



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΟΙΝΟΥ, ΑΜΠΕΛΟΥ & ΠΟΤΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Πρωτεϊνική αστάθεια οίνων: παράγοντες που την επηρεάζουν
και τρόποι αντιμετώπισης**

ΣΤΕΡΓΙΟΠΟΥΛΟΥ ΕΛΙΣΑΒΕΤ

A.M.: 19685107

ΚΑΛΟΥΣΗ ΞΕΝΙΑ

A.M.: 161037

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: ΕΥΑΓΓΕΛΟΥ ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ

ΑΘΗΝΑ, ΜΑΡΤΙΟΣ 2024



**UNIVERSITY OF WEST ATTICA
SCHOOL OF FOOD SCIENCE
DEPARTMENT OF WINE, VINE AND BEVERAGE SCIENCES**

BACHELOR THESIS

**Wine protein instability: Affecting factors and
methods of resolution**

STERGIOPOULOU ELISAVET KALOUSHI XENIA
REGISTRATION NUMBER: 19685107 REGISTRATION NUMBER: 161037

SUPERVISOR: EVANGELOU ALEXANDRA

ATHENS, MARCH 2024



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΟΙΝΟΥ, ΑΜΠΕΛΟΥ ΚΑΙ ΠΟΤΩΝ

ΔΗΛΩΣΗ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Οι υπογράφοντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη διπλωματική εργασία
με τίτλο:

«Πρωτεϊνική αστάθεια οίνων: παράγοντες που την επηρεάζουν και τρόποι
αντιμετώπισης»

και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

Ψηφιακή Υπογραφή Επιβλέποντα Καθηγητή (1^ο Μέλους Επιτροπής)	
Ψηφιακή Υπογραφή Καθηγητή (2^ο Μέλους Επιτροπής)	
Ψηφιακή Υπογραφή Καθηγητή (3^ο Μέλους Επιτροπής)	

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι κάτωθι υπογράφουσες ΣΤΕΡΓΙΟΠΟΥΛΟΥ ΕΛΙΣΑΒΕΤ του Μάριου, με αριθμό μητρώου 19685107 και ΚΑΛΟΥΣΗ ΞΕΝΙΑ του Παναγιώτη, με αριθμό μητρώου 161037, φοιτήτριες του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστημών Οίνου, Αμπέλου και Ποτών, δηλώνουμε έκαστη υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

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

Η Δηλούσα

Η Δηλούσα

ΣΤΕΡΓΙΟΠΟΥΛΟΥ ΕΛΙΣΑΒΕΤ

ΚΑΛΟΥΣΗ ΞΕΝΙΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία αναλύει σε βάθος το φαινόμενο της πρωτεϊνικής αστάθειας των οίνων, και κατ'έκταση του πρωτεϊνικού θολώματος, τον τρόπο με τον οποίο αυτό δημιουργείται, πώς γίνεται οπτικά αντιληπτό και τους παράγοντες που καθορίζουν τον βαθμό του. Επίσης τονίζονται και οι λόγοι που το φαινόμενο αυτό απαντάται με μεγαλύτερη συχνότητα στους λευκούς οίνους από ότι στους ερυθρούς οίνους, το είδος των πρωτεϊνών καθώς και οι βιολογικές αντιδράσεις που το διέπουν. Στο κομμάτι της οινοπαραγωγής, το φαινόμενο αυτό επηρεάζει πρωτίστως τις κατεργασίες της διήθησης, οπότε δίνεται έμφαση για την έγκαιρη αντιμετώπισή του στο μεταζυμωτικό στάδιο. Στην οινική βιομηχανία, ο συμβατικός τρόπος αντιμετώπισης του θολώματος για αρκετές δεκαετίες μέχρι και σήμερα είναι ο μπεντονίτης. Ωστόσο, οικονομικοί, περιβαλλοντικοί και οργανοληπτικοί παράμετροι έχουν στρέψει το ενδιαφέρον των οινοπαραγωγών σε εναλλακτικά μέσα διαύγασης του τελικού προϊόντος. Η τεχνολογική αναβάθμιση έχει επιτρέψει τον ακριβή προσδιορισμό των εμπλεκόμενων πρωτεϊνών, την αξιοποίηση εναλλακτικών μέσων κατεργασίας, αλλά και την βελτιστοποίηση των ήδη υπάρχοντων τεχνικών. Αυτές αξιολογούνται παρακάτω με κριτήριο την αποδοτικότητα, το κόστος και τη λειτουργικότητά τους στη σύγχρονη οινοποίηση. Συνοψίζοντας, με κατάλληλη διαχείριση των μεθόδων που αναλύονται ακολούθως, μπορεί να γίνει ορθή πρόβλεψη του μεγέθους της πρωτεϊνικής αστάθειας, να καθοριστεί επακριβώς η ποσότητα διαυγαστικού παράγοντα και να επιτευχθεί το βέλτιστο αποτέλεσμα ποιοτικά χωρίς να γίνει κατάχρηση των δοθέντων πόρων.

Λέξεις κλειδιά: διαύγαση, θόλωμα, κολλάρισμα, μέθοδοι διαύγασης, μπεντονίτης, πρωτεΐνες, πρωτεϊνικό θόλωμα, σταθεροποίηση

ABSTRACT

The current thesis analyzes in depth the phenomenon of protein instability in wines, and consequently the protein haze, how it is created, how it is visually perceived and the factors that determine its extent. Also highlighted are the reasons why this phenomenon occurs more frequently in white wines than in red wines, the type of proteins as well as the biological reactions that govern it. From the angle of wine production, this phenomenon primarily affects the filtration processes, so emphasis is placed on its early treatment in the post-fermentation stage. In the wine industry, the conventional way to deal with haze for several decades to this day is bentonite. However, economic, environmental and quality parameters have turned the interest of wine producers to alternative means of clarifying the final product. The technological upgrade has allowed the precise determination of the proteins involved, the utilization of alternative treatment means, but also the optimization of the already existing techniques. These are evaluated below based on their efficiency, cost and functionality in modern winemaking. In summary, with proper management of the methods discussed below, the magnitude of protein instability can be correctly predicted, the amount of clarifying agent accurately determined, and the optimal result achieved qualitatively without exploiting the given resources.

Keywords: *wine protein instability, bentonite, fining agents, proteins, stabilization, wine haze formation*

Ευχαριστίες

Θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε θερμά την Επιβλέπουσά μας Επίκουρο Καθηγήτρια κυρία Ευαγγέλου Αλεξάνδρα για τις χρήσιμες συμβουλές της και την καθοδήγησή της κατά την περίοδο συγγραφής της παρούσας μελέτης.

Επίσης, ευχαριστούμε τους γονείς μας που μας στήριζαν καθ'όλη την ακαδημαϊκή μας πορεία.

Αφιέρωση

Αφιερωμένη στους γονείς μας

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1. Εισαγωγή και Σκοπός της Εργασίας	Σελ. 1
2. Πρωτεΐνες – Γενικά Στοιχεία	Σελ. 3
2.1 Αμινοξέα	Σελ. 3
2.2 Δομή των Πρωτεϊνών	Σελ. 4
2.3 Μετουσίωση Πρωτεϊνών	Σελ. 7
3. Πρωτεΐνες Οίνου	Σελ.9
3.1 Πρωτεΐνες που σχετίζονται με την πρωτεϊνική αστάθεια	Σελ.10
3.1.1 Πρωτεΐνες που σχετίζονται με την παθογένεση (Pathogenesis Related Proteins - PR Proteins)	Σελ.11
3.1.2 Πρωτεΐνες που μοιάζουν με την θαυματίνη (Thaumatococcus Like Proteins, TLPs)	Σελ.14
3.1.3 Ωσμωτίνες	Σελ.14
3.1.4 Lipid Transfer Proteins (LTPs)	Σελ.15
3.1.5 Χιτινάσες	Σελ.16
3.1.6 Κενοτόπια Ιμβερτάση (Vacuolar Invertase)	Σελ.18
3.1.7 Πρωτεΐνες Ζύμης	Σελ.18
3.2 Άλλες Δράσεις Πρωτεϊνών στον Οίνο	Σελ.19
3.2.1 Επίδραση στη γεύση των ερυθρών οίνων	Σελ.19
3.2.2 Επίδραση στον αφρό στους αφρώδεις οίνους	Σελ.20
3.2.3 Αλλεργιογόνος δράση	Σελ.21
3.3 Εξέλιξη Πρωτεϊνών στην πορεία της Οινοποίησης	Σελ.22
3.3.1 Προζυμωτικό Επίπεδο	Σελ.22
3.3.2 Μεταζυμωτικό Επίπεδο	Σελ.23
3.4 Μέθοδοι προσδιορισμού πρωτεϊνικής συγκέντρωσης στους οίνους και παραγόντων διάλυσης	Σελ.23
3.4.1 Μέθοδος Bradford	Σελ.24
3.4.2 Μέθοδος Kjeldahl	Σελ.24
3.4.3 Μέθοδος Νιυδρίνης	Σελ.25
3.4.4 Μέθοδος Dumas	Σελ.26
3.4.5 Ηλεκτροφόρηση	Σελ.27
3.4.6 Προσδιορισμός περιεκτικότητας πρωτεΐνης με φασματομετρία στερεάς φάσης σε σύστημα SI-LOV	Σελ.28
3.4.7 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) – Γρήγορη Υγρή Πρωτεϊνική Χρωματογραφία (FPLC)	Σελ.29
4. Φαινόμενο Πρωτεϊνικού Θολώματος	Σελ.32
4.1 Μηχανισμός σχηματισμού πρωτεϊνικού θολώματος	Σελ.33
4.2 Παράγοντες που επιδρούν στην εκδήλωση πρωτεϊνικού θολώματος	Σελ.36
4.2.1 pH	Σελ.37
4.2.2 Πολυσακχαρίτες	Σελ.37
4.2.3 Ιοντική Ισχύς	Σελ.38
4.2.4 Πολυφαινόλες	Σελ.39

4.2.5 Φυσικό περιβάλλον και κλιματολογικές συνθήκες	Σελ.40
4.2.6 Τρόπος συγκομιδής	Σελ.40
4.2.7 Θερμοκρασία θέρμανσης και ψύξης (Heating and cooling times)	Σελ.41
4.2.8 Επίδραση θειώδους	Σελ.42
5. Μέθοδοι Ελέγχου Πρωτεϊνικής Σταθερότητας	Σελ.43
5.1 Test Θέρμανσης	Σελ.43
5.2 Test Τριγλωρικού οξέος (TCA test)	Σελ.44
5.3 Test Ταννίνης	Σελ.45
5.4 Bentotest	Σελ.45
5.5 Test Αιθανόλης	Σελ.46
5.6 Η μέθοδος N.I.R. – Φασματοσκοπική Μέθοδος	Σελ.46
6. Κατεργασίες Διαύγασης – Μέθοδοι Αντιμετώπισης και Πρόληψης Πρωτεϊνικού Θολώματος	Σελ.47
6.1 Μπεντονίτης ($Al_2O_3 \cdot 4SiO_2 \cdot nH_2O$)	Σελ.51
6.1.1 Βελτίωση της κλασικής μεθόδου σταθεροποίησης με μπεντονίτη	Σελ.52
6.1.2 Ικανότητα αποπρωτεϊνοποίησης	Σελ.52
6.2 Αφαίρεση πρωτεϊνών με υπερδιήθηση	Σελ.54
6.3 Θερμική Σταθεροποίηση (Thermal Stability)	Σελ.55
6.3.1 Σταθεροποίηση των πρωτεϊνών	Σελ.55
6.3.2 Σταθεροποίηση τρυγικού	Σελ.55
6.3.3 Μικροβιακή σταθεροποίηση	Σελ.56
6.4 Υγρή χρωματογραφία - HPLC	Σελ.56
6.5 Χρήση σπόρων σταφυλιού (GSP) για τη μείωση του σχηματισμού θολερότητας στα λευκά κρασιά	Σελ.57
6.6 Μαγνητικός διαχωρισμός	Σελ.60
6.7 Αποικοδόμηση πρωτεϊνών με ένζυμα	Σελ.61
6.8 Προσθήκη πολυσακχαριτών	Σελ.65
6.9 Ζεόλιθοι (Zeolites)	Σελ.66
6.10 Διοξείδιο του ζirkονίου- ZrO_2	Σελ.69
6.11 Μαννοπρωτεΐνες	Σελ.70
6.12 Καραγενάνη	Σελ.71
6.13 Χιτίνη και Χιτοζάνη	Σελ.76
7. Συμπεράσματα - Συζήτηση	Σελ.81
8. Βιβλιογραφία	Σελ.82

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1: Κατηγοριοποίηση πρωτεϊνών PR	Σελ.12
Πίνακας 2: Πρωτεϊνική συγκέντρωση γλευκών από διαφορετικές ποικιλίες	Σελ.17
Πίνακας 3: Γενικές ιδιότητες χιτινασών και TLPs	Σελ.34
Πίνακας 4: Συνθήκες Test θέρμανσης που συνιστώνται για θέρμανση και ψύξη	Σελ.44
Πίνακας 5: Χρονομέτρηση [πριν την ζύμωση (BF), κατά τη διάρκεια (DF) και μετά τη ζύμωση (AF)], συνθήκες λειτουργίας και μείωση πρωτεϊνών με νέες μεθόδους σταθεροποίησης πρωτεϊνών χωρίς πρόσθετα	Σελ.48
Πίνακας 6: Επίδραση των επεξεργασιών με καραγενάνη και μπεντονίτη στις χημικές παραμέτρους του εμφιαλωμένου οίνου	Σελ.74
Πίνακας 7: Τεχνολογίες σταθεροποίησης πρωτεϊνών: Κόστος, φιλικότητα προς το περιβάλλον, βιομηχανική εφαρμογή, ποιότητα οίνου και χρόνος διάθεσης στην αγορά	Σελ.79

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1. Δομή αμινοξέος	Σελ.4
Εικόνα 2. Επίπεδα οργάνωσης πρωτεϊνικής δομής	Σελ.5
Εικόνα 3. Διαμορφώσεις πολυπεπτιδικής αλυσίδας που εμφανίζονται σε πρωτεΐνες: α) α-έλικα, β) β-φύλλα	Σελ.6
Εικόνα 4. Με την μετουσίωση των πρωτεϊνών προκαλείται η ξεδίπλωση τους, μη αντιστρεπτά, χάνοντας το αρχικό τους σχήμα και την βιολογική τους δράση	Σελ.7
Εικόνα 5. Το σύμπλοκο της πρωτεΐνης με τη χρωστική Coomassie Brilliant blue	Σελ.24
Εικόνα 6. Η συσκευή που χρησιμοποιείται στη μέθοδο Dumas αποτελείται από γεννήτρια CO ₂ , σωλήνα καύσης, νιτρόμετρο Schiff's	Σελ.27
Εικόνα 7. Παράδειγμα ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE σε δείγματα οίνου Chardonnay (CHA) και Sauvignon Blanc (SAB), όπου με βάση το μοριακό βάρος διακρίνονται οι πρωτεΐνες που περιέχουν	Σελ.28
Εικόνα 8. Απεικόνιση συστήματος HPLC	Σελ.30
Εικόνα 9. Δείγμα ροής γρήγορης πρωτεΐνης υγρής χρωματογραφίας. Μια διαδρομή ροής δείγματος που απεικονίζει τα στοιχεία του συστήματος χρωματογραφίας μέσης πίεσης NGC	Σελ.31
Εικόνα 10. Σχηματισμός πρωτεϊνικού ιζήματος μετά την παραμονή στην φιάλη κατά την αποθήκευση	Σελ.33
Εικόνα 11. Μοριακή απεικόνιση της επιφάνειας της πρωτεΐνης VVTL1	Σελ.35
Εικόνα 12. Σχηματική αναπαράσταση δημιουργίας πρωτεϊνικού θολώματος στους λευκούς οίνους	Σελ.36
Εικόνα 13. Αλλαγή στην συγκέντρωση της πρωτεΐνης των πειραματικών οίνων που έχουν υποστεί επεξεργασία με διαφορετικούς μπεντονίτες, ανάλογα με την προστιθέμενη δόση.	Σελ.53
Εικόνα 14. Παρασκευή σπόρων σταφυλιού σε ακατέργαστη (α) και καβουρδισμένη σκόνη (β). Διεργασίες σταθεροποίησης πρωτεϊνών παρτίδας σε διαφορετικές συνθήκες λειτουργίας πριν και μετά τη ζύμωση (μη διαυγασμένοι χυμοί σταφυλιών και ακατέργαστοι λευκοί οίνοι) χρησιμοποιώντας ακατέργαστη και καβουρδισμένη σκόνη σπόρων σταφυλιού	Σελ.57-58
Εικόνα 15. Οίνοι περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη PR [TLP (λευκό) + χιτινάσες (γκρι)] επεξεργασμένοι με σκόνη σπόρων σταφυλιού (GSP) (χαμηλή και υψηλή δόση), επεξεργασμένοι με μπεντονίτη και μη επεξεργασμένο μάρτυρα. α) Sauvignon Blanc (SAB), β) Semillon (SEM). Οι ποσοστιαίες τιμές αντιπροσωπεύουν τη μείωση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης PR στα επεξεργασμένα κρασιά σε σύγκριση με τους οίνους ελέγχου. Οι τιμές της θαυματίνης και των χιτινασών εκφράζονται σε mg/L ισοδύναμα θαυματίνης και παρουσιάζονται ως μέσος όρος και τυπική απόκλιση πειραμάτων εις τριπλούν. γ) Σταθερότητα δοκιμής θερμότητας για Sauvignon blanc (SAB).	Σελ.59

d) Θερμική σταθερότητα δοκιμής για Semillon (SEM) επεξεργασμένο με σκόνη σπόρων σταφυλιού (χαμηλή και υψηλή δόση), κατεργασμένο με μπεντονίτη και μη επεξεργασμένο μάρτυρα. Τα κρασιά θεωρούνται σταθερά όταν $\Delta NTU < 2$.

