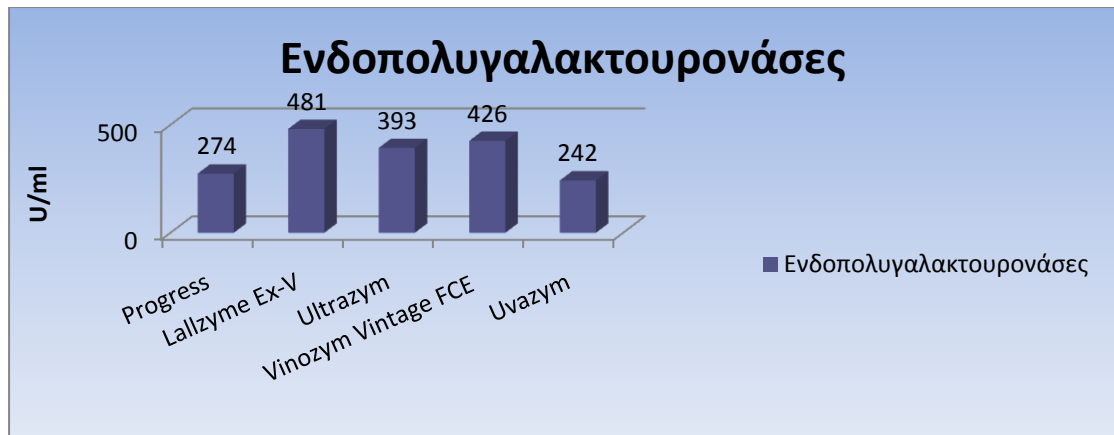
Τα αποτελέσματα μέτρησης των ενζυμικών δραστηριοτήτων φαίνονται στον παρακάτω πίνακα καθώς και στα σχήματα τα οποία ακολουθούν. Οι μονάδες είναι σε Units/ml.

Πίνακας 6.1 : Αποτελέσματα των ενζυμικών δραστηριοτήτων.

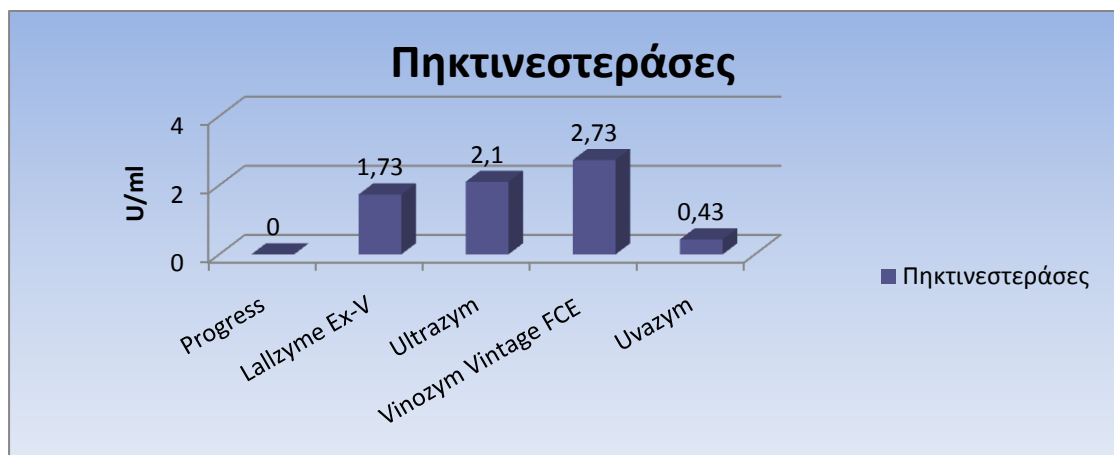
	Progress	Lallzyme Ex-V	Ultrazym	Vinozym Vintage FCE	Uvazym
Πολυγαλακτουρονάσες	34,5	50	56,3	56,9	39
Ενδοπολυγαλακτουρονάσες	274	481	393	426	242
Πηκτινολυάσες	0	0	0	0	0
Πηκτινεστεράσες	0	1,73	2,1	2,73	0,43
Κυτταρινάσες	8,23	10,74	7,34	5,78	6,1
B – Γλυκοζιδάσες	1482	295	12813	3233	1377



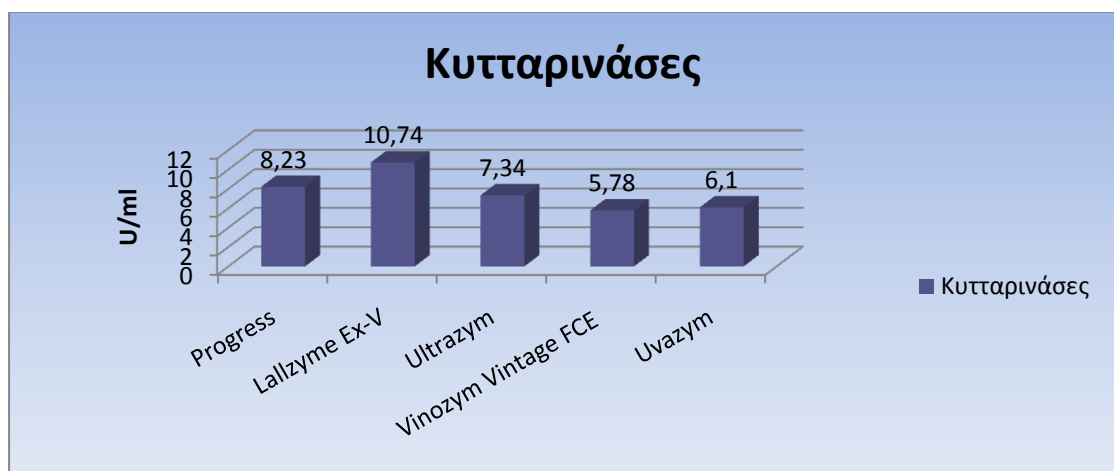
Σχ. 6.1 : Απεικόνιση των διάφορων ποσοτήτων της Πολυγαλακτουρονάσης σε Units/ml στα πέντε παρασκευάσματα.



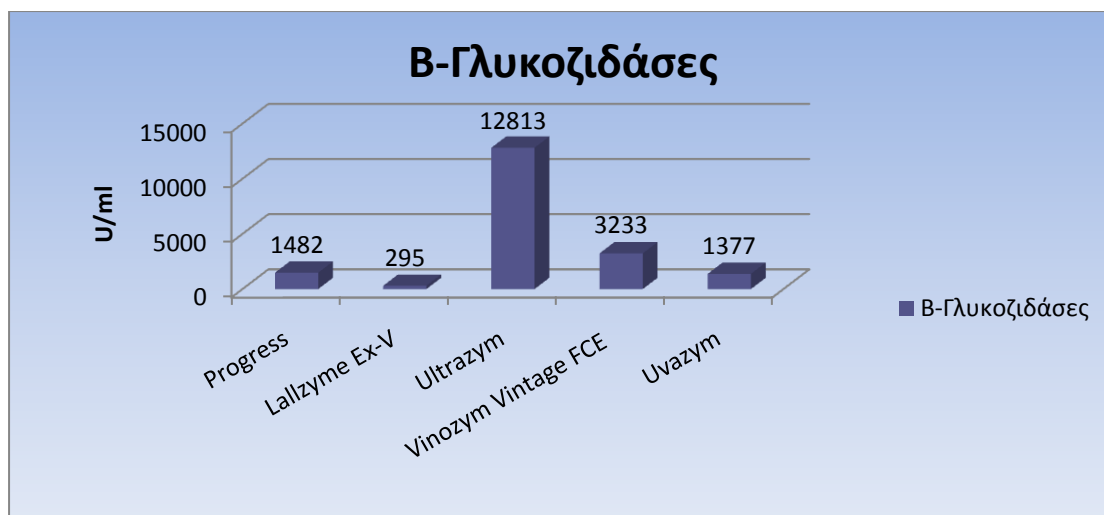
Σχ. 6.2 : Απεικόνιση των διάφορων ποσοτήτων της Ενδοπολυγαλακτουρονάσης σε Units/ml στα πέντε παρασκευάσματα.



Σχ. 6.3 : Απεικόνιση των διάφορων ποσοτήτων της Πηκτινестεράσης σε Units/ml στα πέντε παρασκευάσματα.



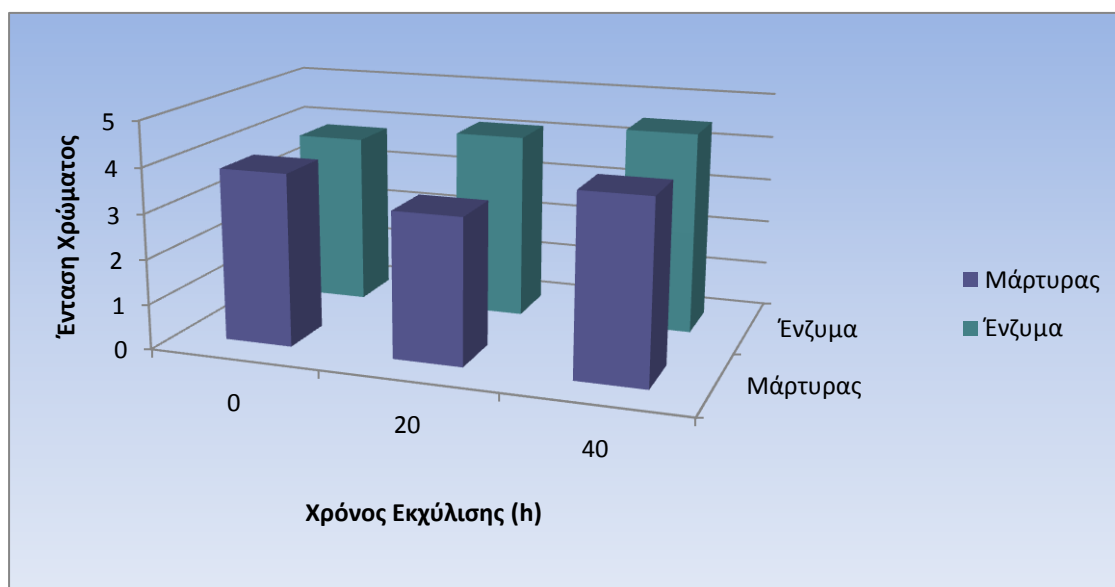
Σχ. 6.4 : Απεικόνιση των διάφορων ποσοτήτων της Κυτταρινάσης σε Units/ml στα πέντε παρασκευάσματα.



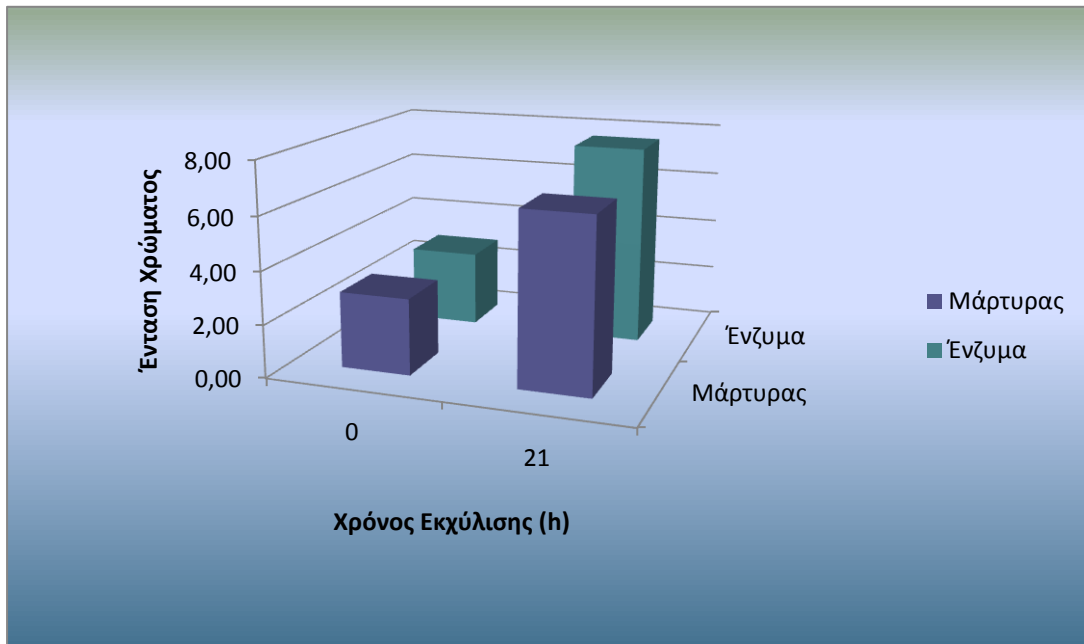
Σχ. 6.5 : Απεικόνιση των διάφορων ποσοτήτων της β-γλυκοζιδάσης σε Units/ml στα πέντε παρασκευάσματα.

6.2. Ένταση χρώματος - Απόχρωση

Η ένταση του χρώματος και η απόχρωση των δειγμάτων των γλευκών κατά τη διάρκεια της εκχύλισης τους, στα πρώτα πέντε δείγματα προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο Glories (1984), ενώ στα υπόλοιπα τρία προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο του Sudraud (1958), όπως παρουσιάζονται στα ακόλουθα σχήματα.

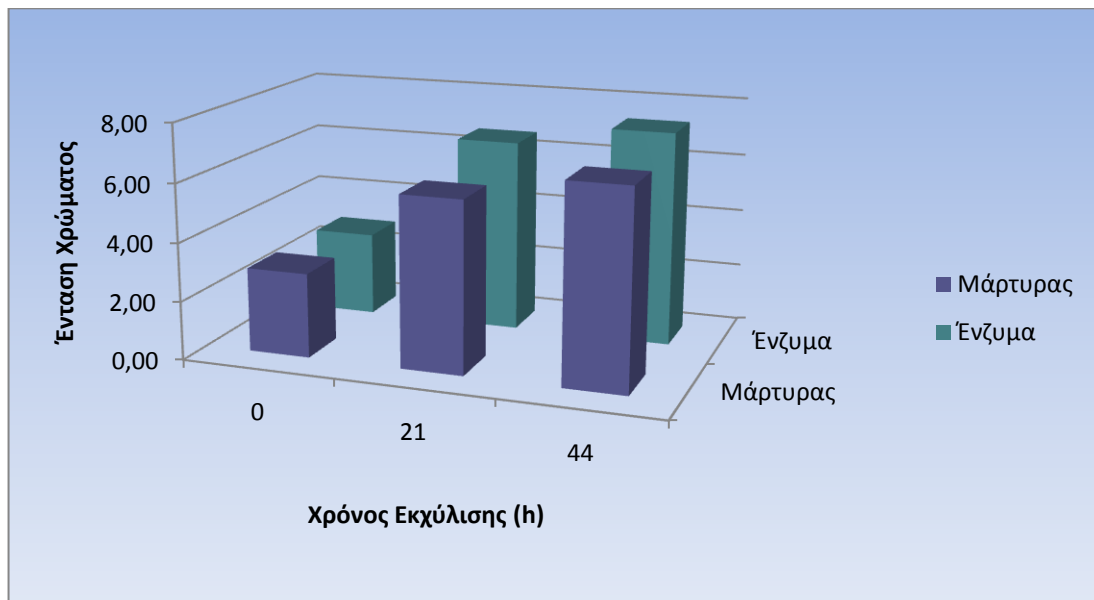


Σχ. 6.6 : Μεταβολή της έντασης του χρώματος του γλεύκους κατά τη διάρκεια της εκχύλισης στο ΑΓ 1.