Εικόνα 16. Δυναμικό σχηματισμού θολώματος (ΔNTU Index) οίνων πριν και μετά από ενζυματική θεραπεία σε αντιδραστήρα συσκευασμένης κλίνης που περιέχει ακινητοποιημένη βρωμελίνη (PBR-br) ή ακινητοποιημένη παπαΐνη (PBR-pa), με την ανάλογη απόδοση αφαίρεσης θολερότητας (ποσοστό της θολότητας που αφαιρείται από τον επεξεργασμένο οίνο). Οι αναφερόμενες τιμές είναι μέσες τιμές διαστήματος εμπιστοσύνης $\pm 95\%$ και αντιστοιχούν σε εις τριπλούν ανάλυση Σελ.63

Εικόνα 17. Συνολική περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη (mg/L) των οίνων πριν και μετά την ενζυμική επεξεργασία σε αντιδραστήρα συσκευασμένης κλίνης που περιέχει ακινητοποιημένη βρωμελίνη (PBR-br) ή ακινητοποιημένη παπαΐνη (PBR-pa), με την αντίστοιχη απόδοση αφαίρεσης πρωτεΐνης (ποσοστό των πρωτεϊνών που αφαιρέθηκαν από τον κατεργασμένο οίνο) Σελ.64

Εικόνα 18. Θερμική επεξεργασία στους $75\text{ }^\circ\text{C}$ για 2 λεπτά μαζί με προσθήκη ενζύμων AGP. (β) Επεξεργασία υπερδιήθησης (UF) και επεξεργασίες ελέγχου με κρασί, θερμότητα και θερμότητα + AGP. Σελ.65

Εικόνα 19. Εικόνα του ζεόλιθου, ενός φυσικού, αδρανούς, αργιλοπυριτικού πετρώματος. Σελ.66

Εικόνα 20. Σχηματικό διάγραμμα πιθανού μηχανισμού προσρόφησης της πρωτεΐνης που προκαλεί θολότητα σε φυσικό ζεόλιθο, μέσω ανταλλαγής των θετικών ιόντων Na^+ , K^+ , Ca^{2+} που συγκρατεί ο ζεόλιθος με το θετικό φορτίο της πρωτεΐνης Σελ.67

Εικόνα 21. Τα χρωματογραφήματα HPLC των 3 δειγμάτων οίνων Sauvignon Blanc (SAB), Semillon (SEM) και Chardonnay (CHA) πριν και μετά την κατεργασία με φυσικό ζεόλιθο Σελ.68

Εικόνα 22. Δομές της κ-, λ- και ι-καραγενάνης Σελ.72

Εικόνα 23. Διαύγαση ασταθούς οίνου με προσθήκη καραγενάνης Σελ.73

Εικόνα 24. Χημικές δομές χιτίνης και ΚΤ. Τα κυκλωμένα τμήματα τονίζουν αυτά που μπορεί να συμβάλλουν στην αντιδραστικότητα και τη φυσικοχημική συμπεριφορά του ΚΤ. Σελ.76

Εικόνα 25. Μηχανισμοί διαύγασης με χιτοζάνη (ΚΤ) σε χυμούς και κρασιά. Α: Ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση πρωτεϊνών με πηκτίνες. Β: Ενεργή δέσμευση θέσης με χιτινάση Σελ.78

Συντμήσεις, ακρωνύμια, σύμβολα και ορισμοί

PR Proteins	Pathogenesis Related Proteins
TLP	Thaumatococcus like Proteins
LTP	Lipid-transfer Proteins
BSA	Bovine Serum Albumin
TCA	Τριγλυκοξικό οξύ
BF	Before Fermentation
DF	During Fermentation
AF	After Fermentation
GSP	Grape Seeds Powder
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
XDR	Περίθλαση Ακτίνων Χ
KT	Χιτοζάνη
TTM	Time to Market (το συνολικό χρονικό διάστημα που χρειάζεται για να φέρει ένα προϊόν από τη σύλληψη έως τη διαθεσιμότητα στην αγορά)
GlcNAc	N-acetyl β-D-glucosamine

1. Εισαγωγή και Σκοπός της Εργασίας

Κατά τα τελικά στάδια της οινοποιητικής διαδικασίας, το πρόβλημα της πρωτεϊνικής αστάθειας, ιδίως στους λευκούς οίνους, είναι ένα από τα σημαντικότερα που καλούνται να αντιμετωπίσουν οι οινοποιοί. Οι πρωτεΐνες που είτε προέρχονται από το ίδιο το σταφύλι, είτε άμεσα ή έμμεσα από την παρουσία των ζυμών (ενδογενείς πρωτεΐνες), είτε έχουν προστεθεί μετέπειτα στο γλεύκος ή στον οίνο ως υλικά κατεργασίας (εξωγενείς πρωτεΐνες), συμβάλλουν στην θολερότητα των εμφιαλωμένων οίνων. Οι λευκοί οίνοι, λόγω της ζύμωσης που υπόκεινται απουσίας φλοιών και γιγάρτων, του λιγότερο έντονου χρωματισμού τους, καθώς και των χαμηλότερων θερμοκρασιών στις οποίες ενδείκνυται να αποθηκεύονται μετά την εμφιάλωση, είναι περισσότερο επιρρεπείς στην εμφάνιση πρωτεϊνικού θολώματος. Παρόλο που τα πρωτεϊνικά θολώματα δεν είναι επιζήμια για την υγεία του καταναλωτή, καθώς είναι άοσμα και χωρίς γεύση, αποτελούν σοβαρό οπτικό ελάττωμα, το οποίο ο οινοπαραγωγός οφείλει να το προλαμβάνει πριν την εμφιάλωση ώστε να αποφύγει την επακόλουθη οικονομική καταστροφή. Αυτό επιλύεται με κατάλληλη διαύγαση του οίνου με την χρήση διαυγαστικών μέσων, έτσι ώστε να απομακρυνθούν αποτελεσματικά τα σωματίδια εκείνα που είναι υπεύθυνα για το προαναφερόμενο, όπως και για πολλών άλλων ειδών, θολώματα.

Το πιο διαδεδομένο μέσο διαύγασης είναι ο μπεντονίτης, ο οποίος χρησιμοποιείται τόσο σε βιομηχανική όσο και σε εργαστηριακή κλίμακα. Ωστόσο, η διαδικασία της διαύγασης των οίνων, γνωστή και ως κολλάρισμα, με την χρήση του προαναφερόμενου μέσου, απομακρύνει εκτός από τα περισσότερα ελαττώματα και αρκετές επιθυμητές ενώσεις που συμβάλλουν θετικά στο αρωματικό προφίλ του παραγόμενου οίνου. Προς επίλυση του φαινομένου αυτού, οι ερευνητικές μελέτες αποσκοπούν είτε στη μείωση της ποσότητας του απαιτούμενου μπεντονίτη, είτε στην εξ'ολοκλήρου εξάλειψη αυτού από την οινοποιητική διαδικασία. Ως εκ τούτου, οι μέθοδοι προσδιορισμού των πρωτεϊνών στον οίνο τελειοποιούνται συνεχώς τα τελευταία χρόνια ώστε πρώτον να ρυθμιστεί η κατάλληλη ποσότητα του προστιθέμενου μέσου διαύγασης προκειμένου να επιτευχθεί η ισορροπία ανάμεσα στην διαύγεια και στην ποιότητα, όπως αυτή γίνεται άμεσα αντιληπτή από το καταναλωτικό κοινό. Για την εξάλειψή του εν λόγω διαυγαστικού, διεξάγονται έρευνες που προτείνουν τη χρήση εναλλακτικών κατεργασιών και μέσων που δεν τον περιλαμβάνουν. Οι μελέτες που παραθέτονται στη συγκεκριμένη εργασία εστιάζουν στην εφαρμογή εναλλακτικών μέσων κολλαρίσματος ή και κατεργασιών, συμβάλλοντας στην

βελτιστοποίηση οικονομικά, περιβαλλοντικά, τεχνολογικά και ποιοτικά βιώσιμων μέσων αντιμετώπισης του πρωτεϊνικού θολώματος. Ακόμα, αποσαφηνίζονται οι παράγοντες οι οποίοι, αξιοποιούμενοι ορθά, μειώνουν τη χρήση των παραδοσιακών μέσων διαύγασης και κατ' επέκταση το αρνητικό τους αντίκτυπο στην ποιότητα του οίνου. Κατά αυτόν τον τρόπο, η βιομηχανία του οίνου μπορεί να επωφεληθεί από την υιοθέτηση των καινοτόμων αυτών μεθόδων, προσφέροντας εφόδια τόσο σε νέους οινοπαραγωγούς που επιθυμούν να διευρύνουν τους οινικούς ορίζοντες των ίδιων αλλά και των καταναλωτών, όσο και σε επαγγελματίες του κλάδου, εμπλουτίζοντας την υπάρχουσα τεχνογνωσία τους.

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία, γίνεται μία βιβλιογραφική ανασκόπηση πάνω στο ζήτημα της πρωτεϊνικής αστάθειας των οίνων: ποιες είναι οι πρωτεΐνες υπεύθυνες για τη δημιουργία θολωμάτων, ποιοι παράγοντες επηρεάζουν το πρωτεϊνικό θόλωμα και ποιοι τρόποι αντιμετώπισης ακολουθούνται, βάσει βιβλιογραφίας και ερευνητικών δεδομένων των τελευταίων ετών.

2. Πρωτεΐνες – Γενικά Στοιχεία

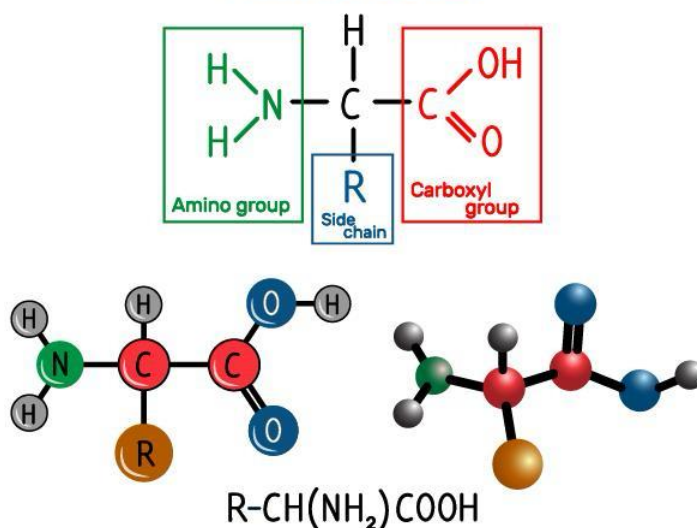
Σε μοριακό επίπεδο, οι πρωτεΐνες είναι μακρομόρια που σχηματίζονται από την ένωση των μονομερών τους, των αμινοξέων και συμμετέχουν σχεδόν σε όλες τις βιοχημικές αντιδράσεις. Αποτελούν την μία εκ των τριών θεμελιωδών κατηγοριών μακρομορίων στο γλεύκος και στους λευκούς οίνους, μαζί με τους πολυσακχαρίτες και τις φαινολικές ενώσεις. Η ένωση πολλών αμινοξέων δημιουργεί πεπτίδια και η ένωση αυτών σε αλυσίδες δημιουργεί πρωτεΐνες. Όσον αφορά το φορτίο τους, στο pH του οίνου οι πρωτεΐνες έχουν θετικό φορτίο. ([E. J. Waters et al., 2005](#))

2.1 Αμινοξέα

Δομική μονάδα των πρωτεϊνών αποτελούν τα αμινοξέα, τα οποία εξ ορισμού είναι ενώσεις οι οποίες έχουν μια αμινομάδα ($-NH_2$) και μια καρβοξυλομάδα ($-COOH$) τουλάχιστον, στην ίδια ανθρακική αλυσίδα.

Είναι ενώσεις διαλυτές στο νερό και μπορούν να συμπεριφερθούν είτε ως οξέα είτε ως βάσεις. Το μοριακό τους βάρος είναι μικρότερο των 200 Da ([Huang and Ough, 1989](#); [Soufleros et al., 2003](#)). Σημαντική κατηγορία αμινοξέων είναι τα πρωτεϊνικά αμινοξέα τα οποία συνιστούν τους δομικούς λίθους των πεπτιδίων και των πρωτεϊνών. Η αλανίνη (2-αμινο-προπιονικό οξύ) θεωρείται μητρική ένωση όλων των αμινοξέων καθώς ακόμη η λευκίνη και η ισολευκίνη είναι παράγωγά της. Εμβαθύνοντας περισσότερο στο κομμάτι του οίνου, τόσο κατά την διάρκεια ανάπτυξης της σταφυλής όσο και κατά την διαδικασία της παραγωγής του, παρατηρείται αρχικά ότι η συγκέντρωση των αμινοξέων στο γλεύκος επηρεάζεται και μεταβάλλεται κάθε χρονιά λόγω κλιματολογικών αλλαγών αλλά και λόγω του προγράμματος λίπανσης. Στο στάδιο της πλήρης ωρίμανσης παρατηρείται χαρακτηριστική αύξηση στην συγκέντρωση των αμινοξέων. Παράγοντες που επηρεάζουν την συγκέντρωση των αμινοξέων στο κρασί είναι επίσης η θερμοκρασία της ζύμωσης, η συμπαραμονή γλεύκους και στεμφύλων, η οξύτητα του γλεύκους καθώς και διαφοροποιημένες τεχνικές οινοποίησης ([Soufleros et al. 2003](#)).

Amino acids



Εικόνα 1. Δομή αμινοξέος

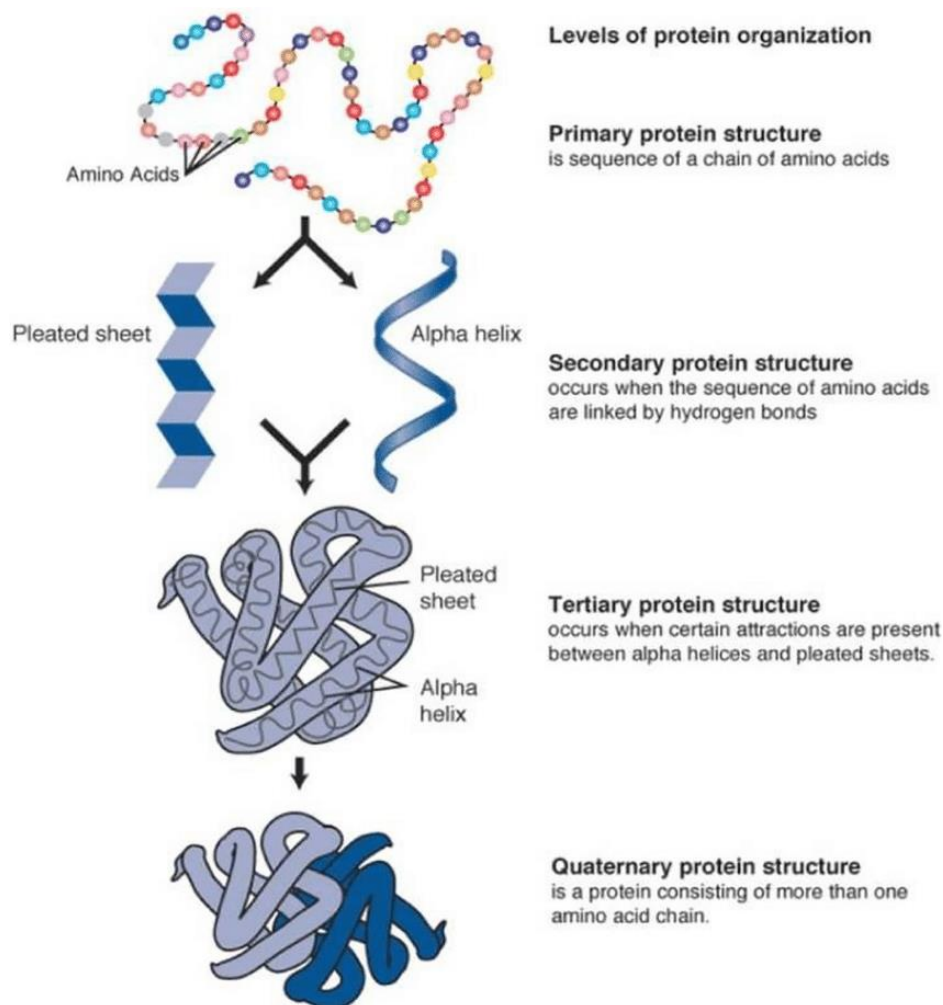
<https://www.creative-proteomics.com/resource/protein-amino-acid-analysis-techniques-instruments-and-applications.htm>

Στη φύση υπάρχουν πολυάριθμα αμινοξέα, περίπου 200 στο σύνολο, τα πιο σημαντικά που μέχρι και σήμερα έχουν εντοπιστεί στον οίνο είναι 34, εκ των οποίων τα 20 από αυτά αποτελούν το 20-30% του ολικού αζώτου στο γλεύκος (Poux and Ournac, 1970). Στον οίνο, τα δυο αμινοξέα τα οποία βρίσκονται σε υπέρμετρη ποσότητα είναι η αργινίνη και η προλίνη.

Οι διαφορές ανάμεσα στις πρωτεΐνες οφείλονται στον διαφορετικό τύπο, αριθμό και αλληλουχία των μονομερών αμινοξέων των πεπτιδίων που τις αποτελούν (Mihaljev et al., 2015).

2.2 Δομή των Πρωτεϊνών

Οι βιολόγοι διακρίνουν τέσσερα επίπεδα οργάνωσης στη δομή μιας πρωτεΐνης: την πρωτοταγή, δευτεροταγή, τριτοταγή και τεταρτοταγή δομή.



Εικόνα 2. Επίπεδα οργάνωσης πρωτεϊνικής δομής ([Sana Akbar et al., 2021](#))

Η αλληλουχία των αμινοξέων είναι γνωστή ως πρωτοταγής δομή της πρωτεΐνης, εκφράζει δηλαδή από ποια αμινοξέα αποτελείται μία πρωτεΐνη και με ποια σειρά αυτά συνδέονται μεταξύ τους με πεπτιδικούς δεσμούς ([Alberts et al., 2002](#)). Στη συνέχεια, ο πολυπεπτιδικός κορμός μιας πρωτεΐνης μπορεί να αποκτήσει διάφορες δομές, λόγω δημιουργίας δεσμών υδρογόνου μεταξύ των ομάδων NH και CO του κύριου κορμού. Έτσι, η διαμόρφωση που μπορεί να εμφανίσει μια πολυπεπτιδική αλυσίδα μπορεί να είναι είτε α-έλικας είτε β-φύλλου.