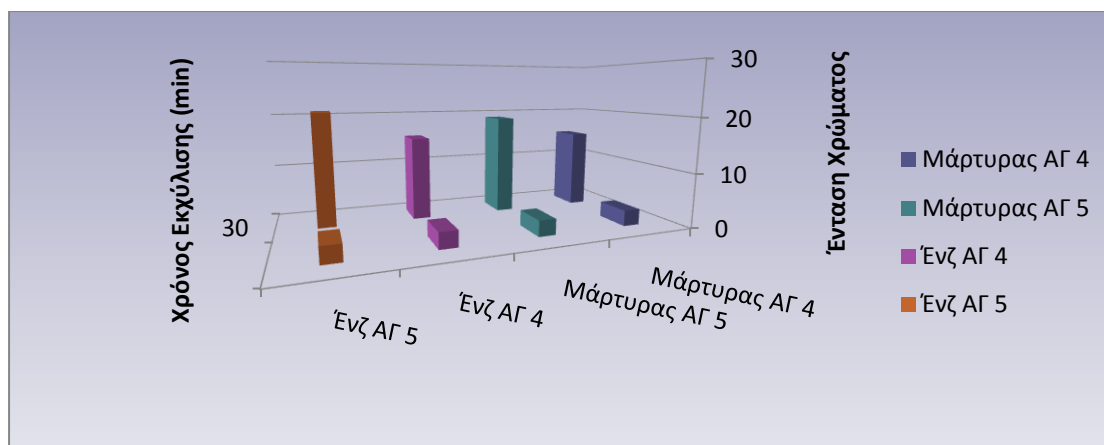


Σχ. 6.7 : Μεταβολή της έντασης του χρώματος του γλεύκους κατά τη διάρκεια της εκχύλισης στο ΑΓ 2.

Στα ΑΓ 1, ΑΓ 2 και ΑΓ 3 η ένταση του χρώματος του ενζύμου κυμάνθηκε στα ίδια περίπου επίπεδα με τον αντίστοιχο μάρτυρα χωρίς να υπάρχει κάποια ιδιαίτερη διαφορά στις τιμές, περίπου μία μονάδα.

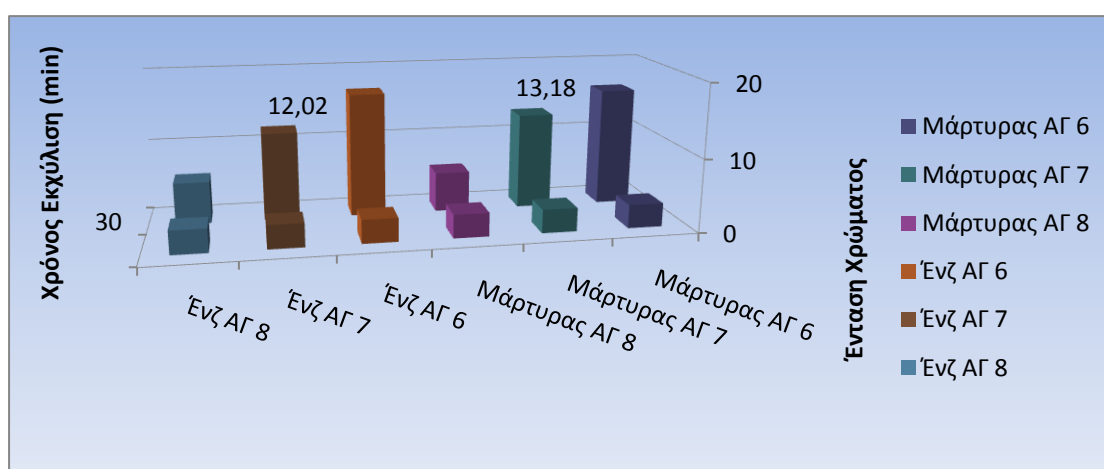


Σχ. 6.8 : Μεταβολή της έντασης του χρώματος του γλεύκους κατά τη διάρκεια της εκχύλισης στο ΑΓ 3.



Σχ. 6.9 : Μεταβολή της έντασης του χρώματος του γλεύκους κατά τη διάρκεια της εκχύλισης στο ΑΓ 4 & ΑΓ 5.

Στα ΑΓ 4 και ΑΓ 5 εφαρμόστηκε διαφορετικός χρόνος εκχύλισης, τριάντα λεπτών, σε θερμοκρασία 60 °C. Στο ΑΓ 4 προστέθηκε Lallzyme Ex-V, ενώ στο ΑΓ 5 προστέθηκε Vinozym Vintage FCE. Στο σχήμα 6.9 μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι και στις δύο περιπτώσεις η ένταση ήταν υψηλή, βέβαια και εδώ οι τιμές του κάθε μάρτυρα με την αντίστοιχη τιμή του ενζύμου να μην έχει μεγάλη διαφορά. Στο ΑΓ 4 η διαφορά είναι μικρότερη της μισής μονάδας, ενώ στο ΑΓ 5 η διαφορά είναι σχεδόν δύο μονάδες. Αυτό πιθανών να οφείλεται στο γεγονός ότι στο ΑΓ 5 έχει γίνει προσθήκη διαφορετικού σκευάσματος ενζύμου και σε μεγαλύτερη συγκέντρωση. Βέβαια ο ανωτέρω ισχυρισμός μπορεί να καταρριφτεί από το επόμενο σχήμα το 6.10, στο οποίο θα παρατηρήσουμε ότι η τιμή της έντασης του μάρτυρα στο ΑΓ 7 είναι μεγαλύτερη από τη τιμή της έντασης του αντίστοιχου ενζύμου, με διαφορά μια και πλέον μονάδα.



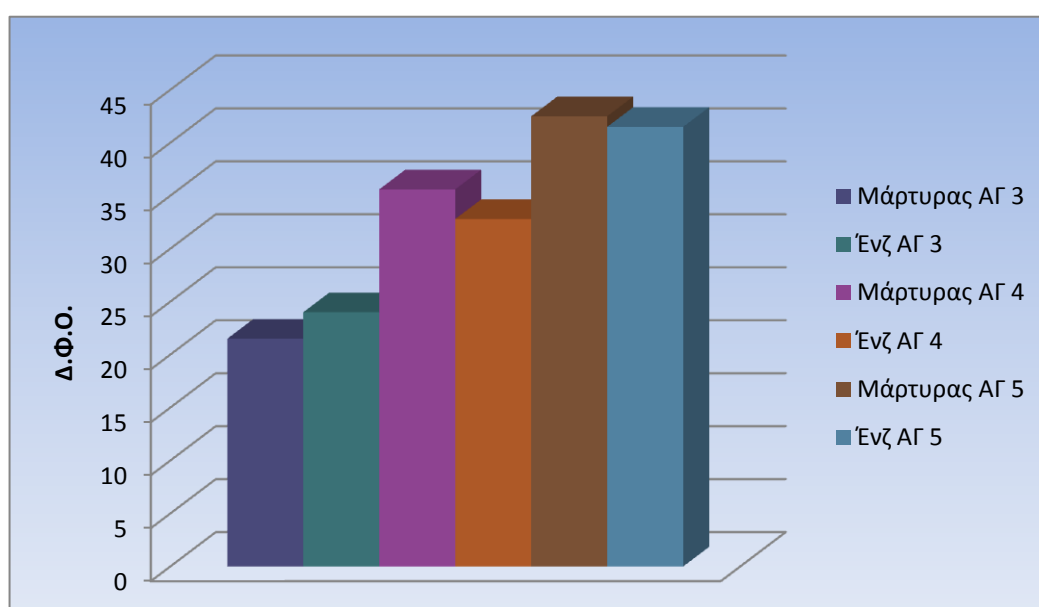
Σχ. 6.10 : Μεταβολή της έντασης του χρώματος του γλεύκους κατά τη διάρκεια της εκχύλισης στο ΑΓ 6, ΑΓ 7 & ΑΓ 8.

Η απόχρωση στα γλεύκη καθ' όλες τις πειραματικές διαδικασίες δεν παρουσίασε μεγάλες διακυμάνσεις, αλλά διατήρησε παρόμοια τιμή απόχρωσης τόσο στους μάρτυρες όσο και στα ένζυμα, σε αντιστοιχία τιμών μεταξύ 0,8 και 0,15.

6.3.Ολικές Φαινόλες

Οι ολικές φαινόλες των γλευκών κατά τη διάρκεια της εκχύλισης, όπως αναφέρθηκε στο πειραματικό μέρος, προσδιορίστηκαν με το Δείκτη Ολικών Φαινολών, σύμφωνα με τη μέθοδο των Ribéreau-Gayon et al. (2000) και τη μέθοδο των Iland et al. (2004).

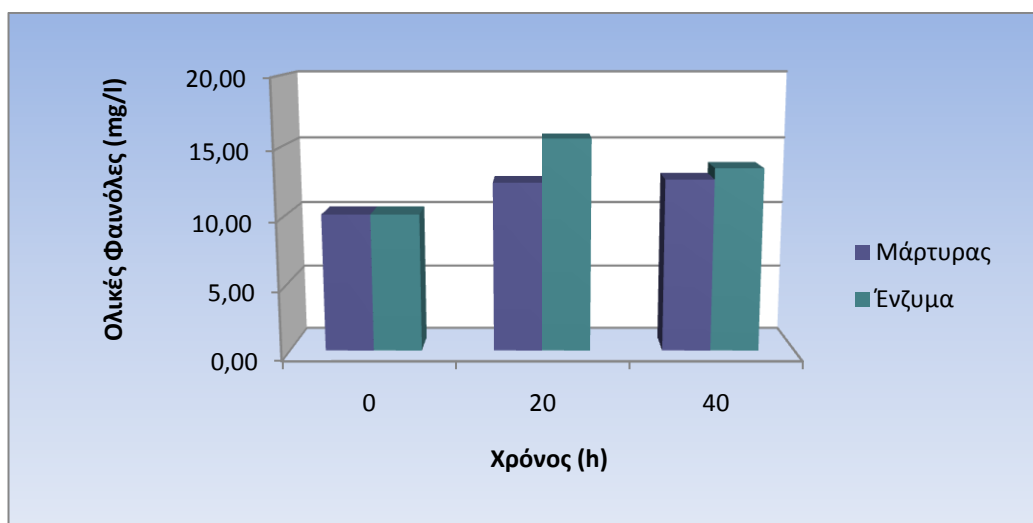
Ο Δείκτης Ολικών Φαινολών σύμφωνα με τη μέθοδο των Ribéreau-Gayon et al. (2000) δεν μετρήθηκε σε όλα τα δείγματα παρά μόνο στα ΑΓ 3, ΑΓ 4 και ΑΓ 5. Στο Σχήμα 6.11 απεικονίζεται η τελική τιμή του Δείκτη Ολικών Φαινολών μετά την εκχύλιση, η αρχική τιμή του Δείκτη Ολικών Φαινολών για όλα τα δείγματα ήταν 17,3.



Σχ. 6.11 : Μεταβολή του Δείκτη Ολικών Φαινολών κατά τη διάρκεια της εκχύλισης στα ΑΓ 3, ΑΓ 4 και ΑΓ 5.

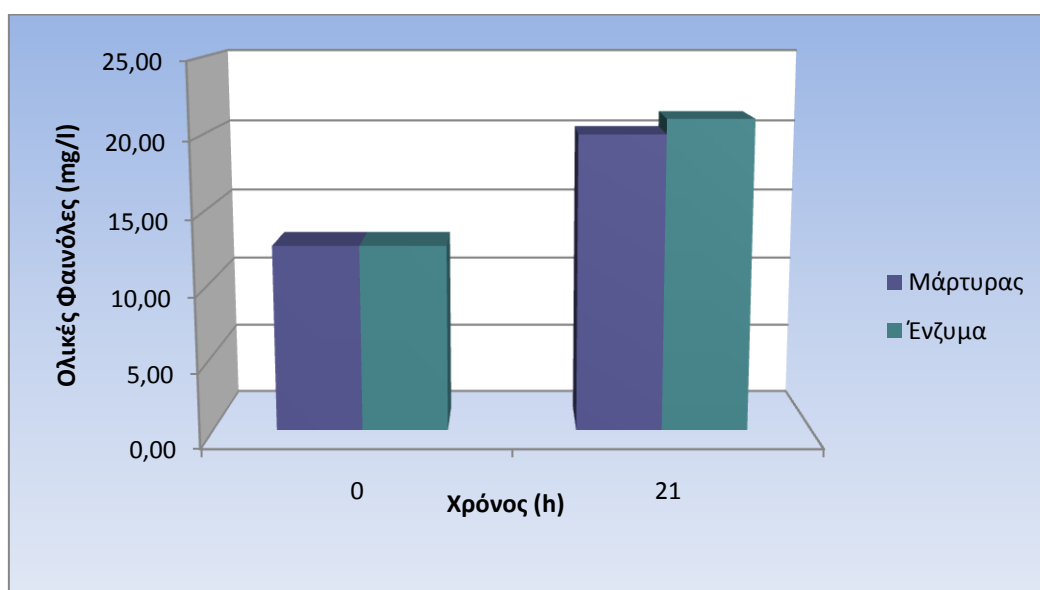
Παρατηρείται ότι και στις τρεις πειραματικές διαδικασίες υπάρχει μια αύξηση των φαινολικών συστατικών. Ωστόσο, όπως μπορούμε να δούμε, μόνο στο ΑΓ 3 η τιμή του Δ.Φ.Ο. είναι μεγαλύτερη στο δείγμα με τη προσθήκη του ενζύμου από ότι στο δείγμα του μάρτυρα, ενώ στο ΑΓ 4 και ΑΓ 5 παρατηρείται μεγαλύτερη τιμή του Δ.Φ.Ο. στο δείγμα του μάρτυρα.

Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο των Iland et al. (2004) στο ΑΓ 1, ΑΓ 2, ΑΓ 6, ΑΓ 7 και ΑΓ 8, προκύπτουν τα ακόλουθα σχήματα, στα οποία φαίνεται η τελική τιμή των ολικών φαινολών μετά την εκχύλιση.

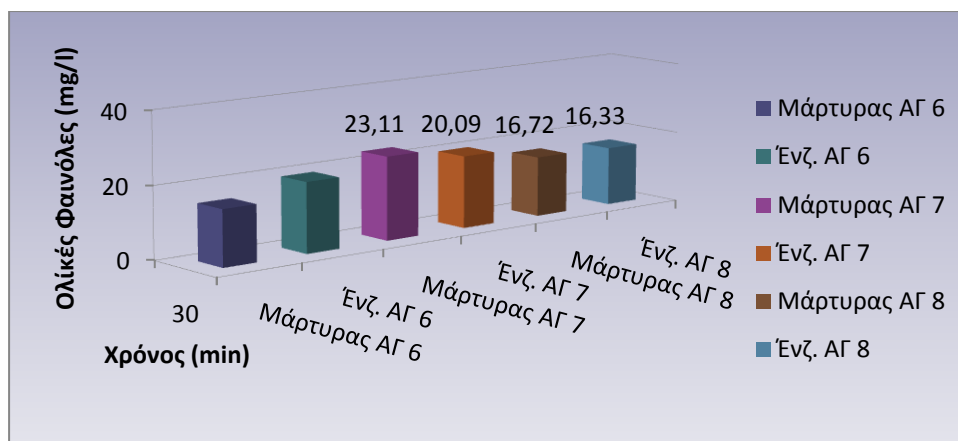


Σχ. 6.12 : Η διαμόρφωση των ολικών φαινολών του γλεύκους στο ΑΓ 1 σύμφωνα με τη μέθοδο των Iland et al. (2004).