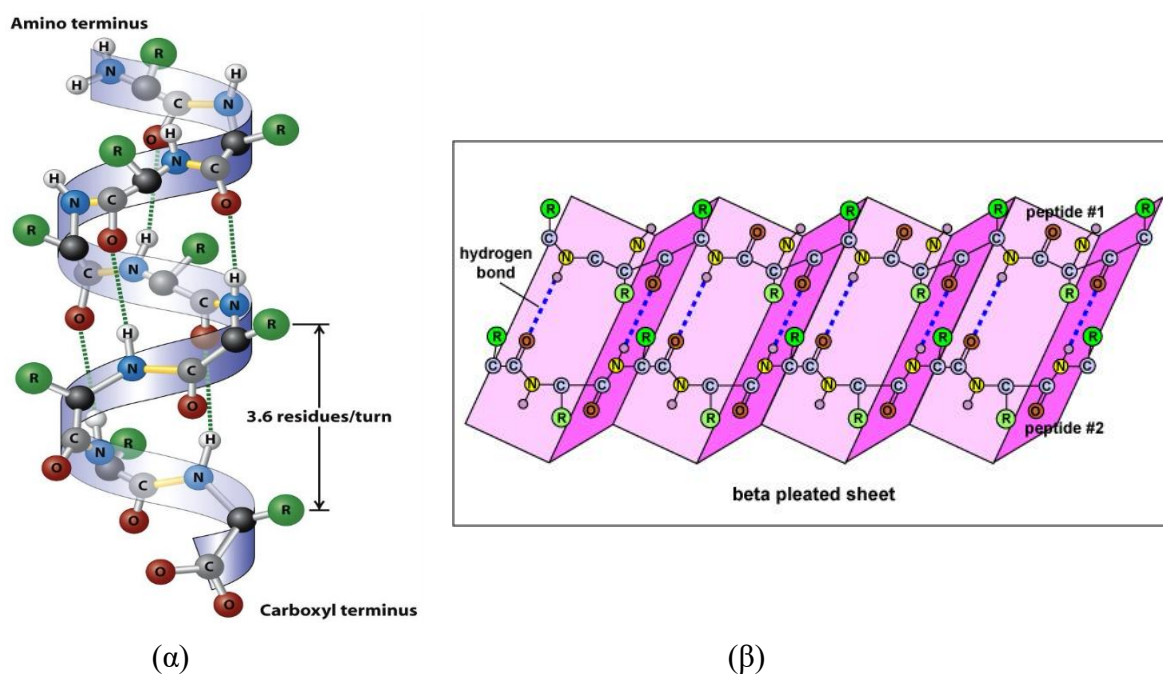
α-έλικα

Μια α έλικα δημιουργείται όταν μια μονή πολυπεπτιδική αλυσίδα περιστρέφεται γύρω από τον εαυτό της για να σχηματίσει έναν άκαμπτο κύλινδρο με ελικοειδή διαμόρφωση. Ένας δεσμός υδρογόνου δημιουργείται μεταξύ κάθε τέταρτου πεπτιδικού δεσμού, συνδέοντας το C=O ενός πεπτιδικού δεσμού με το N-H ενός άλλου [Εικόνα 3 α)].

Αυτό δημιουργεί μια κανονική έλικα με μια πλήρη περιστροφή για κάθε 3,6 αμινοξέα ([Alberts et al., 2002](#)).

β-φύλλα

Ο πυρήνας πολλών πρωτεϊνών περιέχει εκτεταμένες περιοχές β φύλλων. Τα β φύλλα μπορούν να σχηματιστούν είτε από γειτονικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες που έχουν τον ίδιο προσανατολισμό (παράλληλες αλυσίδες) είτε από μια πολυπεπτιδική αλυσίδα που διπλώνει εμπρός και πίσω πάνω στον εαυτό της, με κάθε τμήμα της αλυσίδας να έχει κατεύθυνση αντίθετη από αυτή των άμεσων γειτόνων του (αντιπαράλληλες αλυσίδες) [Εικόνα 3 β)]. Και οι δύο τύποι φύλλων β παράγουν μια πολύ άκαμπτη δομή, που συγκρατείται από δεσμούς υδρογόνου που συνδέουν τους πεπτιδικούς δεσμούς μεταξύ γειτονικών αλυσίδων ([Alberts et al., 2002](#)).



Εικόνα 3. Διαμορφώσεις πολυπεπτιδικής αλυσίδας που εμφανίζονται σε πρωτεΐνες: α) α-έλικα, β) β-φύλλα

Έπειτα, δυνάμεις αναπτύσσονται και μεταξύ των πλευρικών ομάδων των αμινοξέων της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Μερικά από τα μονομερή αμινοξέα έχουν υδρόφοβες μη πολικές πλευρικές ομάδες, ενώ άλλα έχουν υδρόφιλες πολικές και φορτισμένες πλευρικές ομάδες κατά μήκος της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Οι υδρόφοβες πλευρικές ομάδες αμινοξέων αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με δυνάμεις Van der Waals στο εσωτερικό της

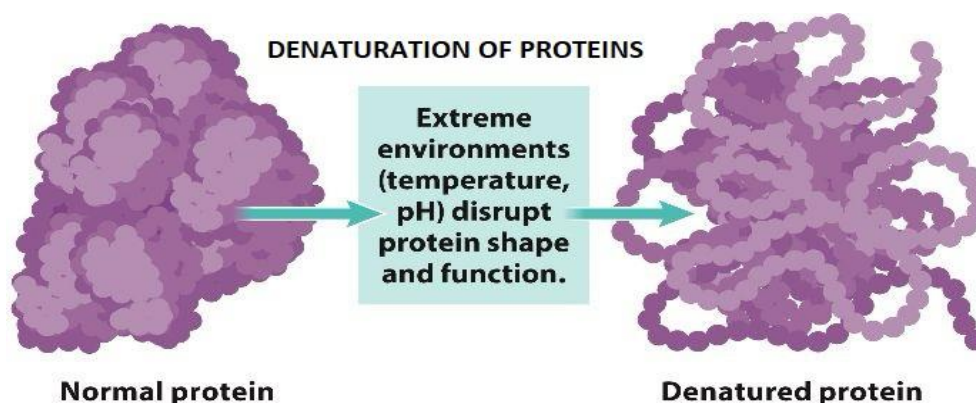
δομής, αποφεύγοντας να έρθουν σε επαφή με το νερό που προϋπάρχει στο περιβάλλον του κυττάρου, δημιουργώντας μια πιο συμπυκνωμένη, νέα δομή. Σε περίπτωση υδρόφιλης ομάδας, οι πλευρικές ομάδες των αμινοξέων ενώνονται μέσω δεσμών υδρογόνου στο εξωτερικό του μορίου, δίνοντας διαφορετική διάταξη αυτού στο χώρο (J.E. Murray et al., 2017). Οι παραπάνω περιπτώσεις, που περιγράφουν την δομή που αποκτά τελικά μια πρωτεΐνη στον χώρο λόγω διαφόρων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πολυπεπτιδικών αλυσίδων, αποτελούν την τριτοταγή δομή των πρωτεϊνών.

Στις περιπτώσεις που ένα συγκεκριμένο μόριο πρωτεΐνης σχηματίζεται ως σύμπλεγμα περισσότερων από μία πολυπεπτιδικών αλυσίδων, η πλήρης δομή που χαρακτηρίζει και τη χωροδιάταξη αυτών των αλυσίδων ορίζεται ως τεταρτοταγής δομή (Alberts B et al., 2002).

2.3 Μετουσίωση Πρωτεϊνών

Οι περισσότερες πρωτεΐνες, στη φυσική τους κατάσταση διπλώνονται σε σαφώς καθορισμένες, συνήθως άκαμπτες, τρισδιάστατες δομές. Για τις περισσότερες πρωτεΐνες, αυτή η δομή είναι συμπαγής και σφαιρική. Σε λίγες πρωτεΐνες η έμφυτη δομή είναι ράβδος ή μπορεί να αποτελείται από ένα μείγμα ραβδόμορφων και σφαιρικών τμημάτων. Η μυοσίνη είναι ένα παράδειγμα της τελευταίας περίπτωσης.

Ο ορισμός της «μετουσίωσης» γενικά ορίζεται ως μια σημαντική αλλαγή από την αρχική φυσική δομή, χωρίς αλλοίωση της αλληλουχίας των αμινοξέων, δηλαδή, χωρίς αποκοπή κανενός από τους πρωτεύοντες χημικούς δεσμούς που ενώνουν το ένα αμινοξύ με το άλλο στο επίπεδο της πρωτοταγούς δομής. Εκτός από χημικές ουσίες που προκαλούν μετουσίωση, η αναδίπλωση ή το ξεδίπλωμα της πρωτεΐνης μπορεί επίσης να ξεκινήσει με τη μεταβολή του pH.



Εικόνα 4. Με την μετουσίωση των πρωτεϊνών προκαλείται η ξεδίπλωσή τους, μη αντιστρεπτά, χάνοντας το αρχικό τους σχήμα και την βιολογική τους δράση (Alvar 2022).

Ένα από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα θερμοδυναμικά μοντέλα για τις επιδράσεις του pH στις πρωτεΐνες δημιουργήθηκε από τον Tanford και τους συνεργάτες του, οι οποίοι έδειξαν ότι από τη γνώση των τιμών pKa των τιτλοδοτούμενων ομάδων είναι δυνατό να προβλεφθεί η αλλαγή στη σταθερότητα της πρωτεϊνικής φυσικής κατάστασης ως συνάρτηση του pH ([O'Brien et al., 2012](#)).

Ωστόσο δεν είναι ασφαλές το συμπέρασμα ότι οι πρωτεΐνες είναι λειτουργικές μόνο όταν είναι σταθερές ως προς τη δομή. Είναι σύνηθες πολλές θεωρητικές και πειραματικές εργασίες να επανασχεδιάζουν πρωτεΐνες για να ενισχύσουν τη σταθερότητά τους.

Άλλες έρευνες έχουν δείξει ξεκάθαρα ότι το βέλτιστο pH δραστηριότητας συνδέεται με τη σταθερότητα. Η δήλωσή των Kemper Talley and Emil Alexov είναι ότι: εάν δοθεί μια πρωτεΐνη με φυσική (άγριου τύπου) αλληλουχία και πτυχή, το βέλτιστο pH της δραστηριότητας και της σταθερότητας πιθανότατα θα είναι το ίδιο. Η σταθερότητα μετράται σε φυσικές συνθήκες όπως η φυσιολογική συγκέντρωση άλατος, η θερμοκρασία και ο διαλύτης ([Kemper Talley and Emil Alexov, June 2010](#)).

3. Πρωτεΐνες Οίνου

Η προέλευση των πρωτεϊνών στον οίνο, είναι κυρίως από τις ράγες του σταφυλιού και κάποιες προέρχονται από ζυμομύκητες και βακτήρια. Η φύση και η περιεκτικότητα των πρωτεϊνών στους οίνους φαίνεται να εξαρτάται αρχικά από την ποσότητα τους στο αρχικό γλεύκος, την ποικιλία, τις περιβαλλοντικές συνθήκες, και στη συνέχεια, από τις συνθήκες οινοποίησης. Στο αμπέλι η σύνθεση των πρωτεϊνών ξεκινά αμέσως μετά τον περκασμό και βαίνει παράλληλη πορεία συσσώρευσης όπως εκείνης των σακχάρων στη ράγα. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών αυξάνεται, με την αύξηση της ωριμότητας της ράγας. Οι πρωτεΐνες του οίνου αποτελούνται από πρωτεΐνες σταφυλιού *Vitis vinifera* και, σε χαμηλότερα επίπεδα, από πρωτεΐνες από την αυτόλυση του *Saccharomyces cerevisiae* ([Fernada Cosme et al., 2020](#)), καθώς μια μεγάλη ποικιλία πρωτεϊνών εκκρίνεται από τις ζύμες, ο αριθμός των οποίων διαφέρει ανάλογα με το είδος του ζυμομύκητα. Η προέλευση των πρωτεϊνών αυτών αφορά την δομή του κυτταρικού τοιχώματος του ζυμομύκητα.

Επί του παρόντος, η έρευνα για την επίδραση των ζυμών στην ποιότητα του οίνου επικεντρώνεται κυρίως στην ανάλυση των μεταβολιτών των ζυμών όπως η γλυκερίνη, η αιθανόλη και το οξικό οξύ και στο άρωμα του οίνου.

Στον αντίποδα, οι Ferreira et al. χρησιμοποίησαν σύγχρονες τεχνικές για να επιβεβαιώσουν ότι οι πρωτεΐνες του οίνου προέρχονται κυρίως από τον πολτό του σταφυλιού.

Επιπλέον, ορισμένες μελέτες διαπίστωσαν ότι η σύνθεση και η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες στα φρούτα του σταφυλιού θα άλλαζε σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης. Για παράδειγμα, οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι οι τύποι των διαλυτών πρωτεϊνών σε χυμούς σταφυλιών και οίνων, δύο ποικιλιών «Riesling» και «Gewürztraminer» αυξήθηκαν με την αύξηση της ωριμότητας των σταφυλιών. Προκειμένου να επαληθευτεί περαιτέρω αυτό το επιχείρημα, οι Tian et al. χρησιμοποίησαν μεθόδους για να αναλύσουν τους διαφορετικούς τύπους πρωτεϊνών στους σπόρους του σταφυλιού σε τρία διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι κατά τη συγκομιδή, οι πιο άφθονες πρωτεΐνες ήταν αυτές που εμπλέκονται στον αμυντικό μηχανισμό των φρούτων. Οι περισσότερες από αυτές τις πρωτεΐνες εκφράστηκαν σε μεγάλες ποσότητες όταν τα φρούτα ήταν πλήρως ώριμα ([Liu et al., 2023](#)).

3.1 Πρωτεΐνες που σχετίζονται με την πρωτεϊνική αστάθεια

Οι οίνοι περιέχουν ποικίλες ποσότητες διαφορετικών αζωτούχων ουσιών, μεταξύ των οποίων είναι και οι πρωτεΐνες. Τα πολυμερή αυτά, δεν συμβάλλουν σημαντικά στη θρεπτική αξία των οίνων καθώς η συγκέντρωσή τους τυπικά κυμαίνεται από 20-250 mg/L και 30-275 mg/L σε γλεύκη και λευκούς οίνους αντίστοιχα (Waterhouse, Sacks and Jeffery, *Understanding Wine Chemistry*, Wiley, 2022). Ωστόσο, είναι γνωστό ότι η παρουσία έστω και μιας μικρής ποσότητας υπολείμματος ασταθούς πρωτεΐνης, θα προκαλέσει μεγάλη ανησυχία στους οινοποιούς. Οι πρωτεΐνες δεν επηρεάζουν τη γεύση του οίνου στις συγκεντρώσεις που βρίσκονται σε αυτόν, ωστόσο οι κύριες διαλυτές πρωτεΐνες και τα προϊόντα υδρόλυσής τους είναι θερμικά ασταθή και μπορούν να μετουσιωθούν, με αποτέλεσμα την εμφάνιση θολωμάτων. Στους ερυθρούς οίνους οι πρωτεΐνες δεν έχουν μελετηθεί τόσο διεξοδικά όσο στους λευκούς, έχει όμως βρεθεί πως οι συγκεντρώσεις κυμαίνονται από 50 έως 100 mg/L. Η μικρότερη αυτή συγκέντρωση συγκριτικά με τους λευκούς οίνους, πιθανόν να οφείλεται στη δέσμευση των πρωτεϊνών από τις ταννίνες κατά τη διάρκεια της οινοποίησης (Waterhouse et al., 2022).

Όσον αφορά την επίδραση των ζυμών σε αυτές, μπορούν να επηρεάσουν την συγκέντρωση και τη σύνθεση πρωτεϊνών με τους εξής τρόπους: είτε μέσω εξωκυτταρικών ενζύμων (πρωτεάσες) που έχουν την ικανότητα να υδρολύουν τις πρωτεΐνες του μούστου, είτε μέσω της αυτόλυσης των ζυμών, διαδικασία που συνεπάγεται την μεταφορά πρωτεϊνών στον οίνο (μαννοπρωτεΐνες). Επίσης, οι πρωτεΐνες που απαντώνται στους οίνους δεν αντιστοιχούν με τις πρωτεΐνες της ράγας, λόγω της πρωτεόλυσης αυτών και του υπερκορεσμού με την επίδραση του χαμηλού pH.

Ο οίνος περιέχει πολλές διαφορετικές πρωτεΐνες, οι οποίες έχουν κατηγοριοποιηθεί σε συγκεκριμένες ομάδες πρωτεϊνών. Ωστόσο, δεν έχει ακόμα διασαφηνιστεί ο τρόπος με τον οποίο οι διαφορετικές κατηγορίες αυτών σχετίζονται με προβλήματα αστάθειας. Σε σχετικές μελέτες έχει συσχετιστεί το εν λόγω φαινόμενο με το μοριακό βάρος και τις ιοντικές ιδιότητες των πρωτεϊνών (M.R. Sarmiento et al., 2000). Το μεγαλύτερο ποσοστό των πρωτεϊνών των οίνων που είναι υπεύθυνες για τον σχηματισμό πρωτεϊνικού θολώματος χαρακτηρίζονται από χαμηλό ισοηλεκτρικό σημείο καθώς και χαμηλό μοριακό βάρος (E. J. Waters et al., 2008).

Ισοηλεκτρικό σημείο (IEP ή pI) ενός αμινοξέος καλείται η τιμή του pH στην οποία το αμινοξύ εμφανίζεται ηλεκτρικά ουδέτερο και δεν μεταφέρεται υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Αυτή η τιμή είναι διαφορετική για κάθε αμινοξύ. Το ίδιο συμβαίνει και

στις πρωτεΐνες, οι οποίες παρουσιάζουν επίσης αμφολυτικό χαρακτήρα, λόγω των όξινων και βασικών ομάδων του μορίου τους. Όπως και τα αμινοξέα, όταν αυτές βρίσκονται σε διαλύματα με pH ίσο με το ισοηλεκτρικό τους σημείο παρουσιάζουν τη μικρότερη διαλυτότητα (Ε. Φ. Καραμπούλη, 1996).

Αναλυτικά, στη συνέχεια αναφέρονται οι βασικές κατηγορίες πρωτεϊνών που εμπλέκονται με την εμφάνιση θολωμάτων σε λευκούς οίνους ή και έχουν εντοπιστεί σε σημαντική συγκέντρωση σε αυτούς.

3.1.1 Πρωτεΐνες που σχετίζονται με την παθογένεση (Pathogenesis Related Proteins - PR Proteins)

Οι πρωτεΐνες που σχετίζονται με την παθογένεση στις σταφυλές (PR πρωτεΐνες) παρατηρήθηκαν πρώτη φορά στον καπνό ως απόκριση σε ιογενή μόλυνση (Kenneth F. Pockock et al., 2000). Ο όρος πρωτεΐνες PR ορίζεται για να υποδηλώνει «εκείνες τις πρωτεΐνες που δεν είναι ανιχνεύσιμες ή είναι μόνο σε βασικές συγκεντρώσεις ανιχνεύσιμες σε υγιείς ιστούς, αλλά για τις οποίες η συσσώρευση σε επίπεδο πρωτεΐνης έχει αποδειχθεί σε παθολογικές και σχετικές καταστάσεις σε τουλάχιστον δύο ή περισσότερους συνδυασμούς φυτοπαθογόνων». Ωστόσο, ο παραπάνω ορισμός προκάλεσε σύγχυση στο παρελθόν καθώς ο όρος πρωτεΐνες PR χρησιμοποιήθηκε συχνά για να προσδιορίσει όλες τις πρωτεΐνες που προκαλούνται από μικρόβια, συμπεριλαμβανομένων των ενζύμων όπως η λύαση της αμμωνίας της φαινυλαλανίνης που είναι συστατικά παρόντα στα φυτά αλλά επίσης αυξάνονται κατά τις περισσότερες λοιμώξεις. Αυτή η ομάδα πρωτεϊνών δεν προοριζόταν ποτέ να χαρακτηριστεί ως πρωτεΐνες PR, καθώς υπάρχουν πολυάριθμες ενζυματικές δραστηριότητες που αυξάνονται κατά την επίθεση παθογόνου και οι Van Loon et al. εισήγαγαν πρόσφατα τον όρο "επαγώγιμες πρωτεΐνες που σχετίζονται με την άμυνα" που αναφέρεται στον αρχικά προβλεπόμενο ορισμό των πρωτεϊνών PR. Οι πρωτεΐνες που σχετίζονται με την παθογένεση είναι απαραίτητες για την απόδοση των φυτών, παρέχοντας αντοχή σε ασθένειες καθώς και ανάπτυξη και καλή προσαρμογή σε δυσμενή περιβάλλοντα (Cosme et al., 2020). Παρόλο που ορισμένες από αυτές τις πρωτεΐνες PR εμφανίζουν *in vitro* αντιμικροβιακές δραστηριότητες και η συσσώρευσή τους στο φυτό σχετίζεται με τις αντιδράσεις ανθεκτικότητας των φυτών, ένας άμεσος λειτουργικός ρόλος στην άμυνα δεν θα μπορούσε να αποδειχθεί για όλες τις πρωτεΐνες που αντιστοιχούν στην εν λόγω κατηγορία (Jan Sels et al., 2008). Είναι θερμικά ασταθείς πρωτεΐνες. Μπορεί να έχουν παρεμφερείς ιδιότητες, αλλά ανάλογα με το ισοηλεκτρικό τους σημείο μπορεί να

λειτουργούν είτε ως οξέα είτε ως βάσεις. Οι περισσότερες όξινες πρωτεΐνες PR εκκρίνονται στους εξωκυτταρικούς χώρους, ενώ οι βασικές πρωτεΐνες PR βρίσκονται κυρίως στο κενοτόπιο των φυτικών κυττάρων, χωρίς να είναι ασφαλής η γενίκευση του παραπάνω εντοπισμού για όλες τις πρωτεΐνες PR. Η ξηρασία και το στρες στην αλατότητα έχουν εμπλακεί στην επαγωγή πρωτεΐνης PR σε άλλα φυτά, και αυτοί οι πιθανοί «επαγωγείς» γονιδίων πρωτεΐνης PR είναι σχετικοί με τις εμπορικές συνθήκες καλλιέργειας οινοποιήσιμων σταφυλιών. Στα φυτά καπνού, οι πρωτεΐνες που μοιάζουν με θαυματίνη συσσωρεύονται ως απόκριση στο στρες αλατότητας και εξαιτίας αυτού, οι πρωτεΐνες που μοιάζουν με θαυματίνη μερικές φορές ονομάζονται «οσμοτίνες». Ένα γονίδιο για μια πιθανή οσμοτίνη στο *V. vinifera L. Sultanina* έχει ταυτοποιηθεί και η έκφρασή του παρατηρήθηκε ανώριμα σταφύλια. Η συναγόμενη πρωτεϊνική αλληλουχία αυτού του γονιδίου έχει ομολογία με το VVTL1, την αλληλουχία γονιδίων που κωδικοποιεί μία από τις κύριες πρωτεΐνες που σχηματίζουν θολότητα στον οίνο. ([Kenneth F. Pocock et al., 2000](#)).

Με βάση τη μοριακή μάζα, το ισοηλεκτρικό σημείο, τον εντοπισμό και τη βιολογική δραστηριότητα, οι πρωτεΐνες PR έχουν κατηγοριοποιηθεί σε 17 οικογένειες και αριθμούνται με τη σειρά με την οποία ανακαλύφθηκαν ([Deepti Jain & Jitendra Paul Khurana, 2018](#)).

Πίνακας 1. Κατηγοριοποίηση πρωτεϊνών PR ([Deepti Jain & Jitendra Paul Khurana, 2018](#))

Οικογένειες	Ιδιότητες	Παράδειγμα
PR-1	Αντιμυκητιακές	Tobacco PR-1a
PR-2	B-1,3- γλυκανάση	Tobacco
PR-3	Χιτινάση τύπου I, II, IV, V, VI, VII	Tobacco P, Q
PR-4	Χιτινάση τύπου I, II	Tobacco“R”

PR-5	Thaumatin-like	Tobacco S
PR-6	Αναστολέας πρωτεΐνάσης	Αναστολέας τομάτας I
PR-7	Ενδοπρωτεΐνάση	Τομάτα P69
PR-8	Χιτινάση τύπου III	Χιτινάση αγγουριού
PR-9	Περοξειδάση	Tobacco “lignin-forming peroxidase”
PR-10	Ribonuclease-like	Parsley “PR1”
PR-11	Χιτινάση τύπου I	Tobacco “class V” chitinase
PR-12	Αμυντικές	Radish Rs-AFP3
PR-13	Θειονίνη	Arabidopsis THI2.1
PR-14	Πρωτεΐνη μεταφοράς λιπιδίων	Barley LTP4
PR-15	Oxalate oxidase	Barley OxOa (germin)
PR-16	Oxalate oxidase-like	Barley OxOLP
PR-17	Άγνωστες	Tobacco PRp27

3.1.2 Πρωτεΐνες που μοιάζουν με την θαυματίνη (Thaumatin Like Proteins, TLPs)

Οι πρωτεΐνες που μοιάζουν με θαυματίνη (TLPs) είναι πολυπεπίδια που αποτελούνται από 200 υπολείμματα αμινοξέων κατά προσέγγιση, η αλληλουχία των οποίων είναι παρόμοια της θαυματίνης. Οι περισσότερες TLPs περιέχουν μία εξαιρετικά διατηρημένη δομή του ακόλουθου μοτίβου: G-X-[GF]-X-C-X-T-[GA]-D-C-X(1,2)-G-X-(2,3)-C, ένα REDDD (αργινίνη, γλουταμινικό οξύ και τρία υπολείμματα ασπαρτικού οξέος) και δεκαέξι ή δέκα διατηρημένα υπολείμματα κυστεΐνης, τα οποία σχηματίζουν οκτώ ή πέντε δισουλφιδικούς δεσμούς. Αυτοί οι δισουλφιδικοί δεσμοί βοηθούν στη διατήρηση των τρισδιάστατων δομών των TLPs σε δυσμενή περιβάλλοντα με υψηλή θερμοκρασία ή χαμηλό pH ([Liu et al., 2023](#)).

Οι πρωτεΐνες TLP είναι προϊόντα της μεγάλης, εξαιρετικά πολύπλοκης οικογένειας γονιδίων που εμπλέκονται στην άμυνα του ξενιστή και σε ένα ευρύ φάσμα αναπτυξιακών διαδικασιών σε μύκητες, φυτά και ζώα (PR proteins). Παρά τη δραματική τους διαφοροποίηση μεταξύ των οργανισμών, οι TLPs φαίνεται ότι προέρχονται από πρόιμους ευκαριωτικούς οργανισμούς. ([Jun-Jun Liu et al., 2010](#)) Στο κομμάτι της αμπελοκαλλιέργειας και οινοποίησης, οι πρωτεΐνες αυτές σχετίζονται με την ωρίμανση των σταφυλιών και το μαλάκωμα των ραγών ([Waterhouse, Sacks and Jeffery, Understanding Wine Chemistry, Wiley, 2022](#)). Συγκεκριμένα, οι εν λόγω πρωτεΐνες ομαδοποιούνται στην οικογένεια 5 των πρωτεϊνών PR ([Jesus-Pires et al., 2020](#)) και εμπλέκονται τόσο σε συνθήκες βιοτικού όσο και αβιοτικού στρες ([Alok Sharma et al., 2022](#)). Παλαιότερα, έχει εντοπιστεί η παρουσία τους σε λευκούς οίνους (Sauvignon Blanc, Μοσχάτο Αλεξάνδρειας, Chardonnay). Θα μπορούσαμε να ανιχνεύσουμε TLPs σε λευκό (Riesling) και κόκκινο (Portugieser) οίνο με φασματομετρία μάζας ενώ η μέθοδος SDS-PAGE υποδηλώνει την παρουσία του και στο ροζέ κρασί (Portugieser Weissherbst).

Οι πρωτεΐνες TLP είναι γνωστές ως αλλεργιογόνα σε ορισμένα φρούτα, για παράδειγμα, ως κύριο αλλεργιογόνο στο μήλο, και επίσης συζητούνται ως πιθανά αλλεργιογόνα σταφυλιού ([Petra Wigand et al., 2009](#)).

3.1.3 Ωσμοτίνες

Άλλη κατηγορία πρωτεϊνών που συνεισφέρει σημαντικά στον σχηματισμό πρωτεϊνικού θολώματος είναι οι ωσμοτίνες ([Luís Batista et al., 2010](#)). Αυτές έχουν χαμηλά ισοηλεκτρικά σημεία και μοριακό βάρος (24 kD). Η ωσμοτίνη θεωρείται χαρακτηριστική εκπρόσωπος των πρωτεϊνών ωσμοτικής καταπόνησης, όμως η μεταγραφή των γονιδίων

της επάγεται, εκτός από την έλλειψη νερού λόγω ξηρασίας, αλατότητας και ψύχους, και από τουλάχιστον επτά επιπλέον σήματα, όπως είναι η υπεριώδης ακτινοβολία, ο μηχανικός τραυματισμός, οι μυκητιακές προσβολές, η προσβολή από τον ιό του μωσαϊκού του καπνού (TMV), το ABA, το αιθυλένιο και η αυξίνη. Τα γονίδια της ωσμωτικής επάγονται από αρκετές καταπονήσεις, η πρωτεΐνη όμως, συσσωρεύεται σε ικανές ποσότητες μόνο μετά από εφαρμογή αιθυλενίου, προσβολή μυκήτων, ή κατά τον εγκλιματισμό σε έλλειψη νερού και σε αλατότητα.

Οι ωσμωτικές είναι ομόλογες με τις PR πρωτεΐνες, με αντιμυκητολογική δράση. Πιο συγκεκριμένα, ανήκουν στην πέμπτη οικογένεια των PR πρωτεϊνών και είναι αρκετά συγγενείς με τις πρωτεΐνες που μοιάζουν με την θυματίνη (TLPs). Τα προϊόντα των γονιδίων της ωσμωτικής εμφανίζουν *in vitro* αντιμυκητιακή δράση. Η αντιπαθογόνα δράση της ωσμωτικής περιγράφεται ως εξής: οι υφές του μύκητα εκλύουν τοξίνες οι οποίες διασπών την κυτταρική μεμβράνη του φυτού, προξενώντας διαρροή θρεπτικών ουσιών που χρησιμοποιούνται από τον μύκητα. Έτσι, μειώνεται η σπαργή του φυτού, οπότε αυξάνεται η συσσώρευση ωσμωτικής, που διαχέεται εκτός του φυτικού κυττάρου και επικάθεται σε ομόλογο δέκτη στην επιφάνεια του μύκητα. Στη συνέχεια, η ωσμωτική εισχωρεί και σχηματίζει πόρους στις μυκηλιακές μεμβράνες, καθιστώντας τις διαπερατές και παρεμποδίζοντας την ανάπτυξη των μυκηλίων. Ο μηχανισμός δράσης της ωσμωτικής σε έλλειψη νερού και σε αλατότητα δεν είναι ακόμη γνωστός. Η ρύθμιση της έκφρασης των ωσμωτικών και των συγγενών τους γονιδίων φαίνεται ότι είναι πολύ περίπλοκη. Αυτά τα γονίδια είναι αναπτυξιακά ρυθμιζόμενα και επίσης ελέγχονται από πολλαπλά σήματα όπως το ABA, το σαλικυλικό οξύ, χαμηλό υδατικό δυναμικό, χαμηλές θερμοκρασίες, τραυματισμός και αιθυλένιο. Έχει προταθεί ότι η επαγωγή των ωσμωτικών από ωσμωτική καταπόνηση μπορεί απλά να αντανακλά την ενεργοποίηση της αντίδρασης από γενικές καταπονήσεις φυτών που αναπτύσσονται για να αμυνθούν σε παθογόνα. Η έκφραση του γονιδίου της ωσμωτικής του αμπελιού επάγεται καθαρά από το αμπισικό οξύ και το αιθυλένιο, τις δυο φυτικές ορμόνες που σχετίζονται με την ωσμωτική και παθογενετική καταπόνηση ([Loulakakis, 1997](#)).

3.1.4 Lipid Transfer Proteins (LTPs)

Οι LTPs είναι υπεύθυνες για τον σχηματισμό πρωτεϊνικών θολωμάτων σε μικρότερο βαθμό από τις προαναφερόμενες κατηγορίες πρωτεϊνών ([Daniela Silva-Barbieri et al., 2022](#)). Η συγκεκριμένη κατηγορία πρωτεϊνών, καθώς και τα προϊόντα υδρόλυσης

αυτής όπως και όλων των προαναφερόμενων κατηγοριών διαπιστώθηκε ότι συνεισφέρουν στις διαλυτές πρωτεΐνες του οίνου και σε πολυπεπίδια, συνολικά σε συγκεντρώσεις 69,7 έως 108 mg/L σε οίνους της ποικιλίας Chardonnay που καλλιεργήθηκαν στην περιοχή Yamanashi της Ιαπωνίας ([Tohru Okuda et al., 2006](#)). Αυτή η αναφορά αποτελεί και την πρώτη απόδειξη της παρουσίας της συγκεκριμένης πρωτεΐνης καθώς και του προϊόντος υδρόλυσης αυτής, όπως και των υπόλοιπων προϊόντων υδρόλυσης των κυριότερων οινικών πρωτεϊνών στον οίνο. Σε άλλη σχετική έρευνα βρέθηκε ότι μόνο μερικοί ερυθροί οίνοι εμφανίζουν μια ζώνη με μοριακή μάζα 12 kDa, που προσδιορίζεται ως πρωτεΐνη μεταφοράς λιπιδίων (LTP). Συγκεκριμένα, οίνοι της ποικιλίας Portugieser βρέθηκε ότι εκτός από την ισόμορφη πρωτεΐνη LTP 4 περιέχει και μία LTP από το *Vitis aestivalis* (AAQ96338) καθώς και ένα LTP από το *Vitis berlandieri* × *V. vinifera*. Ωστόσο, η εμφάνιση και η κατανομή του LTP εξαρτάται από την ποικιλία ([Petra Wigand et al., 2009](#)).

3.1.5 Χιτινάσες

Οι χιτινάσες έχουν ταξινομηθεί σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τις ενδοχιτινάσες και τις εξωχιτινάσες. Οι χιτινάσες βακτηριακού τύπου έχουν μια βαθιά σχισμή δέσμευσης υποστρώματος σε σχήμα σήραγγας και είναι οι έξω-χιτινάσες, οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιήσουν τη χιτίνη ως πηγή υδατανθράκων από μύκητες, ενώ οι χιτινάσες φυτικού τύπου έχουν ρηχές, ανοιχτές αυλακώσεις οι οποίες συνδέονται με το υπόστρωμα και είναι οι ένδο-χιτινάσες και εμπλέκονται στην αναδιαμόρφωση και τη συντήρηση του κυτταρικού τοιχώματος των μυκήτων ([Z Jiang et al., 2021](#)). Ωστόσο, η τρέχουσα ονοματολογία για τα χιτινολυτικά ένζυμα προκαλεί σύγχυση, εν μέρει λόγω του γεγονότος ότι το προηγούμενο σύστημα ταξινόμησης δεν έχει εγκαταλειφθεί. Επιπλέον, ορισμένοι συγγραφείς έχουν περιγράψει τα ένζυμα που απελευθερώνουν μικρά ολιγομερή (συμπεριλαμβανομένων των διμερών) από το αναγωγικό άκρο τους ως ενδοχιτινάσες (EC 3.2.1.14), διαφοροποιώντας τα ακόμη και από τα αυστηρά ενδοτυπικά ένζυμα. Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιούμε την ονοματολογία που προτείνεται από τους Harman et al. στην οποία η διαφορά μεταξύ ενδο- και εξωχιτινασών είναι ειδικότητα υποστρώματος: οι ενδοχιτινάσες απαιτούν τουλάχιστον τετραμερές GlcNAc (N-acetyl β-D-glucosamine), ενώ το ελάχιστο υπόστρωμα για μια εξωχιτινάση είναι το τριμερές GlcNAc. Επιπλέον, αναφερόμαστε στο ένζυμο που καταλύει την απελευθέρωση διμερών ως χιτοβιοσιδάση. Αν και ένας αριθμός μελετών έχει χαρακτηρίσει την οικογένεια χιτινασών, η οποία περιλαμβάνει το ένζυμο

τύπου IV,19,20 σύμφωνα με τη γνώση μας, η χιτινάση τύπου IV σταφυλιού έχει υποβληθεί σε περιορισμένη βιοχημική ανάλυση ([Simone Vincenzi et al., 2014](#)).

Η ενδοχιτινάση κατηγορίας IV από το *V. vinifera* (AAB65776) ανιχνεύθηκε επίσης στον κόκκινο οίνο Portugieser. Η ενδοχιτινάση κατηγορίας IV ανήκει στην οικογένεια 3 πρωτεϊνών PR και, όπως και άλλες χιτινάσες, δρα αντιμυκητιακά μέσω της υδρόλυσης της χιτίνης, ενός κύριου συστατικού των μυκητιακών κυττάρων. Η ενδοχιτινάση κατηγορίας IV εντοπίστηκε επίσης στο Sauvignon Blanc και το Chardonnay, ενώ δύο διαφορετικές χιτινάσες είχαν ήδη βρεθεί στο Μουσκάτ της Αλεξάνδρειας. Οι Pastorello et al. υπέθεσαν ότι η ενδοχιτινάση κατηγορίας IV μπορεί να δρα ως αλλεργιογόνο του Vino Novello (*V. vinifera*) και του Fragolino (*Vitis labrusca*), κάτι που δεν μπορούσε να επιβεβαιωθεί για τα σταφύλια *V. vinifera* σε ασθενείς με αναφερόμενη αλλεργία στα σταφύλια. Αναμένεται να γίνουν περαιτέρω δοκιμές, ειδικά χρησιμοποιώντας καθαρισμένη ενδοχιτινάση. ([Petra Wigand et al., 2009](#)). Γενικά, στους περισσότερους λευκούς οίνους, οι χιτινάσες είναι παρούσες σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις από τα TLPs, πιθανώς επειδή αυτές διαθέτουν ελλειπτική δευτερεύουσα δομή, γεγονός που τις καθιστά πιο ευαίσθητες στις αλλαγές θερμοκρασίας και pH. Αντίθετα, τα TLPs είναι σφαιρικά στη δομή, θερμοσταθερά και πιο ανθεκτικά στις αλλαγές του pH ([Daniela Silva-Barbieri et al., 2022](#)).