Στο σχήμα 6.12, στο οποίο απεικονίζεται η πορεία εξέλιξης των ολικών φαινολών στο ΑΓ 1, παρατηρείται ότι ενώ αυξάνονται οι ολικές φαινόλες στα δείγματα με τα ένζυμα για τις πρώτες είκοσι ώρες, στο τέλος του πειράματος στα δείγματα με τα ένζυμα παρατηρείται μείωση των ολικών φαινολών.



Σχ. 6.13 : Η διαμόρφωση των ολικών φαινολών του γλεύκους στο ΑΓ 2 σύμφωνα με τη μέθοδο των Iland et al. (2004).

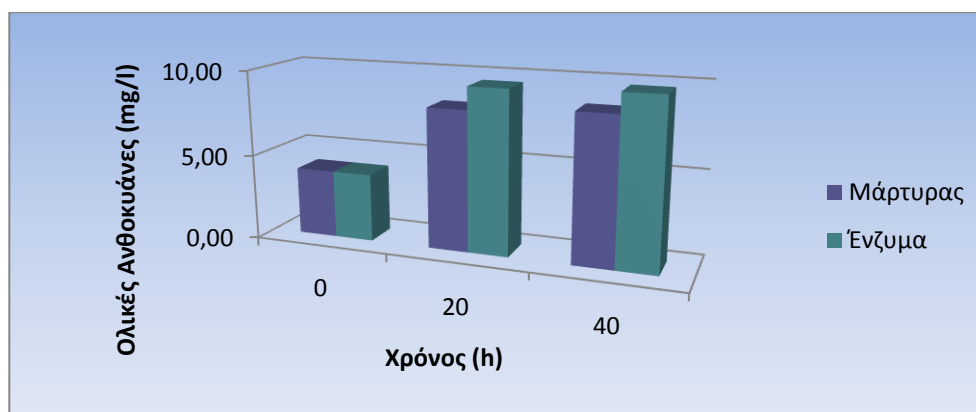


Σχ. 6.14 : Η διαμόρφωση των ολικών φαινολών του γλεύκους στο ΑΓ 6, ΑΓ 7 και ΑΓ 8 σύμφωνα με τη μέθοδο των Iland et al. (2004).

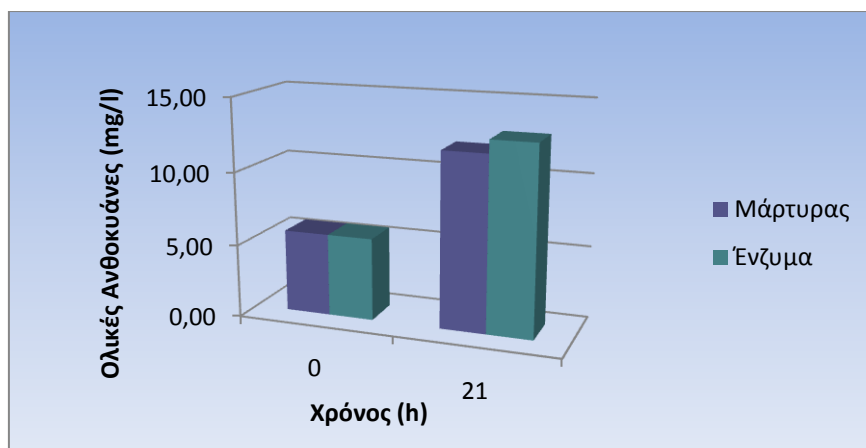
Παρόμοια αποτελέσματα στη τιμή των ολικών φαινολών, παρατηρείται να την έχουν και τα ΑΓ 7 και ΑΓ 8 (σχήμα 6.14), αρχικά η τιμή των ολικών φαινολών είναι 8,81 mg/l, ενώ στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας για το μεν ΑΓ 7 το δείγμα με το μάρτυρα έχει τιμή 23,11, ενώ τα δείγματα με τα ένζυμα έχουν τιμή 20, στο ΑΓ 8 η τιμή και για το δείγμα του μάρτυρα και για τα δείγματα με τα ένζυμα είναι περίπου στο 16,5 με μισή μονάδα πιο μπροστά το δείγμα του μάρτυρα. Βέβαια θα πρέπει να τονίσουμε ότι και στα ΑΓ 2 και ΑΓ 6, παρότι η τιμή των ολικών φαινολών είναι μεγαλύτερη στα δείγματα με τα ένζυμα απ' ότι στο δείγμα του μάρτυρα, η διαφορά αυτή είναι ελάχιστη.

6.4. Ολικές ανθοκυάνες

Ο προσδιορισμός των ολικών ανθοκυανών έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο των Ribéreau-Gayon and Stonestreet (1965) καθώς και με τη μέθοδο των Iland et al. (2004).

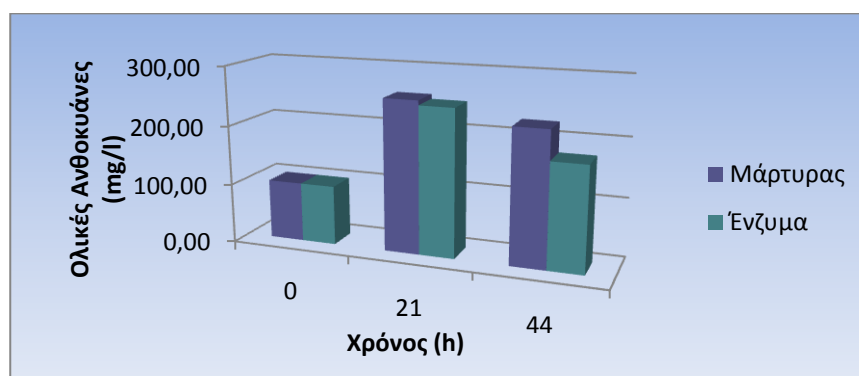


Σχ. 6.15 : Μεταβολή των ολικών ανθοκυανών κατά τη διάρκεια της εκχύλισης στο ΑΓ 1.

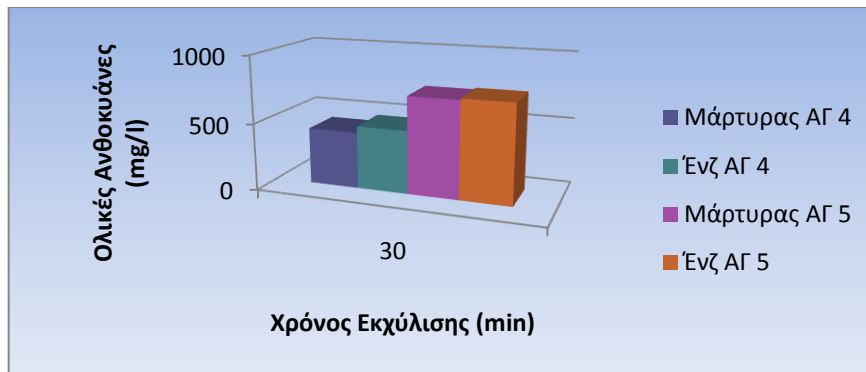


Σχ. 6.16 : Μεταβολή των ολικών ανθοκυανών κατά τη διάρκεια της εκχύλισης στο ΑΓ 2.