Πίνακας 2. Πρωτεϊνική συγκέντρωση γλευκών από διαφορετικές ποικιλίες ([Zhaolong Liu et al., 2023](#))

Ποικιλία	°Brix	Πρωτεϊνική Συγκέντρωση (mg/L)		
		Total protein	TLPs	Chitinases
‘Muscat of Alexandria’	20.06	251	119	118
‘Sauvignon Blanc’	21.05	191	119	76
‘Sultana’	21.00	86	23	44
‘Pinot Noir’	20.02	62	35	21
‘Shiraz’	20.08	31	18	9

3.1.6. Κενοτόπια Ιμβερτάση (Vacuolar Invertase)

Πρωτεΐνες με μοριακές μάζες 37, 47, 61 και 77 kDa όπως προσδιορίζεται από τη μέθοδο SDS-PAGE, θα μπορούσαν να αποδοθούν στην κενοτόπια ιμβερτάση 1 από το *V. vinifera* (AAB47171) με μια θεωρητική μοριακή μάζα περίπου 71,5 kDa. Η κενοτοπική ιμβερτάση βρίσκεται στον πολτό και είναι υπεύθυνη για τη συσσώρευση των εξοζών γλυκόζης και φρουκτόζης στο σταφύλι κατά την ωρίμανση. Συγκεκριμένα, είναι υπεύθυνη για τη μετατροπή της σακχαρόζης σε γλυκόζη και φρουκτόζη, πιστεύεται ότι είναι μια από τις πιο άφθονες πρωτεΐνες στο κρασί (από 9 έως 14% της συνολικής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη ενός κρασιού Chardonnay) και η συγκέντρωση αυτής είναι ανάλογη των ιδιοτήτων του αφρού στους αφρώδεις οίνους ([Jégou et al., 2009](#)).

Αυτή η πρωτεΐνη υπάρχει στο κόκκινο κρασί Portugieser καθώς και στο Riesling όπως προσδιορίζεται από τη φασματομετρία μάζας. Η παρουσία κενοτόπιου ιμβερτάσης έχει ήδη επιβεβαιωθεί στο Sauvignon Blanc και το Chardonnay ([Wigand et al., 2009](#)).

3.1.7. Πρωτεΐνες Ζύμης

Ένας αριθμός πρωτεϊνών ζύμης ανιχνεύθηκε στο κόκκινο κρασί Portugieser. Σήμερα, κατά την οινοποίηση προστίθενται συγκεκριμένα στελέχη ζύμης για να επιτευχθεί μια ελεγχόμενη διαδικασία ζύμωσης. Με φασματομετρία μάζας εντοπίστηκαν αρκετές πρωτεΐνες: ο ομοιοπολικά συνδεδεμένος πρόδρομος πρωτεΐνης 11 του κυτταρικού τοιχώματος (P47001), ο πρόδρομος πρωτεΐνης κυτταρικού τοιχώματος CWP1 (P28319), ο πρόδρομος πρωτεΐνης TOS1 (P38288), ο πρόδρομος πρωτεΐνης εξωκυτταρικής μήτρας 33 (P3824), πρόδρομος γλυκοσιδάσης CRH1 (P53301) και πρόδρομος ενδοχιτινάσης (P29029). Αυτές οι πρωτεΐνες αποτελούν μέρος του κυτταρικού τοιχώματος του *Saccharomyces cerevisiae* και είναι πιθανό να απελευθερωθούν στο κρασί κατά τη διαδικασία της οινοποίησης ([Wigand et al., 2009](#)). Έχει επιβεβαιωθεί ότι οι ζύμες δεν θα παράγουν θερμικά ασταθείς πρωτεΐνες στα λευκά κρασιά. Τις επόμενες δεκαετίες, οι επιστήμονες προσδιόρισαν επίσης ότι οι ζύμες δεν θα εκκρίνουν πρωτεΐνες που προκαλούν θολότητα κατά τη ζύμωση. Το 1987, οι Hsu et al. κατέληξαν στο ίδιο συμπέρασμα χρησιμοποιώντας ηλεκτροφόρηση γέλης SDS-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE). Ωστόσο, αναγνώρισαν επίσης ότι τα κύτταρα ζύμης μπορεί να εκκρίνουν πρωτεΐνες κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.

Μέχρι το 1991, οι Yokotsuka et al. μέσω πειραμάτων, διαπίστωσαν ότι 8 είδη συστατικών πρωτεϊνών κρασιού δεν υπήρχαν στον σταφυλοχυμό. Στη συνέχεια πρότειναν

επίσημα μια αντίθετη εικασία: η ζύμη κατά το στάδιο της ζύμωσης μπορούσε να εκκρίνει πρωτεΐνες. Στη συνέχεια, αναλύθηκαν τα προφίλ πρωτεΐνης 4 κρασιών διαφορετικών ποικιλιών και έλαβαν διαφορετικά ειδικά χρωματογραφήματα πρωτεΐνης μεταξύ των 4 κρασιών. Αργότερα το 2014, οι Mostert et al. χρησιμοποίησαν δακτυλικά αποτυπώματα πεπτιδίων για να αναγνωρίσουν την πρωτεΐνη στο τέλος της ζύμωσης του κρασιού και διαπίστωσαν ότι η ζύμη εκκρίνει μια μεγάλη ποικιλία πρωτεϊνών. Ταυτόχρονα, οι Mostert et al. διαπίστωσαν επίσης ότι παρόλο που ο αριθμός των πρωτεϊνών που εκκρίνονταν από διαφορετικούς ζυμομύκητες διέφερε πολύ, οι πρωτεΐνες και οι λειτουργίες τους ήταν παρόμοιες. Οι περισσότερες πρωτεΐνες συμμετείχαν στη βιοσύνθεση των κυτταρικών τοιχωμάτων του ζυμομύκητα. Μέχρι στιγμής, η ιδέα ότι η προσθήκη ζύμης κατά το στάδιο της ζύμωσης εκκρίνει πρωτεΐνες είχε γίνει αποδεκτή από τους περισσότερους επιστήμονες, αλλά δεν υπήρχε άμεση απόδειξη ότι η πρωτεΐνη που εκκρίνεται από τη ζύμη σχετίζεται με την αστάθεια των πρωτεϊνών του οίνου ([Liu et al., 2023](#)).

Συμπερασματικά, οι προαναφερόμενες ομάδες πρωτεϊνών επιτελούν σημαντικό ρόλο στην κολλοειδή αστάθεια και διαύγεια των λευκών οίνων. Λόγω της αντοχής τους στην πρωτεόλυση, αυτές οι πρωτεΐνες επιβιώνουν στη διαδικασία ζύμωσης και παραμένουν στο κρασί, όπου μπορούν να σχηματίσουν αδιάλυτα συσσωματώματα με αποτέλεσμα την εμφάνιση πρωτεϊνικού θολώματος ([M. Marangon et al, 2011](#)).

3.2 Άλλες Δράσεις Πρωτεϊνών στον Οίνο

Η παρουσία των πρωτεϊνών στους οίνους δεν οδηγεί μόνο σε αρνητικά αποτελέσματα όπως είναι ο σχηματισμός θολώματος, αλλά υπάρχουν και περιπτώσεις όπου δρουν θετικά, όπως στη ρύθμιση της στυφότητας στους ερυθρούς οίνους ή στον αφρισμό στους αφρώδεις οίνους, όπως περιγράφεται παρακάτω.

3.2.1 Επίδραση στη γεύση των ερυθρών οίνων

Οι πρωτεΐνες δεν επηρεάζουν ιδιαίτερα τη γεύση του οίνου στις συγκεντρώσεις που βρίσκονται σε αυτόν, ενώ στους ερυθρούς οίνους οι πρωτεΐνες βρίσκονται σε μικρότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με τους λευκούς. Στους ερυθρούς οίνους, μία συγκεκριμένη κατηγορία πρωτεϊνών επηρεάζει την αίσθηση του στυφού κατά τη γευστική δοκιμή ερυθρών οίνων, που ονομάζονται πρωτεΐνες της ζελατίνης και δρουν συνεργιστικά με τις τανίνες του οίνου, μέσω δημιουργίας συμπλόκων μεταξύ τους. Κατά αυτόν τον τρόπο

αποδίδεται ο στυφός χαρακτήρας σε ερυθρούς οίνους. Το προαναφερόμενο φαινόμενο υπολογίζεται και ποσοτικά, με τον όρο Δείκτης Ζελατίνης:

$$\Delta (\text{Ζελατίνης}) = [(C_0 - C_1) * 100] / C_0 ,$$

όπου: C_0 : Η συγκέντρωση των τανινών πριν την προσθήκη ζελατίνης και

C_1 : Η συγκέντρωση των τανινών μετά την προσθήκη ζελατίνης.

Υψηλή τιμή του συγκεκριμένου δείκτη (περίπου 60) είναι ένδειξη έντονης στυφής γεύσης λόγω ισχυρής αντίδρασης τανίνης. Σε μέσες τιμές οι τανίνες έχουν ακόμη ισχυρή τάση αντίδρασης με πλούσια και συνάμα απαλή αίσθησης σώματος, ενώ χαμηλή τιμή του δείκτη ζελατίνης (περίπου 35-40) υποδεικνύει ένα ελαφρού σώματος “επίπεδο” κρασί σε οργανοληπτικό επίπεδο (Τσακίρης Α., 2017).

3.2.2 Επίδραση στον αφρό στους αφρώδεις οίνους

Ένας επιπρόσθετος σπουδαίος ρόλος των πρωτεϊνών αφορά στην ποιότητα του παραγόμενου αφρού στους αφρώδεις οίνους. Παρά την μικρή τους συγκέντρωση στον οίνο (με εύρος από 4 έως 16 mg/L), έχει διαπιστωθεί η επίδρασή τους στον σχηματισμό αφρού λόγω των τασιενεργών τους ιδιοτήτων. Οι πρωτεΐνες του κρασιού είναι υδρόφοβες και, χάρη στο ισοηλεκτρικό τους σημείο και το μοριακό τους βάρος, έχουν τη δυνατότητα να σχηματίσουν φυσαλίδες (Brissonnet and Maujean, 1993). Η δυναμική της απορρόφησης πρωτεϊνών στο μέσο του αφρού και η επίδρασή της στον σχηματισμό του και στη σταθερότητά του στα αφρώδη κρασιά εξακολουθούν να είναι ασαφή. Ο σχηματισμός αφρού εξαρτάται από τις πρωτεΐνες που παρουσιάζουν ταχεία προσρόφηση και ικανότητα εκτυλίσματος στη διεπαφή αερίου -υγρού, ενώ η σταθερότητα αφρού απαιτεί πρωτεΐνες να σχηματίζουν ισχυρούς δεσμούς για να αποφευχθεί η συσσωμάτωση αφρού. Οι πρωτεΐνες που προάγουν το σχηματισμό αφρού ενδέχεται να μην βελτιώνουν απαραίτητα τη σταθερότητα του. Τείνουν να είναι εύκαμπτες και χαμηλότερου μοριακού βάρους, με αποτέλεσμα την έκθεση σε υδρόφοβα υπολείμματα. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι μια σημαντική μείωση τόσο της συνολικής πρωτεΐνης όσο και της περιεκτικότητας σε ιμβερτάση σταφυλιού των κρασιών βάσης σαμπάνιας συσχετίζεται με τη μείωση των ιδιοτήτων αφρισμού του οίνου (Pin-He Liu et al., 2018).

Αντίθετα, η σύνθεση αμινοξέων των πρωτεϊνών και οι αλληλεπιδράσεις που συμβαίνουν μεταξύ των δισουλφιδικών δεσμών έχουν επίσης κρίσιμη σημασία για τη σταθερότητα του αφρού. Πράγματι, τα βασικά χαρακτηριστικά των σταθεροποιητών

αφρού περιλαμβάνουν την παρουσία ελεύθερων ομάδων σουλφυδρυλίου (-SH) ([Condé et al., 2017](#)).

Όσον αφορά στη μεγιστοποίηση της δημιουργίας αφρού και στην σταθεροποίησή του, αυτή επιτυγχάνεται όταν οι θερμικά ενεργές πρωτεΐνες του οίνου, οι χιτινάσες και οι πρωτεΐνες που μοιάζουν με θαυματίνη, δρουν συνεργιστικά με τις μαννοπρωτεΐνες προερχόμενες από τις ζύμες. Το καθαρό φορτίο των μακρομορίων εξαρτάται από το pH. Στο pH του οίνου (περίπου 2.9), οι πρωτεΐνες θα είναι θετικά φορτισμένες και θεωρητικά θα μπορούσαν να ανέλθουν στην επιφάνεια του περιέκτη του αφρώδους οίνου και να σταθεροποιήσουν τον αφρό. Ωστόσο, νεότερες έρευνες έχουν δείξει πως ο σχηματισμός αφρού οφείλεται καθαρά στην υδρόφοβη φύση των πρωτεϊνών, αποκλείοντας το ενδεχόμενο επίδρασης παραγόντων όπως το μοριακό τους βάρος και το ισοηλεκτρικό τους σημείο ([Martinez-Lapuente et al., 2017](#)).

3.2.3 Αλλεργιογόνος δράση

Μία άλλη ιδιότητα με μεγάλο ενδιαφέρον είναι το αλλεργιογόνο δυναμικό των πρωτεϊνών του οίνου. Τα τελευταία χρόνια δημοσιεύθηκαν μερικές περιπτώσιολογικές μελέτες που αναφέρουν αλλεργικές αντιδράσεις στα σταφύλια και τον οίνο και ορισμένες πρωτεΐνες είχαν ήδη περιγραφεί ως πιθανά αλλεργιογόνα σταφυλιού και οίνου με την πρωτεΐνη μεταφοράς λιπιδίων αναγνωρισμένη ως αλλεργιογόνο από τη Διεθνή Ένωση Ανοσολογικών Societies Allergen Nomenclature Subcommittee. Εκτός από τις πρωτεΐνες σταφυλιού, πιθανά αλλεργιογόνα μπορεί να εισαχθούν κατά τη διάρκεια της οινοποίησης, για παράδειγμα, ως παράγοντες διόγκωσης όπως η καζεΐνη, η ωολευκωματίνη και η λυσοζύμη ([B.Wüthrich,2018](#)). Αυτά περιλαμβάνονται στην Οδηγία 2007/89/EK, η οποία περιέχει έναν κατάλογο με πρόσθετα τροφίμων που θα μπορούσαν να αποτελέσουν παράγοντες κινδύνου για αλλεργιογόνα άτομα και ως εκ τούτου πρέπει να αναγράφονται στην ετικέτα του προϊόντος ([Petra Wigand et al., 2009](#)).

Λαμβάνοντας υπόψη ότι ο κατάλογος των αλλεργιογόνων υλικών αναθεωρείται συνεχώς, είναι πιθανό ότι άλλες αλλεργιογόνες πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που προέρχονται από φυτά, θα ληφθούν υπόψη από τους ρυθμιστικούς φορείς. Ο ΟΙV δημοσίευσε ένα ψήφισμα που περιέχει σαφείς κατευθυντήριες γραμμές για καλές πρακτικές εξομάλυνσης οι οποίες, όταν εγκριθούν, θα μειώσουν τον κίνδυνο υπολειμμάτων πρωτεϊνών στα κρασιά, ανεξάρτητα από την προέλευση του πρωτεϊνικού υλικού που χρησιμοποιείται ως παράγοντας κολλαρίσματος. Εφαρμόζοντας αυτές τις

οδηγίες, οι οινοπαραγωγοί μπορούν να περιορίσουν την παρουσία υπολειμμάτων πρωτεΐνης στους οίνους, εκπληρώνοντας έτσι τα καθήκοντα του ισχύοντος κανονισμού. Ακόμη και αν αυτές οι κατευθυντήριες γραμμές έχουν αναπτυχθεί, με αναφορά στην καζεΐνη και το ασπράδι αυγού, είναι επίσης πιθανό να είναι αποτελεσματικές για άλλες πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων εκείνων φυτικής προέλευσης, σε περίπτωση που πρέπει να ληφθεί υπόψη η πιθανή αλλεργιογόνος δράση τους. Παράλληλα με αυτές τις οδηγίες, αρκετοί συγγραφείς έχουν αποδείξει την αποτελεσματικότητα της δευτερογενούς διόγκωσης με μπεντονίτη για την αφαίρεση υπολειμμάτων πρωτεϊνικών βοηθημάτων επεξεργασίας, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που προέρχονται από αυγό, γάλα, ψάρι αλλά και από φυτικές πηγές όπως λούπινο και γλουτένη σίτου.

Αυτό υποδηλώνει ότι η σύζευξη των δύο κατεργασιών (διήθηση και προσθήκη μπεντονίτη) είναι πιθανό να είναι η καλύτερη πρακτική που πρέπει να υιοθετηθεί όταν χρησιμοποιούνται πρωτεϊνικοί παράγοντες διόγκωσης.

Ωστόσο, η τήρηση αυτών των οδηγιών μπορεί σίγουρα να αντιπροσωπεύει ένα επιπλέον κόστος όσον αφορά τον αριθμό των αναλύσεων που απαιτούνται, την εργασία, τον χρόνο και τη γραφειοκρατία, έτσι ώστε οι οινοπαραγωγοί να υιοθετήσουν εναλλακτικές μεθόδους για την επίλυση του προβλήματος της παρουσίας εξωγενούς πρωτεϊνικού υλικού στους οίνους.

Η πιο λογική εναλλακτική θα ήταν η χρήση πρωτεϊνούχων υλικών που υπάρχουν ήδη στα σταφύλια και στους οίνους ως εκχυλίσματα, τα οποία προφανώς δεν μπορούν να θεωρηθούν ως ξένη ουσία ([Marangon et al., 2019](#)).

3.3 Εξέλιξη Πρωτεϊνών στην πορεία της Οινοποίησης

Όσον αφορά την εξέλιξη των πρωτεϊνών στην πορεία της οινοποίησης, οι πρωτεΐνες που εντοπίζονται στον οίνο είναι συγκριτικά λιγότερες αν λάβουμε υπόψη το περιεχόμενο και τη σύσταση των σταφυλιών στα εν λόγω μακρομόρια.

3.3.1 Προζυμωτικό Επίπεδο

Το περιεχόμενο αυτό εξαρτάται με τη σειρά του από την ποικιλία, το υδατικό στρες, τις καλλιεργητικές μεθόδους και την υγιεινή κατάσταση των σταφυλιών ([Zhaolong Liu et al., 2023](#)), καθώς και τις συνθήκες που επικρατούν κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης ([Fernanda Cosme et al., March 2020](#)). Η μόλυνση με ορισμένα κοινά παθογόνα αμπέλου ή

η επαφή με το φλοιό, όπως συμβαίνει κατά τη μεταφορά μηχανικά συγκομισθέντων φρούτων, έχει ως αποτέλεσμα αυξημένες συγκεντρώσεις ορισμένων πρωτεϊνών PR σε γλεύκος και οίνο. Κατά την καλλιεργητική περίοδο, εντοπίζονται στα φύλλα και στα σταφύλια οι πρωτεΐνες που σχετίζονται με την παθογένεση, οι οποίες παρέχουν προστασία ενάντια σε μυκητολογικές προσβολές. Με την χρήση γενετικά τροποποιημένων αμπελιών μπορεί να γίνει δυνατή η υποέκφραση των εν λόγω πρωτεϊνών, θυσιάζοντας όμως την αντοχή των φυτών σε μύκητες ([Ferreira et al., 2004](#)). Κατά την διάρκεια της περιόδου ωρίμανσης των σταφυλιών στον τρύγο, η συγκέντρωση σε πρωτεΐνες αυξάνεται.

3.3.2 Μεταζυμωτικό Επίπεδο

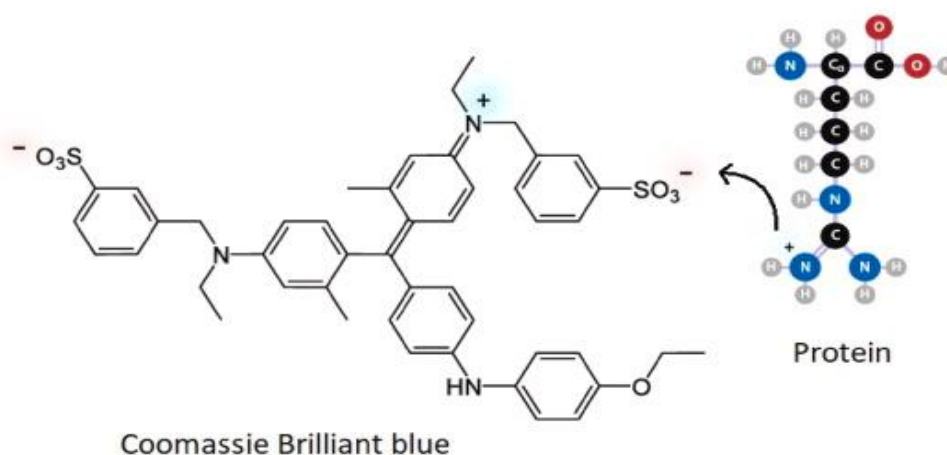
Επιπλέον πολλές πρωτεΐνες που συναντώνται στο φλοιό της σταφυλής ωστόσο είναι δύσκολο να απομονωθούν λόγω της αλληλεπίδρασης με φαινολικές ενώσεις και ένζυμα. Τα επίπεδα πρωτεϊνών στο αφιλτράριστο λευκό κρασί διαφέρουν ανάλογα με την ποικιλία και κυμαίνονται έως και 300 mg/L. Αντιθέτως, η συγκέντρωση των πρωτεϊνών σε ερυθρούς οίνους βρέθηκε να είναι ιδιαίτερα χαμηλή, καθώς η ζύμωση για την παραγωγή τους πραγματοποιήθηκε παρουσία φλοιών και γιγάρτων, εκ των οποίων εκχυλίστηκαν φαινολικές ενώσεις, μακρομόρια που συνδέθηκαν εν συνεχεία με τις πρωτεΐνες δημιουργώντας πιο διακριτά συσσωματώματα, τα οποία αφαιρούνται ευκολότερα στην πορεία της οινοποίησης. Οι αντίστοιχες φαινολικές ενώσεις στους λευκούς οίνους ήταν πολύ λιγότερες λόγω της κατά αποκλειστικότητα ζύμωσης με σταφυλοχυμό ([Zhaolong Liu et al., 2023](#)).

3.4 Μέθοδοι προσδιορισμού πρωτεϊνικής συγκέντρωσης στους οίνους και παραγόντων διαύγασης

Με την ανακάλυψη της περίπλοκης δομής και ιδιοτήτων των πρωτεϊνών του οίνου, δημιουργήθηκε και η ανάγκη για την εύρεση μεθόδων προσδιορισμού και ανάλυση των πρωτεϊνών. Από τις παλαιότερες μεθόδους προσδιορισμού πρωτεϊνών είναι η μέθοδος Kjeldahl, ενώ μέχρι σήμερα και άλλες μέθοδοι όπως η ηλεκτροφόρηση ή φασματοφωτομετρία μάζας χρησιμοποιούνται ερευνητικά. Παρακάτω, γίνεται μια αναφορά στις μεθόδους που υπάρχουν για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης πρωτεϊνών στον οίνο.

3.4.1 Μέθοδος Bradford

Εν συγκρίσει με τις υπόλοιπες διαθέσιμες μεθόδους προσδιορισμού, η μέθοδος Bradford θεωρείται ως η γρηγορότερη και εκείνη με την μεγαλύτερη ευαισθησία, όσον αφορά το αποτέλεσμα. Στην πράξη, χρησιμοποιεί τη μεταβολή στο φάσμα της απορρόφησης της χρωστικής Coomassie Blue όταν η ίδια αλληλεπιδρά με γνωστή συγκέντρωση πρωτεΐνης, συνήθως BSA (βόειου ορού αλβουμίνης), σε μη μεταβαλλόμενο μήκος κύματος (595nm). Κατ'επέκταση, τα αποτελέσματα της ποσοτικής ανάλυσης εκφράζονται σε mg.L⁻¹ BSA. Η εν λόγω μεταβολή είναι ανάλογη της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης ([Nils Carlsson et al., 2011](#)).



Εικόνα 5. Το σύμπλοκο της πρωτεΐνης με τη χρωστική Coomassie Brilliant blue ([Fatemeh Karimi et al., 2022](#))

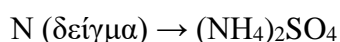
3.4.2 Μέθοδος Kjeldahl

Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στον έμμεσο προσδιορισμό των πρωτεϊνών του οίνου μέσω της μέτρησης του αζώτου που περιέχεται στο μόριο της αμινομάδας αυτών. Θεωρείται παγκοσμίως ως η μέθοδος αναφοράς μεταξύ των λοιπών μεθόδων προσδιορισμού και χρησιμοποιείται σε μεγάλο βαθμό στην εκτίμηση των πρωτεϊνών των τροφίμων. Ακριβώς επειδή αποτελεί έμμεση μέθοδο προσδιορισμού αυξάνεται η πιθανότητα λήψης λανθασμένων αποτελεσμάτων και λόγω των αλληπάλληλων αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα είναι χαρακτηριστικά πιο χρονοβόρα σε εργαστηριακό επίπεδο από ότι η μέθοδος Bradford. Συμπληρωματικά, ένα ακόμη βασικό μειονέκτημα της μεθόδου είναι η εκτεταμένη προσθήκη πυκνού θεικού οξέος σε υψηλές συγκεντρώσεις (ώστε να καταστεί δυνατή η αποσύνθεση των οργανικών ενώσεων) καθώς και η χρήση των διάφορων καταλυτών της αντίδρασης της υγρής χώνευσης ([Željko A. Mihaljev et al., 2015](#)).

Η πορεία της μεθόδου αυτής χωρίζεται σε 3 βήματα:

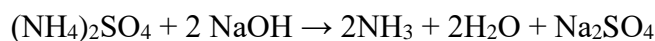
1^ο βήμα: Πέψη

Παρουσία οξειδωτικού αντιδραστηρίου (πυκνού θειικού οξέος) το δείγμα οίνου γνωστού όγκου υποβάλλεται σε υγρή χώνευση (πέψη), με σκοπό την μετατροπή του συνολικού αζώτου σε θειικό αμμώνιο (αμμωνία), και των λοιπών οργανικών ενώσεων σε CO₂ και H₂O. Από την αντίδραση αυτή εξαιρείται το άζωτο που βρίσκεται στο διάλυμα υπό τη μορφή νιτρικών ή νιτρωδών. Η αντίδραση που πραγματοποιείται είναι η ακόλουθη:



2^ο βήμα: Εξουδετέρωση-Απόσταξη με υδρατμούς

Εν συνεχεία της πέψης, ακολουθεί η απόσταξη του θειικού αμμωνίου που σχηματίστηκε στο προηγούμενο στάδιο, το οποίο με τη σειρά του μετατρέπεται με την προσθήκη περίσσειας υδροξειδίου του νατρίου σε αέρια αμμωνία.



Η σχηματιζόμενη αμμωνία περνάει σε αντίδραση εξουδετέρωσης με το HCl και εξουδετερώνει ένα μέρος αυτού: $\text{NH}_3 + \text{HCl} \rightarrow \text{NH}_4\text{Cl}$

3^ο βήμα: Τιτλοδότηση

Η περίσσεια του HCl της προηγούμενης αντίδρασης τιτλοδοτείται με πρότυπο διάλυμα NaOH (Vratislav Chromý et al., 2015). Μέσω της εν λόγω τιτλοδότησης υπολογίζεται η περιεκτικότητα σε άζωτο που αντιπροσωπεύει την ποσότητα της ακατέργαστης πρωτεΐνης στο δείγμα. Οι περισσότερες πρωτεΐνες περιέχουν 16% άζωτο, επομένως ο συντελεστής μετατροπής είναι 6,25. Ωστόσο, μετράται επίσης και το άζωτο από μη πρωτεϊνικά πρόσθετα (B. Jiang et al., 2014).

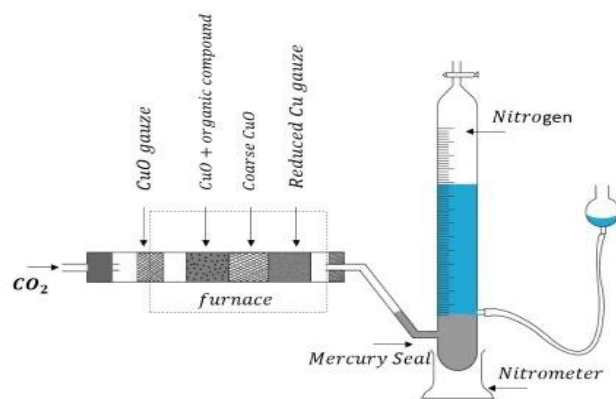
3.4.3 Μέθοδος Νινυδρίνης

Αυτή η μέθοδος έρχεται να χρησιμοποιηθεί στη θέση της μεθόδου Kjeldahl με σκοπό τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη του οίνου και της μύρας. Επιπροσθέτως, αυτή η μελέτη είναι ιδανική για τον προσδιορισμό του αφομοιώσιμου αζώτου της ζύμης (YAN) αλλά και για τον προσδιορισμό των ελεύθερων αμινοξέων στην μύρα (FAN). Η συγκεκριμένη ανάλυση έχει την ικανότητα να μετρά μόνο τα α-αμινοξέα και την αμμωνία, επομένως δεν ανιχνεύονται άλλες πηγές αζώτου, με αποτέλεσμα την

μείωση της συνολικής πρωτεΐνης κατά 30% σε σύγκριση με την μέθοδο Kjeldahl, η οποία έχει δυνατότητα να μετρά το άζωτο από όλες τις πηγές. Η ανάλυση του οίνου ή του ζύθου με την ανάλυση των μικροβυθισμάτων για το ολικό αφομοιώσιμο άζωτο συγκρίθηκε με τις κλασικές μεθόδους YAN και FAN και προσδιορίστηκαν οι συνθήκες για μέγιστη ακρίβεια και απόδοση. Ανώτερης κατηγορίας αποτελέσματα επικράτησαν με χαμηλούς όγκους αντίδρασης και ένα σταθερό αντιδραστήριο νινυδρίνης που έχει ρυθμιστεί με οξικό νάτριο σε pH 5.5. Εναλλακτικά με την χρήση κυψελίδων, μια ανάλυση μειωμένου όγκου FAN με την χρήση του ίδιου αντιδραστηρίου νινυδρίνης ρυθμισμένο με οξικό νάτριο στο ίδιο pH έδωσε συγκρίσιμα αποτελέσματα. Ο συγκεκριμένος προσδιορισμός είναι ακριβής, γρήγορος, οικονομικός και μπορεί να εφαρμοστεί σε πλήθος δειγμάτων ([Abernathy et al., 2012](#)).

3.4.4 Μέθοδος Dumas

Η αρχή της μεθόδου Dumas για τον προσδιορισμό του αζώτου βασίζεται στην ποσοτική πέψη καύσης του δείγματος σε περίπου 900°C σε περίσσεια οξυγόνου. Το δείγμα καίγεται και τα οργανικά στοιχεία οξειδώνονται. Τα αέρια καύσης (O_2 , CO_2 , H_2O , N_2 και τα οξειδία του αζώτου NO_x) συλλέγονται και διοχετεύονται μέσα από πολλές παγίδες. Όλα τα αέρια εξαλείφονται εκτός από το άζωτο και τα οξειδία του αζώτου. Το δεσμευμένο άζωτο μετατρέπεται σε μοριακό άζωτο και οξειδία του αζώτου. Τα αέρια ανάλυσης μεταφέρονται με CO_2 ως φέρον αέριο μέσω μιας καταλυτικής ζώνης καύσης σε μια ζώνη μείωσης. Σε αυτό το σημείο, λαμβάνει χώρα η μετατροπή των οξειδίων του αζώτου σε άζωτο σε ζεστό βολφράμιο. Επιπλέον, η περίσσεια οξυγόνου είναι δεσμευμένη. Μετά από δύο στάδια ξήρανσης, το μίγμα αερίων ρέει προς τον ανιχνευτή θερμοαγωγιμότητας μέσω ενός συστήματος ελέγχου ηλεκτρονικής ροής. Ένας συνδεδεμένος υπολογιστής υπολογίζει την συγκέντρωση του αζώτου στο δείγμα από το σήμα TCD του N_2 στο CO_2 και από το βάρος του δείγματος.



Estimation of Nitrogen: Dumas Method

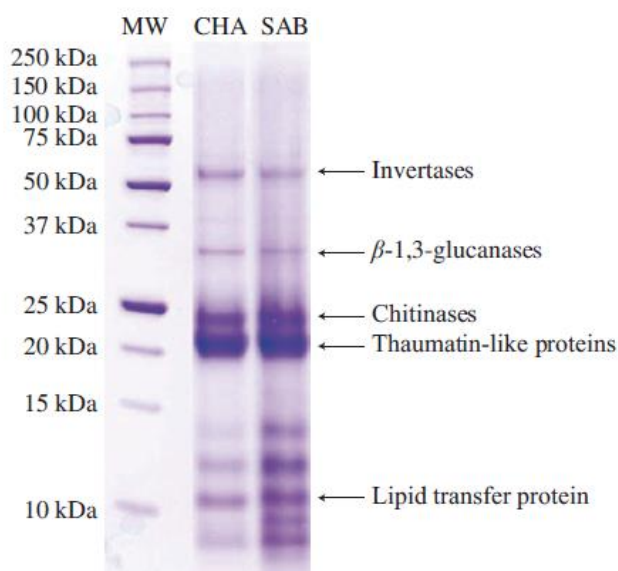
Εικόνα 6. Η συσκευή που χρησιμοποιείται στη μέθοδο Dumas αποτελείται από γεννήτρια CO₂, σωλήνα καύσης, νιτρόμετρο Schiffs (<https://www.quora.com/What-is-Dumas-method-for-estimation-of-nitrogen-in-organic-compounds>)

Η περιεκτικότητα σε ακατέργαστη πρωτεΐνη υπολογίζεται πολλαπλασιάζοντας τη μετρούμενη ποσότητα αζώτου επί τον κατάλληλο παράγοντα (6.25) και εκφράζεται επί τοις εκατό (%). Χαρακτηριστικό πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η ταχύτητα εφαρμογής της, καθώς διαρκεί σε εργαστηριακό επίπεδο λιγότερο από μόλις 4 λεπτά, εν αντιθέσει της μεθόδου Kjeldahl, για την διεξαγωγή της οποίας απαιτούνται αρκετές ώρες ([Željko A. Mihaljev et al., 2015](#))

3.4.5 Ηλεκτροφόρηση

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος με την οποία μπορούν να διαχωριστούν οι πρωτεΐνες σε ένα δείγμα οίνου με βάση το μοριακό τους βάρος. Σε μία ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) το δείγμα που περιέχει μείγμα πρωτεϊνών πρώτα διαλύεται σε διάλυμα δωδεκακυλουθειϊκού νατρίου (sodium dodecyl sulfate, SDS), που είναι ένα ανιοντικό απορρυπαντικό και καταστρέφει σχεδόν όλες τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μιας φυσικής πρωτεΐνης. Έπειτα, με την προσθήκη αντιδραστηρίων όπως η β-μερκαπτοαιθανόλη, ανάγονται οι δισουλφιδικοί δεσμοί και τα ανιόντα SDS δεσμεύονται από τα μόρια πρωτεΐνης και σχηματίζουν σύμπλοκο με μεγάλο αρνητικό φορτίο ανάλογο με τη μάζα της πρωτεΐνης. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε πολυακρυλαμίδιο και τα σύμπλοκα SDS-αποδιατεταγμένης πρωτεΐνης κινούνται κατακόρυφα συνήθως στη στιβάδα γέλης και τελικά εμφανίζονται με χρώση

συνήθως με κυανού του Coomassie (Ilaria Benucci et al., 2015). Στην εικόνα 7 δίνεται ένα παράδειγμα ηλεκτροφόρησης σε δείγματα οίνου (Liu, 2023).



Εικόνα 7. Παράδειγμα ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE σε δείγματα οίνου Chardonnay (CHA) και Sauvignon Blanc (SAB), όπου με βάση το μοριακό βάρος διακρίνονται οι πρωτεΐνες που περιέχουν (Liu, 2023).

Μια άλλη τεχνική ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιείται βασίζεται στο διαχωρισμό των πρωτεϊνών με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο και ονομάζεται ισοηλεκτρικός εστιασμός (isoelectric focusing electrophoresis, IEF) (Vincenzi et al, 2005).