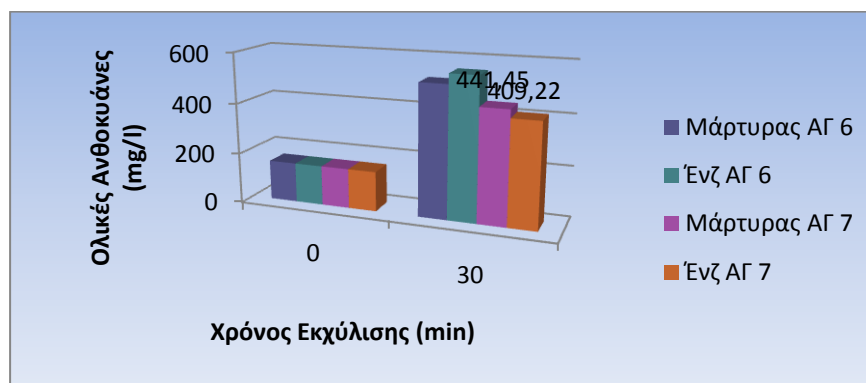
Παρατηρείται ότι υπάρχει μια συνεχόμενη αύξηση στη τιμή των ολικών ανθοκυανών κατά την εξέλιξη της εκάστοτε πειραματικής διαδικασίας (σχήμα 6.15, 6.16, 6.18). Εξάιρεση παρατηρείται στο ΑΓ 3 (σχήμα 6.17), στο οποίο μέχρι τις είκοσι μία ώρες υπάρχει αύξηση των ολικών ανθοκυανών, στη συνέχεια και μέχρι το τέλος του πειράματος να επέρχεται μείωση της τιμής των ολικών ανθοκυανών, και μάλιστα η τιμή των ολικών ανθοκυανών του ενζύμου να είναι μικρότερη από του μάρτυρα. Επίσης στο ΑΓ 7 (σχήμα 6.19) παρατηρούμε ότι οι ολικές ανθοκυάνες του ενζύμου είναι λιγότερες από τις ολικές ανθοκυάνες του μάρτυρα. Επίσης είναι σημαντικό και πρέπει να τονίσουμε ότι σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες στις οποίες έγινε μέτρηση των ολικών ανθοκυανών παρατηρείται ότι δεν υπάρχει μεγάλη διαφορά στη τιμή των ολικών ανθοκυανών μεταξύ ενζύμου – μάρτυρα.



Σχ. 6.17 : Μεταβολή των ολικών ανθοκυανών κατά τη διάρκεια της εκχύλισης στο ΑΓ 3, σύμφωνα με τη μέθοδο των Ribéreau-Gayon and Stonestreet (1965).



Σχ. 6.18 : Μεταβολή των ολικών ανθοκυανών κατά τη διάρκεια της εκχύλισης στο AG 4 και AG 5, σύμφωνα με τη μέθοδο των Ribéreau-Gayon and Stonestreet (1965).



Σχ. 6.19 : Μεταβολή των ολικών ανθοκυανών κατά τη διάρκεια της εκχύλισης στο AG 6 και AG 7.

6.5. Συζήτηση των αποτελεσμάτων των δειγμάτων εκχύλισης

Καθ' όλες τις πειραματικές διαδικασίες της εκχύλισης παρατηρήθηκε ότι οι τιμές έντασης του χρώματος στα δείγματα με τη προσθήκη εξωγενών ενζύμων δεν είχαν μεγάλη διαφορά με τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων μάρτυρες. Μάλιστα, όπως παρατηρήθηκε υπήρξε και η περίπτωση στην οποία η τιμή έντασης του χρώματος του μάρτυρα να είναι μεγαλύτερη από το δείγμα με τα ένζυμα (AG 7).

Όσον αφορά την απόχρωση, σε όλες τις περιπτώσεις, τόσο στα δείγματα μάρτυρες όσο και στα δείγματα με τα εξωγενή ένζυμα παρουσίασαν τις ίδιες τιμές μείωσης, οι οποίες κυμάνθηκαν από 0,8 έως 0,15.

Ο δείκτης ολικών φαινολών ακολουθεί ανοδική πορεία καθ' όλη τη διάρκεια της εκχύλισης, σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες, εκτός από το AG 1 στο οποίο παρατηρήθηκε μείωση των ολικών φαινολών στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας. Βέβαια, αξίζει να σημειωθεί ότι οι διαφορές τιμών μεταξύ μαρτύρων και δειγμάτων με τα ένζυμα δεν ήταν θεαματικές, μάλιστα στις μισές περιπτώσεις οι ολικές φαινόλες στους

μάρτυρες εμφάνιζαν υψηλότερη τιμή από τα δείγματα με τη προσθήκη εξωγενών ενζύμων (ΑΓ 4, ΑΓ5, ΑΓ 7, ΑΓ 8).

Ομοίως, οι ολικές ανθοκυάνες ακολουθούν ανοδική πορεία, εκτός από το ΑΓ 3, στο οποίο μετά τις είκοσι ώρες εκχύλισης επήλθε μια κάμψη μείωσης των ολικών ανθοκυανών με μεγαλύτερη μείωση στα δείγματα με τα εξωγενή ένζυμα. Ούτε στις ολικές ανθοκυάνες υπήρξαν μεγάλες διαφορές τιμών μεταξύ μαρτύρων και δειγμάτων με τη προσθήκη ενζύμων.

Ολοκληρώνοντας τη συζήτηση των αποτελεσμάτων μπορούμε να πούμε ότι η χρήση των παρασκευασμάτων με εξωγενή ένζυμα και ο ισχυρισμός ότι βελτιώνουν το χρώμα των οίνων, άνοιξε νέους ορίζοντες στην οινολογία. Ωστόσο, παρά τις αρχικές προσδοκίες, τα αποτελέσματα από τη παρούσα εργασία καθώς επίσης και από διάφορες άλλες μελέτες παρουσιάζονται αντιφατικά. Τέτοιες αντιφάσεις έχουν αποδοθεί στη διαφορετική φύση και τις διαφορετικές δραστηριότητες των εμπορικών σκευασμάτων, καθώς και στη παρουσία δευτερευουσών δραστηριοτήτων, όπως η Β-γλυκοζιδάση (Inmaculada Romero – Cascales και λοιποί, 2008). Σε μελέτη η οποία παρουσιάστηκε το 2005 από τον Alvarez και λοιπούς, αναφέρει ότι η χρήση εξωγενών ενζύμων, προκάλεσε μικρή βελτίωση στο χρώμα και τη συγκέντρωση των φαινολών, αλλά είχε αυξηθεί η πικρή γεύση του οίνου. Ο Zimman και λοιποί (2002) διαπίστωσαν ότι η προσθήκη εξωγενών ενζύμων αύξησε το ποσοστό των προανθοκυανιδινών στο κρασί, αλλά δεν αύξησαν την ένταση του χρώματος. Για κάποιους άλλους ερευνητές, η χρήση αυτών των μιγμάτων ενζύμων κατά την εκχύλιση, αυξάνει την εκχύλιση αρωματικών ουσιών από τη ράγα (Bakker et al., 1999), αλλά κυρίως την εκχύλιση των φαινολικών συστατικών, δίνοντας υψηλότερες τιμές έντασης χρώματος, καλύτερη ποιότητα χρώματος, χαμηλότερες τιμές απόχρωσης, περισσότερες ανθοκυάνες και υψηλότερο δείκτη ολικών φαινολών στους παραγόμενους οίνους (Pardo et al., 1999, Kelebek et al., 2007). Ο Sacchi και οι συνεργάτες του (2005) παρουσίασαν μελέτη, στην οποία ύστερα από χρήση εξωγενών ενζύμων κατά την εκχύλιση, αυξήθηκαν οι ανθοκυάνες, οι πολυμερισμένες ταννίνες καθώς και αρωματικές ενώσεις (κυρίως νορισοπρενοειδή C13), ενισχύθηκε η ένταση του χρώματος καθώς επίσης και η ποιότητα του προκύπτοντος οίνου. Κατά άλλους η μη καθαρότητα αυτών των ενζύμων, μπορεί να προκαλέσει ακόμα και μείωση της συγκέντρωσης των ανθοκυανών και της έντασης του χρώματος (Wightman et al., 1997). Στα προηγούμενα αποτελέσματα είναι ξεκάθαρες οι αντιφάσεις οι οποίες παρουσιάζονται για τη δράση των παρασκευασμάτων με ένζυμα. Επίσης θα ήταν παράληψη να μην τονίσουμε ότι η χρήση τέτοιων ενζύμων πρέπει

να γίνεται με μέτρο, καθώς οδηγούν σε σχηματισμό και αύξηση, κατά την οινοποίηση, μεθανόλης (Gerogiannaki-Christopoulou et al., 2008).