S. Vincenzi, S. Mosconi, G. Zoccatelli, et al., Development of a new procedure for protein recovery and quantification in wine, Am. J. Enol. Viticult. 56 (2005) 182-187. [https://dx.doi.org/10.1016/S0065-2164\(05\)57008-4](https://dx.doi.org/10.1016/S0065-2164(05)57008-4)

3.4.6 Προσδιορισμός περιεκτικότητας πρωτεΐνης με φασματομετρία στερεάς φάσης σε σύστημα SI-LOV

Η συγκεκριμένη μέθοδος παρουσιάζει την διαδικασία που χρειάζεται να ακολουθήσει ο αναλυτής, έτσι ώστε να προσδιοριστεί ποσοτικά η ολική πρωτεΐνη στο λευκό οίνο. Αυτό επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας ένα σύστημα διαδοχικής εργαστηριακής έγχυσης σε βαλβίδα και ύστερα αξιοποιώντας την ιδέα της έγχυσης σφαιριδίων για την εκχύλιση της στερεάς φάσης με φασματοφωτομετρική ανίχνευση. Η μέθοδος βασίζεται στην απορρόφηση των στερεών στο στερεό υπόστρωμα, στα σφαιρίδια υπερροής NTA

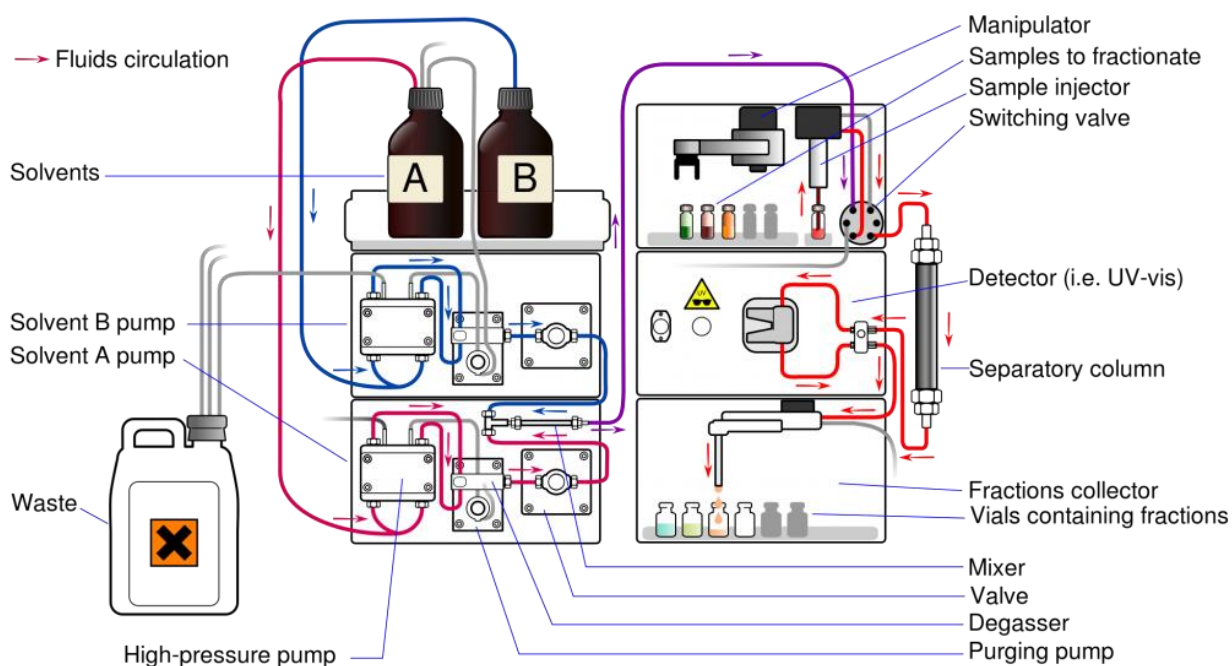
(νιτριλοτριοξικό οξύ) φορτισμένα με Cu^{2+} . Η αλλαγή στην απορρόφηση παρακολουθείται στα 500nm στην επιφάνεια των σφαιριδίων μετά την προσθήκη του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu's (FCr). Το σύστημα αυτο αποδείχθηκε ένα πολύτιμο εργαλείο για τον προσδιορισμό πρωτεϊνών όχι μόνο στους λευκούς οίνους αλλά και στους αφρώδεις οίνους καθώς και στις μύρες ([Susana S.M.P Vidigal et al, 2012](#)).

3.4.7 Υγρή χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) - Γρήγορη Υγρή Πρωτεϊνική Χρωματογραφία (FPLC)

Η χρωματογραφία παίζει καθοριστικό ρόλο στον καθαρισμό των πρωτεϊνών, επιτρέποντας στους ερευνητές να διαχωρίσουν συγκεκριμένες πρωτεΐνες από πολύπλοκα μείγματα. Υπάρχουν διάφορα είδη χρωματογραφίας όπως: η χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων (IEXC), η χρωματογραφία διήθησης με gel, η χρωματοεστίαση καθώς και η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης και η γρήγορη υγρή πρωτεϊνική χρωματογραφία.

Εστιάζοντας στην υγρή χρωματογραφία πρέπει να αναφερθούν τα εξής:

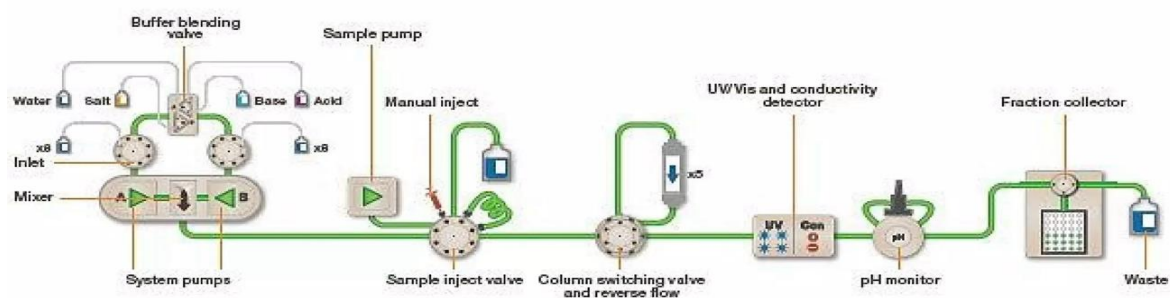
1. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC): Συγκεκριμένα, η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (HPSEC) εντός της HPLC έχει χρησιμοποιηθεί από ορισμένους ερευνητές για τη μελέτη πρωτεϊνών και πεπτιδίων σε μούρα, χυμό σταφυλιού και οίνο. Το HPSEC διαχωρίζει τις πρωτεΐνες με βάση το μέγεθός τους, επιτρέποντας την ανάλυση των προφίλ πρωτεΐνης σε διαφορετικά δείγματα. Για παράδειγμα, οι ερευνητές χρησιμοποίησαν ημιπαρασκευαστικές στήλες C18 HPLC για να καθαρίσουν και να χαρακτηρίσουν διάφορες πρωτεΐνες χυμού σταφυλιού και οίνου.



Εικόνα 8. Απεικόνιση συστήματος HPLC

2. Γρήγορη Υγρή Πρωτεϊνική Χρωματογραφία (FPLC): Το FPLC χρησιμοποιεί μια ποικιλία μέσων, όπως ανταλλαγή ιόντων, υδρόφοβη αλληλεπίδραση, συγγένεια, διήθηση gel/εξαίρεση μεγέθους και χρωματοεστίαση. Οι ερευνητές μπορούν να προσαρμόσουν τις συνθήκες φόρτωσης του δείγματος και τις τεχνικές ανίχνευσης σύμφωνα με τις συγκεκριμένες ανάγκες τους. Τα καθαρισμένα κλάσματα που συλλέγονται κατά τη διάρκεια της χρωματογραφίας χρησιμεύουν ως πολύτιμη πηγή για τα επόμενα στάδια χαρακτηρισμού. Είτε χρησιμοποιείται τεχνική χρωματογραφίας ενός σταδίου είτε συνδυασμός μεθόδων, ο στόχος είναι ο αποτελεσματικός καθαρισμός της πρωτεΐνης.

Instrumentation



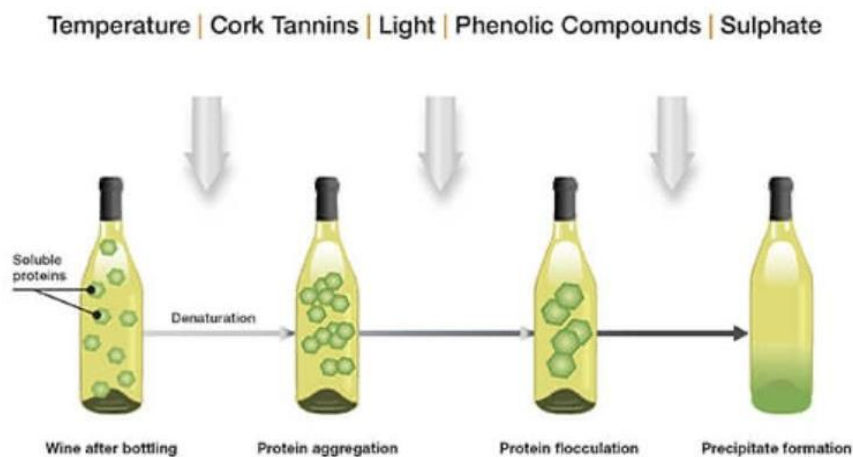
Εικόνα 9. Δείγμα ροής γρήγορης πρωτεΐνης υγρής χρωματογραφίας. Μια διαδρομή ροής δείγματος που απεικονίζει τα στοιχεία του συστήματος χρωματογραφίας μέσης πίεσης NGC (<https://www.bio-rad.com/en-gr/applications-technologies/fast-protein-liquid-chromatography?ID=MWHBF4CZF>)

Συνοπτικά, η χρωματογραφία, είτε ανταλλαγή ιόντων, FPLC ή HPLC— παρέχει ένα ισχυρό εργαλείο για τον καθαρισμό και τον χαρακτηρισμό των πρωτεϊνών, συμβάλλοντας σημαντικά στην κατανόηση των πρωτεϊνών σε διάφορα πλαίσια ([D. Le Bourse et al, 2010](#)). *D. Le Bourse, S. Jégou, A. Conreux, S. Villaume, P. Jeandet, Review of preparative and analytical procedures for the study of proteins in grape juice and wine, Analytica Chimica Acta 667 (2010) 33–42*

4. Φαινόμενο Πρωτεϊνικού Θολώματος

Για να μπορέσει να αναπτυχθεί μια αποτελεσματική μέθοδος για την αντιμετώπιση του προβλήματος των ασταθών πρωτεϊνών στα λευκά κρασιά και για την πρόληψη της πρωτεϊνικής θολότητας, είναι απαραίτητο να κατανοηθούν οι παράγοντες που επηρεάζουν την πρωτεϊνική αστάθεια και τον μηχανισμό σχηματισμού της θολότητας του λευκού κρασιού. Αν και ερευνητές σε όλο τον κόσμο έχουν πραγματοποιήσει πολλές έρευνες για αυτό το σημαντικό πρόβλημα μιας οινικής επιχείρησης και έχουν περιγράψει τον σχηματισμό πρωτεϊνικής θολότητας στα λευκά κρασιά, δεν είχε γίνει πλήρως κατανοητός μέχρι τώρα ([Liu et al. 2023](#)).

Η ερευνητική σημασία των πρωτεϊνών στους εμφιαλωμένους οίνους έγκειται στο γεγονός ότι, παρά τη χαμηλή τους συγκέντρωση η οποία μπορεί να κυμαίνεται μεταξύ 10 και 500 mg/L, ανεξάρτητα από τη διαδικασία οινοποίησης ([Luís Batista et al., 2010](#)), είναι ικανές να σχηματίζουν πρωτεϊνικά θολώματα μετά την παρατεταμένη αποθήκευση στην φιάλη, επιδρώντας αρνητικά στη διαύγεια του τελικού προϊόντος. Είναι γενικά αποδεκτό ότι όσο υψηλότερη είναι η συνολική περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη του οίνου, τόσο μεγαλύτερη είναι η τάση του να γίνει ασταθής ([Mesquita et al., 2001](#)). Ο βαθμός της διαύγειας σχετίζεται με τη θολερότητα, η οποία αντιστοιχεί στο οπτικό φαινόμενο γνωστό ως φαινόμενο Tyndall, που προκαλείται από την παρουσία μικρών αιωρούμενων σωματιδίων σε αναστολή που εκτρέπουν το φως από την κανονική του διαδρομή ([P. Ribereau-Gayon et al., 2006](#)). Έτσι, τα σωματίδια αυτά μπορούν να σχηματίσουν κατά την αποθήκευση του οίνου μια αιωρούμενη απωθητική ομίχλη, ένα οπτικό φαινόμενο που υποβαθμίζει την αξία του τελικού προϊόντος, τόσο ποιοτικά λόγω οπτικού ελαττώματος, όσο και εμπορικά, καθιστώντας το ακατάλληλο για πώληση ([Johannes de Bruijn et al., 2009](#)). Το εν λόγω φαινόμενο έχει αποδοθεί σε αποικοδόμηση των πρωτεϊνών που ακολουθείται από αυτοσυσσωμάτωση της κάθε πρωτεΐνης καταλήγοντας στην δημιουργία του συνολικού συσσωματώματος μεταξύ αυτών ([Steven C. Van Sluyter et al., 2015](#)). Αποδίδεται στην ύπαρξη των θερμικά ασταθών πρωτεϊνών, των λεγόμενων παθογόνων πρωτεϊνών ([J.M. McRae et al., 2018](#)) Η σύσταση του εν λόγω θολώματος περιλαμβάνει στο μεγαλύτερο ποσοστό της, το οποίο αγγίζει το 80%, πρωτεΐνες, καθώς και πολυσακχαρίτες και πολυφαινόλες σε μικρότερες συγκεντρώσεις ([Andreea Hortolomeu, Ileana - Denisa Nistor. 2021](#)).



Εικόνα 10. Σχηματισμός πρωτεϊνικού ιζήματος μετά την παραμονή στην φιάλη κατά την αποθήκευση. (www.pall.com)

4.1 Μηχανισμός σχηματισμού πρωτεϊνικού θολώματος

Αρχικά, ο τρόπος με τον οποίο σχηματίζεται το πρωτεϊνικό θόλωμα περιγράφηκε ως πορεία δυο σταδίων: Στο πρώτο στάδιο, οι πρωτεΐνες του οίνου ανταποκρίνονται σε ερεθίσματα όπως το pH, το αλκοόλ ή η υψηλή θερμοκρασία για να ξεδιπλώσουν τις χωρικές δομές τους. Στο δεύτερο στάδιο, οι εκτεθειμένες πεπτιδικές αλυσίδες και τα πολλαπλά υπολείμματα αμινοξέων των πρωτεϊνών συσσωματώνονται και κροκιδώνονται, με αποτέλεσμα τον τελικό σχηματισμό θολώματος ([Liu et al., 2023](#)).

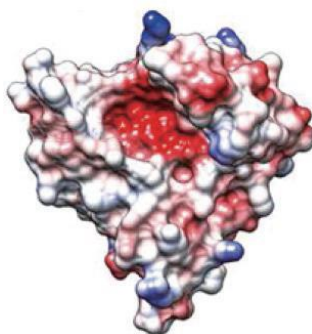
Στο στάδιο όπου οι πρωτεΐνες ξεδιπλώνονται και συσσωματώνονται, ο τύπος της πρωτεΐνης φαίνεται πως επηρεάζει τις ιδιότητες των συσσωματωμάτων που παράγονται. Οι πρωτεΐνες TLP έτειναν να παράγουν πολυμερή μικρότερα από 150 nm που ήταν αόρατα. Ωστόσο, οι χιτινάσες μπορούσαν να κροκιδωθούν γρήγορα και να παράγουν εμφανώς μεγαλύτερα συσσωματώματα, γενικά μεγαλύτερα από 1 μm. Η τελευταία έρευνα διαπίστωσε ότι τόσο οι χιτινάσες όσο και τα TLP είχαν μεγάλο αριθμό δισουλφιδικών δεσμών ([Liu et al., 2023](#)). Αυτοί οι δισουλφιδικοί δεσμοί ήταν χρήσιμοι για το σχηματισμό μιας εξαιρετικά σταθερής δομής δακτυλίου, καθιστώντας τους εγγενώς ανθεκτικούς στην ενζυματική δραστηριότητα των παθογόνων. Φυσικά, υπήρχαν πολλές πρωτεΐνες που δεν παρήγαγαν θολότητα στα κρασιά, συμπεριλαμβανομένης της μαννοπρωτεΐνης ζύμης, της ιμπερτάσης σταφυλιού, της γλυκοπρωτεΐνης του κυτταρικού τοιχώματος του σταφυλιού και της γλυκοπρωτεΐνης πλούσιας σε αραβινόζη, γαλακτόζη ή αραβινογαλακτόζη. Οι συνδυαστικές βιβλιοθήκες πεπτιδίων προσδέματος (CPLL) και η διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (DSC) αποδείχθηκαν ότι οι θερμοσταθερότητες διαφορετικών τύπων πρωτεϊνών

στα κρασιά ήταν διαφορετικές και οι χιτινάσες γενικά δεν ήταν τόσο σταθερές όσο οι TLP. Υπό τις ίδιες συνθήκες, όταν η θερμοκρασία ξεπερνούσε τους 40 °C, η χιτινάση μπορούσε να μετουσιωθεί μέσα σε λίγα λεπτά. Επιπλέον, οι θερμοκρασίες ξεδίπλωσης των χιτινασών και των TLP ήταν επίσης διαφορετικές. Όπως φαίνεται στον παρακάτω Πίνακα, η θερμοκρασία αποδιάταξης της χιτινάσης ήταν 55 °C, ενώ η χαμηλότερη θερμοκρασία αποδιάταξης των ασταθών TLP ήταν 56 °C, γεγονός που έδειξε ότι η σταθερότητα της χιτινάσης ήταν σχετικά ανεπαρκής.