7. Συμπεράσματα

7.1. Συμπεράσματα των αποτελεσμάτων

Τα συμπεράσματα τα οποία προέκυψαν από την παραπάνω εργασία είναι σημαντικά για την ορθή χρήση των εξωγενών ενζύμων κατά τη διάρκεια της εκχύλισης του Αγιωργίτικου.

- Η χρήση εξωγενών ενζύμων κατά την εκχύλιση των στεμφύλων φαίνεται να συνεισφέρει σε μεγαλύτερες τιμές έντασης του χρώματος, ολικών ανθοκυανών, δείκτη ολικών φαινολών και μικρότερες τιμές απόχρωσης.
- Καθ' όλες τις πειραματικές διαδικασίες της εκχύλισης οι τιμές έντασης του χρώματος στα δείγματα με τη προσθήκη των ενζύμων ήταν μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων μάρτυρες.
- Η απόχρωση σε όλες τις περιπτώσεις, τόσο στα δείγματα μάρτυρες όσο και στα δείγματα με τα ένζυμα εμφάνισαν τις ίδιες τιμές μείωσης, με μικρότερες τα δείγματα των ενζύμων.
- Ο δείκτης ολικών φαινολών ακολουθεί ανοδική πορεία καθ' όλη τη διάρκεια της εκχύλισης, σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες, όμως στις μισές πειραματικές διαδικασίες (ΑΓ 4, ΑΓ 5, ΑΓ 7, ΑΓ 8) παρατηρείται υψηλότερος δείκτης ολικών φαινολών στα δείγματα μάρτυρες.
- Οι ολικές ανθοκυάνες ακολουθούν ανοδική πορεία κατά τη διάρκεια της εκχύλισης σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες. Βέβαια, ούτε στις ολικές ανθοκυάνες υπήρξαν μεγάλες διαφορές τιμών μεταξύ μαρτύρων και δειγμάτων με τα ένζυμα.

Από όλα όσα αναφέρθηκαν ανωτέρω, μπορούμε να κατανοήσουμε ότι η πανάρχαια διαδικασία της οινοποίησης εξαρτάται από τη δράση των ενζύμων. Τα ένζυμα μπορούν να θεωρηθούν ως οι κύριοι βιοκαταλύτες των διάφορων βιοχημικών αντιδράσεων. Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή οι βιοκαταλύτες αυτοί δεν προέρχονται αποκλειστικά και μόνο από τις σταφυλές, αλλά και από τις ζύμες και από διάφορους μικροοργανισμούς οι οποίοι ενδημούν στους αμπελώνες ή στα οινοποιεία. Οι καλύτεροι οίνοι μπορούν να παραχθούν όταν οι επιθυμητές ενζυμικές δράσεις επιτυγχάνονται στο βέλτιστο βαθμό και περιορίζονται οι αρνητικές ενζυμικές δράσεις.

Παρόλο που τα ενδογενή ένζυμα των σταφυλών συμμετέχουν σε όλα τα βήματα της οινοποίησης, η δράση τους ποικίλει και μπορεί να επηρεαστεί από φυσιολογικούς και τεχνολογικούς παράγοντες, όπως αναλύθηκε στο θεωρητικό μέρος της παρούσας εργασίας. Για τους λόγους αυτούς, τις τελευταίες δύο δεκαετίες τα εμπορικά ενζυμικά

παρασκευάσματά έχουν γίνει πάρα πολύ δημοφιλή στην οινοποίηση με κυριότερα πλεονεκτήματα τους την αποτελεσματικότητα, την εξειδίκευση και την ευκολία χρήσης.

Η χρήση των εξωγενών ενζύμων έχει ως σκοπό τη συμπλήρωση ή ακόμη και την υποκατάσταση των ενδογενών ενζύμων των σταφυλών αλλά και των μικροοργανισμών τα οποία βρίσκονται στο γλεύκος και τον οίνο. Ωστόσο, βάση των αποτελεσμάτων της παρούσης εργασίας, αλλά και πολλών άλλων ερευνών οι οποίες έχουν γίνει στο παρελθόν από διάφορους ερευνητές, καθίσταται σαφές ότι είναι ακόμη απαραίτητη περαιτέρω έρευνα ώστε να αποκτηθεί πληρέστερη γνώση σχετικά με το ρόλο και το μηχανισμό δράσης των ενζύμων τα οποία επιδρούν σε αυτές τις σύνθετες διεργασίες όπως η εκχύλιση των στεμφύλων.

7.2. Προοπτικές

Τα συμπεράσματα τα οποία προέκυψαν από τη συγκεκριμένη έρευνα είναι πολύ χρήσιμα και σημαντικά για την κατάλληλη επιλογή και χρήση των ηηκτινολυτικών ενζύμων, ωστόσο αποτελούν απλά ένα μικρό μέρος των μελετών οι οποίες πρέπει να γίνουν για την κατανόηση της επίδρασης των ηηκτινολυτικών ενζύμων κατά τη διάρκεια της εκχύλισης του Αγιωργίτικου και στην πολυφαινολική σύσταση των προκυπτόντων οίνων.

Οι μελλοντικές ερευνητικές κατευθύνσεις και προοπτικές πάνω στο ευρύτερο πεδίο της παρούσας εργασίας θα μπορούσαν ενδεικτικά να περιλαμβάνουν:

- Επανάληψη του συγκεκριμένου πειράματος στην ίδια ποικιλία, όχι όμως σε εργαστηριακό επίπεδο αλλά υπό κανονικές συνθήκες οινοποίησης.
- Περισσότερες αναλύσεις στα γλεύκη και στους οίνους.
- Χρήση όλων των παρασκευασμάτων ενζύμων στα οποία χαρακτηρίστηκε η ενζυμική τους δράση στη συγκεκριμένη εργασία, αλλά και άλλων με παρόμοια χαρακτηριστικά.
- Ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των επιμέρους φαινολικών συστατικών των οίνων, με τη χρήση της HPLC.
- Εφαρμογή του πειράματος και σε άλλες γηγενείς ποικιλίες, οι οποίες δεν έχουν μελετηθεί ακόμη.

Ολοκληρώνοντας θα θέλαμε να τονίσουμε ένα εξίσου σημαντικό σημείο. Οι υψηλές απαιτήσεις των σύγχρονων οινοποιών αλλά και των καταναλωτών για καλύτερη ποιότητα των οίνων. Το γεγονός αυτό έχει προκαλέσει την ανάγκη δημιουργίας καινοφανών ενζύμων

τα οποία θα είναι ειδικά σχεδιασμένα, μέσω της τεχνολογίας της γενετικής μηχανικής, για συγκεκριμένους σκοπούς.

Η εφαρμογή των νέων αυτών τεχνολογιών είναι αρκετά ενδιαφέρουσα, δεν θα πρέπει όμως να μας διαφεύγει το γεγονός των γενετικώς τροποποιημένων τροφίμων και η επιφύλαξη πολλών καταναλωτών από αυτά. Θα πρέπει επίσης να ληφθεί υπόψη ότι ο οίνος είναι ένα προϊόν το οποίο παράγεται εδώ και αρκετούς αιώνες και είναι άρρηκτα συνδεδεμένο με τη παράδοση και τη κουλτούρα από τη κάθε οινοπαραγωγό περιοχή.

Βιβλιογραφία

Amrani - Joutei, K. and Glories, Y. (1995), Tannins and anthocyanins of grape berries: Localization and extraction technique, *Rev. Fr. Oenol.*, Vol. 153, pp. 28–31.

Arozarena, I., Casp, A., Marín, R. and Navarro, M. (2000), Multivariate differentiation of Spanish red wines according to region and variety, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Vol. 80, pp. 1909 – 1917.

Bakker, J., Bellworthy, J. S., Reader, P. H and Watkins J. S (1999), Effect of Enzymes During Vinification on Color and Sensory Properties of Port Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50, pp. 271 – 276.

Bayonove, C, Gunata, Z., Sapis, J. C, Baumes, R., Dugelay, I. and Grassin, C. (1992), Augmentation des arômes dans le vin et utilisation d'enzymes. *Rev. Oenol.*, 64, 67.

Dubourdieu, D., Ollivier, C. and Boidron, J. N. (1986). Incidence des opérations préfermentaires sur la composition chimique et les qualités organoleptiques des vins blancs secs. *Conn. Vigne Vtn*, 20, 53 – 76.

Foster, H. (1998), Pectinesterases from *Phytophthora infestans*. *Methods in Enzymology*, 161, 355 – 361.

Gerogiannaki-Christopoulou, M., Polissiou, M., Tarantilis, P., Provolisianou-Gerogiannaki, I. and Anagnostaras, E. (2008), Determination of Pectinesterase Activity in Grape Varieties (*Vitis vinifera* L.) During Vinification, *Journal of Food Technology*, Vol. 6, Issue 3, pp. 125 – 129.

Gil, J. V. & Valles, S. (2001). Effect of maceration enzymes on red wine aroma at laboratory scale : exogenous addition or expression by transgenic wine. *Journal of Agricultural and food Chemistry*, 49, 5515 – 5523.

Grassin C. and Fauquembergue, (1996), *Industrial Enzymology*, Second Edition, Chapter 2.22, Wine, 375 – 382.

Grassin, C. (1987). *Recherches sur les enzymes extra cellulaires secretes par Botrytis cinerea dans la bête de raisin. Applications oenologiques et phytopathologiques*. Ph.D. Thesis, Bordeaux.

Gunata, Z., Bayonove, C, Baumes, R. and Cordonnier, R. (1985). The aroma of grapes. Localisation and evolution of free and bound fractions of some grape aroma components c.v. Muscat during the first development and the maturation. *J. Sci. Food Agric*, 36, 857 – 862.

Iland, P., Bruer, N., Edwards, G., Weeks, S. and Wilkes, E. (2004), Chemical analysis of grapes and wine: techniques and concepts, P. Iland Wine Promotions PTY LTD, Campbelltown, Australia.

Kelebek, H., Canbas, A., Cabaroglu, T. and Selli, S. (2007), Improvement of anthocyanin content in the cv. Öküzgözü wines by using pectolytic enzymes, *Food Chemistry*, Vol. 105, pp. 334 – 339.

Koundouras, S., Marinos, V., Gkoulioti, A., Kotseridis, Y. and Leeuwen, C.V. (2006), Influence of Vineyard Location and Vine Water Status on Fruit Maturation of Nonirrigated Cv. Agiorgitiko (*Vitis vinifera* L.), Effects on Wine Phenolic and Aroma Components, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 54, pp. 5077 – 5086.

Landbo Anne-Katrine, Anne S. Meyer, (2004), Effects of different enzymatic maceration treatments on enhancement of anthocyanins and other phenolics in black currant juice, 503 – 513.

Lazarani, G., Cantarelli, C. and Pifferi, P.J. 1989. Biotechnological Applications in Beverage Production, Elsevier Applied Science Publishers. London pp. 189 – 217.

Leske, P., (1996). Resulte of enzyme evaluation trails : Colour extraction performance. Advances in Juice Clarification and Yeast Inoculation. Proceedings of ASVO Oenology Seminar. pp. 6 – 7.

Marteau, G. (1967). Les enzymes pectolytiques et la technologie du raisin et de la pomme. *Ann. Nutr. Alim.*, 21, 223 – 245.

Membre, J. & Burlot, R. (1994). Effects of temperature, pH and NaCl on growth and pectinolytic activity of *Pseudomonas marginalis*. *Applied Environmental Microbiology*, 60, 2017 – 2022.

Nelson, N. (1944). A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry*, 153, 375 – 380.

Pardo, F., Salinas, M.R., Alonso, G.L., Navarro, G. and Huerta, M.D. (1999), Effect of diverse enzyme preparations on the extraction and evolution of phenolic compounds in red Wines, *Food Chemistry*, Vol. 67, Issue 2, pp. 135 – 142.

Ribéreau – Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A. and Dubourdieu, D. (2000), Handbook of Enology, Vol. 2, The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments.

Schwab, W and Schrier, R. P. (1990). *References 2.22.9 Phytochemistry*, 25, 164 – 170.

Spagma, G., Barbagallo, R., Palmeri, R., Restuccia, C. & Giudici, P. (2002). Properties of endogenous β – glucosidase of a *Pichia anomala* strain isolated from Sicilian musts and wines. *Enzymes and Microbial Technology*, 3, 1036 – 1041.

Tony Godfrey & Stuart West, (1996), *Industrial Enzymology*, Second Edition, pp. 3 – 8.

Wightman, J.D., Price, S.F., Watson, B.T., and Wrolstad, R.E. (1997), Some Effects of Processing Enzymes on Anthocyanins and Phenolics in Pinot noir and Cabernet Sauvignon Wines, *American Journal of Enology and Viticulture*, Vol 48, Issue 1, pp. 39 – 48.

Γαλιώτου – Παναγιώτου Μ. (1998), *Ενζυμολογία Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα επιστήμης και τεχνολογίας τροφίμων*, Αθήνα.

Δ/ση Γεωργίας Κορινθίας (2004), *Παραγωγή και εμπορία οινικών προϊόντων στο νομό Κορινθίας*, Κόρινθος.

Διαμαντίδης, Γ. (2007), *Εισαγωγή στη Βιοχημεία, 3^η Έκδοση, UNIVERSITY STUDIO PRESS, Θεσσαλονίκη*.

ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε. (1997), *Μελέτη της αμπελοαγωγικής ζώνης της Νεμέας, Πρόγραμμα: ΕΠΕΤ Ι, Μέτρο 1.5, τίτλος έργου: Βελτίωση της ποιότητας οινικών προϊόντων της κατηγορίας V.Q.P.R.D., Αθήνα*.

Κοτσερίδης, Γ. (2005/β), *Σημειώσεις Οινολογίας ΙΙ, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα επιστήμης και τεχνολογίας τροφίμων*, Αθήνα

Κουράκου – Δραγώνα, Σ. (1998), *Θέματα Οινολογίας, Επιστήμη και Τεχνολογία στον τομέα της οινοποιητικής τεχνικής, Εκδόσεις Τροχαλία, Αθήνα*.

Σταυρακάκης, Μ.Ν. (2009), *Αμπελογραφία – Ποικιλίες και Υποκείμενα του ελληνικού αμπελώνα, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Εργαστήριο Αμπελολογίας, Αθήνα*.

<http://mde-didaktiki.biol.uoa.gr/arg/biohome.htm>, Ντράνος Γ., Βιολογία Γενικής Παιδείας.

<http://www.cyprusbiology.com/biologyglykeiou/biologyglykeiou.html>, Νικολάου Λ.

<http://www.rsc.org/education/teachers/learnnet/cfb/enzymes.htm>, enzymes

<http://www.wynboer.co.za/recentarticles/0411enzymes.php3>, enzymes in winemaking