Πίνακας 3. Γενικές ιδιότητες χιτινασών και TLPs (Liu et al.,2023)

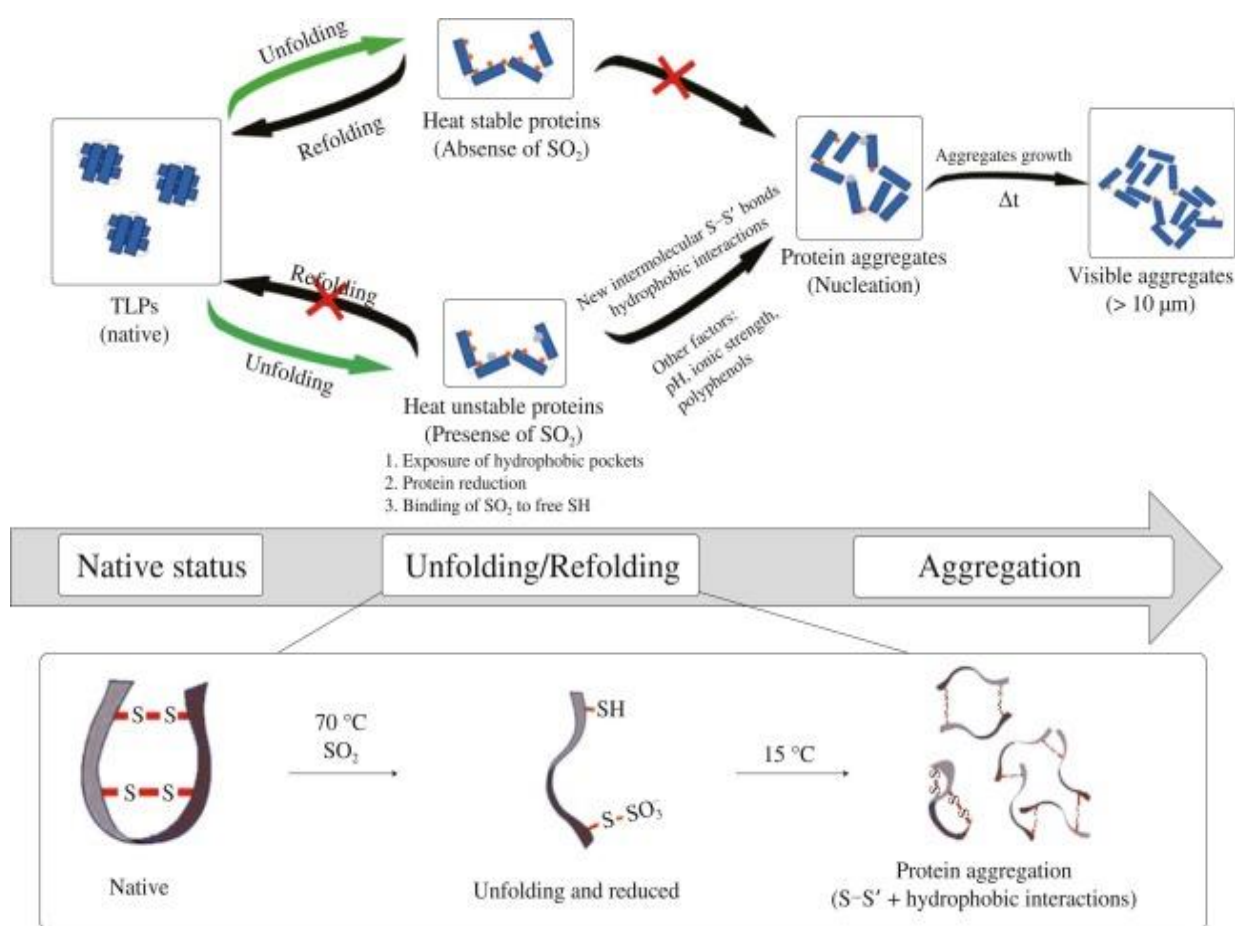
Ιδιότητα	Χιτινάσες	Ασταθή TLPs	Σταθερά TLPs
Θερμοκρασία αποδιάταξης	55 °C	56 °C	61–62 °C
Χαρακτηριστικά συσσωμάτωσης	Εμφανής συσσωμάτωση (≥ 1 μm)	Εμφανής συσσωμάτωση (≥ 1 nm)	μικροσυσσωμάτωση (< 150 nm)
Τάση δημιουργίας συσσωματώματος	Αυτό-συσσωματώνονται	Αυτό-συσσωματώνονται	Συσσωματώνονται με άλλα συστατικά του οίνου

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι ορισμένα ισομερή των LTP πρωτεϊνών μπορούν αντιστρεπτά να ξεδιπλώνουν την μοριακή τους δομή έπειτα από θέρμανση και ψύξη και να επανέρχονται αργότερα στην αρχική τους δομή, ενώ υπάρχουν και άλλα ισομερή που μη αντιστρεπτά χαλάει η αρχική τους διαμόρφωση, και αυτά τελικά είναι υπεύθυνα για τη δημιουργία τελικά συσσωματωμάτων και θολωμάτων (Liu et al., 2023). Παρόλο που διαφορετικά ισομερή LTP έχουν διαφορετική συμπεριφορά και επίδραση στην δημιουργία θολωμάτων, έχει βρεθεί ότι παρουσιάζουν μεγάλες δομικές ομοιότητες μεταξύ τους. Για παράδειγμα, τρία ισομερή της *Vitis vinifera* thaumatin like protein 1 (VVTL1) μελετήθηκαν με κρυσταλλογραφία και βρέθηκε ότι παρόλο που εμφανίζουν διαφορετική υδροφοβικότητα, όλα αποτελούνται από 3 δομικές περιοχές που σταθεροποιούνται με 8 δισουλφιδικούς δεσμούς και περιλαμβάνουν μια όξινη κοιλότητα στην οποία είναι δυνατό να προσδεθούν μικρά μόρια, όπως φαινολικά (Εικόνα ...). (Liu 2023).



Εικόνα 11. Μοριακή απεικόνιση της επιφάνειας της πρωτεΐνης VVT1 (Liu et al., 2023).

Επίσης, από μελέτες των θολωμάτων έχει βρεθεί ότι αυτά δεν αποτελούνται αποκλειστικά από πρωτεΐνες, αλλά και από φαινολικά μόρια και πολυσακχαρίτες (Liu 2023) και διάφοροι άλλοι παράγοντες εκτός των πρωτεϊνών επηρεάζουν τον σχηματισμό τους. Οι Van Sluyter et al. [Ref.1 στο Liu et al., 2023] υποστηρίζουν ότι ο σχηματισμός θολώματος μπορεί να θεωρηθεί ως μηχανισμός τριών σταδίων: αποδιάταξη των πρωτεϊνών, αυτοσυσσωμάτωση των πρωτεϊνών και σύζευξη μεταξύ διαφορετικών συσσωματωμάτων. Μελετώντας την κρυσταλλική δομή των πρωτεϊνών TLP, απέδειξαν ότι υπάρχει μία ασταθής δομή των TLP που σταθεροποιείται με δισουλφιδικούς δεσμούς, οι οποίοι καταστρέφονται έπειτα από θέρμανση (Εικόνα ..παρακάτω...). Στο τελευταίο αυτό στάδιο, σημαντικός φαίνεται να είναι ο ρόλος της ιοντικής ισχύος, της παρουσίας θειώδους και των πολυφαινολών (Liu et al., 2023).



Εικόνα 12. Σχηματική αναπαράσταση δημιουργίας πρωτεϊνικού θολώματος στους λευκούς οίνους (Liu et al., 2023)

4.2 Παράγοντες που επιδρούν στην εκδήλωση πρωτεϊνικού θολώματος

Η μετουσίωση ορισμένων πρωτεϊνών κρασιού έχει ως αποτέλεσμα τη συσσωμάτωση και την κροκίδωση, οδηγώντας στον σχηματισμό θολού εναιωρήματος (Cosme et al., 2020). Αυτό συμβαίνει διότι με την πάροδο του χρόνου, υπάρχει μια παραλλαγή στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης, εκθέτοντας πιθανώς υδρόφοβες ομάδες, πυροδοτώντας τη συσσώρευση. Οι πρωτεΐνες ξεδιπλώνονται πλήρως σε υψηλότερες θερμοκρασίες (70 °C) και έχουν μεγαλύτερη τάση προς συσσωμάτωση σε υψηλότερο pH (pH 4,0), προκαλώντας ένα οπτικό θόλωμα στον οίνο, υπεύθυνο για το οποίο φαίνεται να είναι το μεγαλύτερο μέρος των πρωτεϊνών που εντοπίστηκε στη περιοχή των μικρών έως μέσων MB. Για αρκετά χρόνια, οι μελέτες που γίνονταν σχετικά με το σχηματισμό του πρωτεϊνικού θολώματος στους οίνους εστίαζαν στις ίδιες τις πρωτεΐνες. Άλλες μελέτες, έχουν δείξει ότι η αστάθεια της πρωτεΐνης δεν σχετίζεται με την ολική περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη του οίνου και ως εκ τούτου η δυνατότητα του να σχηματίζει θόλωμα δεν γίνεται

προβλέπιμη από τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης του [\(Bayly & Berg, 1967\)](#). Στην περίπτωση που συμβαίνει αυτό, υπάρχουν δύο εναλλακτικές υποθέσεις για να εξηγηθεί η αδιαλυτότητα των πρωτεϊνών: είτε οι μεμονωμένες πρωτεΐνες συμπεριφέρονται διαφορετικά ως προς την ευαισθησία τους στη θερμική μετουσίωση, συμβάλλοντας διαφορετικά στο σχηματισμό του θολώματος, οπότε ένα μόνο μέρος από το μίγμα των πρωτεϊνών θα είναι υπεύθυνο για την αστάθεια και όχι ολόκληρη η πρωτεΐνη, είτε αν και εξαρτάται από πρωτεΐνες, η ανάπτυξη θολώματος στους οίνους ελέγχεται συνδυαστικά και από άλλους μη πρωτεϊνικούς παράγοντες [\(Liu et al., 2023\)](#).

4.2.1 pH

Έχοντας ως δείγμα έναν λευκό οίνο, διαπιστώθηκε από ερευνητές πως με αύξηση της τιμής του pH από 2.5 έως 7.5 ο οίνος γινόταν πιο σταθερός απέναντι στην θερμότητα και κατ'επέκταση ελαττώθηκε σημαντικά το δυναμικό σχηματισμού πρωτεϊνικής θολότητας που οφειλόταν σε αυτήν. Ωστόσο δεν διευκρινίστηκε ακριβώς η σημασία του pH ως παράγοντα δημιουργίας και αναστολής της πρωτεϊνικής θολερότητας στο εύρος των τιμών που συναντώνται στους οίνους [\(Waters et al., 2005\)](#).

Σε υψηλές τιμές pH του κρασιού (π.χ., 3,6 και 3,8), τα μόρια πρωτεΐνης πλησιάζουν το pI, χωρίς καθαρό φορτίο ή ασθενή θετικά ή αρνητικά φορτία. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, οργανικά οξέα ασθενώς φορτισμένα (όπως τρυγικό οξύ και κιτρικό οξύ δεν μπορούν να αλληλεπιδράσουν ηλεκτροστατικά με ισχυρό τρόπο με τις πρωτεΐνες, προκαλώντας ασθενέστερη επίδραση σταθεροποίησης στο δυναμικό σχηματισμού πρωτεϊνικής θολότητας. Αντίθετα, οργανικά οξέα με ισχυρότερο φορτίο σε υψηλές τιμές pH (όπως το γλυκονικό, το ηλεκτρικό και το μηλικό οξύ συμμετέχουν σε ισχυρότερες ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με τις πρωτεΐνες του κρασιού, μειώνοντας το δυναμικό σχηματισμού θολότητας [\(Batista et al., 2010\)](#).

4.2.2 Πολυσακχαρίτες

Οι πολυσακχαρίτες του οίνου είναι μακρομόρια των οποίων η παρουσία και οι αλληλεπιδράσεις με άλλα συστατικά του, μπορούν να οδηγήσουν στη διαμόρφωση των τεχνολογικών και οργανοληπτικών χαρακτηριστικών της ποιότητας του. Οι πολυσακχαρίτες συμμετέχουν στο σχηματισμό κολλοειδών σωματιδίων μέσω των αλληλεπιδράσεών τους με τις τανίνες και τις πρωτεΐνες του οίνου λόγω των υδρόφιλων

ιδιοτήτων τους, με κρίσιμες επιπτώσεις στη διαύγεια και τη σταθερότητα των τελικών οίνων. Οι πολυσακχαρίτες του οίνου αναφέρθηκαν αρχικά ως «προστατευτικά κολλοειδή», καθώς τροποποιούν τη διαύγεια και τη σταθεροποίηση του οίνου αναστέλλοντας ή περιορίζοντας τη συσσωμάτωση, την κροκίδωση και την καθίζηση των κολλοειδών σωματιδίων, όπως για την προστασία από την κρυστάλλωση τρυγικού άλατος και το σχηματισμό θολότητας ([HY Zhai et al., 2023](#)).

Ο βαθμός στον οποίο επηρεάζουν αυτά τα χαρακτηριστικά εξαρτάται από τη συγκέντρωση και τις φυσικοχημικές ιδιότητες όλων των ειδών που εμπλέκονται σε αυτές τις αλληλεπιδράσεις. Συνολικά, η δομή, το μέγεθος και ο τύπος των πολυσακχαριτών είναι βασικά συστατικά που διέπουν την επιτυχία και την ένταση των αλληλεπιδράσεών τους με άλλα είδη ([HR Jones-Moore et al., 2022](#)). Οι πολυσακχαρίτες θεωρούνται υπεύθυνοι, όταν βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις, για την αύξηση της αστάθειας των πρωτεϊνών. Ωστόσο το επίπεδο της συγκέντρωσης στο οποίο αρχικά μελετήθηκαν (μεγαλύτερο από 17g/L) αφήνει περιθώρια αμφισβήτησης της επίδρασης του συγκεκριμένου παράγοντα σε περιβάλλον οίνου, το οποίο χαρακτηρίζεται από σημαντικά μικρότερη περιεκτικότητα σε πολυσακχαρίτες. Παρόλα αυτά, η ανάλυση των μαννοπρωτεϊνών των ζυμών ως παράγοντες που προστατεύουν από το πρωτεϊνικό θόλωμα έχει αρχίσει να προσφέρει ικανοποιητικές εναλλακτικές στην εφαρμογή μεθόδων πρωτεϊνικής σταθεροποίησης των οίνων ([E. J. Waters et al., 2005](#)).

4.2.3 Ιοντική Ισχύς

Τα δισθενή ιόντα διαδραματίζουν ενδεχομένως σημαντικό ρόλο στην πρωτεϊνική θολότητα, εφόσον η μείωση αυτών έχει συσχετιστεί με αύξηση του σχηματισμού πρωτεϊνικού θολώματος. Ο χαλκός επίσης έχει συσχετιστεί με το πρωτεϊνικό ίζημα στους οίνους, χωρίς ωστόσο να έχει διαπιστωθεί αν επιδρά σε αυτό κατά κάποιον τρόπο ή απλώς συνδέεται με τις πρωτεΐνες των οίνων ([Waters et al., 2005](#)). Επιπροσθέτως, τα θειικά ιόντα προάγουν τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παρόντων στον οίνο πρωτεϊνών. Η παρουσία του HSO_3^- προκαλεί τη διάσπαση των ενδοδισουλφιδικών δεσμών των πρωτεϊνών που μοιάζουν με θαυματίνη, ενισχυμένη από την υψηλή θερμοκρασία που προκαλείται από την ανάπτυξη αυτών των πρωτεϊνών. Οι εκτεθειμένες υδρόφοβες επιφάνειες και τα υπολείμματα κυστεΐνης που περιέχονται σε αυτές συμβάλλουν στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών. Ο σχηματισμός πρωτεϊνών S-θειοθειικών από την αντίδραση HSO_3^- και δισουλφιδικών δεσμών προάγει το σχηματισμό δια-δισουλφιδικών

δεσμών μεταξύ πρωτεϊνών που μοιάζουν με θαυματίνη που ευθύνονται για τη κροκίδωση πρωτεϊνών κρασιού. Τέλος, το θειικό οξύ επιβεβαιώθηκε ότι παίζει ρόλο στο σχηματισμό θολώματος, πιθανόν μετατρέποντας διαλυτά συσσωματώματα σε μεγαλύτερα ορατά σωματίδια ([M. Marangon et al, 2011](#)).

4.2.4 Πολυφαινόλες

Τα εν λόγω μακρομόρια επιδρούν στο πρωτεϊνικό θόλωμα λόγω των συμπλόκων που σχηματίζουν με τις πρωτεΐνες. Ο εν λόγω αϋδρόφοβος μηχανισμός οφείλεται στις θέσεις φαινολικής δέσμευσης των πρωτεϊνών, οι οποίες αυξάνονται με τη μετουσίωση αυτών εξαιτίας περιβαλλοντικών παραγόντων όπως, λόγω χάρη, η θέρμανση. Η σύνδεση των δύο αυτών κατηγοριών μακρομορίων βρέθηκε ότι αφορά έως και το 50% της πρωτεΐνης του οίνου ([E. J. Waters et al., 2005](#)). Πιο συγκεκριμένα, έχει επιβεβαιωθεί πως οι πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με φαινολικές ενώσεις του οίνου εξαιτίας των υψηλών θερμοκρασιών περιβάλλοντος για παρατεταμένη διάρκεια αποθήκευσης. Μεταξύ των φαινολικών ενώσεων του λευκού οίνου, οι προανθοκυανιδίνες/προκυανιδίνες (πολυμερή μονομερών κατεχίνης και επικατεχίνης) είναι ιδιαίτερα σημαντικές στη διαδικασία σχηματισμού θολότητας. Για παράδειγμα, η παρουσία των προανθοκυανιδινών στους οίνους συνετέλεσε στη δημιουργία θολώματος αλληλεπιδρώντας με τις πρωτεΐνες του οίνου, το οποίο βρέθηκε ότι επιδεινώθηκε με μια αύξηση του pH κατά 1.2 ([Yokotsuka and Singleton, 1995](#)). Πολλές άλλες φαινολικές ενώσεις, όπως (E)-p-κουμαρικό οξύ, (E)-καφεϊκό οξύ, βανιλικό οξύ, πρωτοκατεχουϊκό οξύ, συριγικό οξύ, γαλλικό οξύ, φερουλικό οξύ, σικιμικό οξύ, αιθυλεστέρας p-κουμαρικού οξέος, τυροσόλη και κερσετίνη, έχουν επίσης βρεθεί σε ιζήματα πρωτεΐνης κρασιού ([Wendell Albuquerque et al., 2021](#)).

Ακόμα, η δημιουργία του πρωτεϊνικού θολώματος στους λευκούς οίνους συνδέεται με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών και τανινών που λαμβάνουν χώρα στις υδρόφοβες θέσεις δέσμευσης τανινών - πρωτεϊνών. Έχει διαπιστωθεί ότι οι ταννίνες που προέρχονται από τα κοτσάνια των σταφυλιών έχουν ιδιαίτερη τάση να αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες του σταφυλοχυμού όταν τα σταφύλια πιεστούν ([Cosme et al., 2020](#)). Η σχετική συγκέντρωση ταννινών και πρωτεϊνών σε έναν οίνο καθορίζει το μέγεθος και τη διαλυτότητα των συσσωματωμάτων πρωτεΐνης-ταννίνης και, επομένως, τη σταθερότητά τους. Πιο συγκεκριμένα, η συγγένεια ταννίνης με τις πρωτεΐνες εξαρτάται από τον αριθμό των υδροξυλομάδων καθώς και από τον βαθμό πολυμερισμού του μορίου (Mulkey & Jerumanis, 1983), ενώ η συγγένεια των πρωτεϊνών PR για τη δέσμευση ταννινών είναι πιο

περίπλοκη και περιλαμβάνει περιεκτικότητα σε προλίνη, υδροφοβία επιφάνειας και την κατάσταση και την εξέλιξη της πρωτεϊνικής διαμόρφωσης υπό συνθήκες οίνου ([Romanini et al., 2021](#)).

4.2.5 Φυσικό περιβάλλον και κλιματολογικές συνθήκες

Η συγκέντρωση των θερμικά ασταθών πρωτεϊνών μπορεί ακόμα να εξαρτάται από την υγιεινή κατάσταση των σταφυλιών, το terroir και τις κλιματολογικές συνθήκες κατά την ωρίμανση ([Filipe-Ribeiro et al., 2022](#)). Ωστόσο πολλοί από τους παράγοντες που επιδρούν άμεσα στον σχηματισμό των πρωτεϊνικών θολωμάτων παραμένουν, μέχρι και σήμερα, αδιευκρίνιστοι ([Cosme et al., 2020](#)).

Ερευνητές, διαπίστωσαν ότι η συγκέντρωση πρωτεϊνών στο χυμό σταφυλιών που παράγεται από αμπέλια υπό υδάτινη πίεση ήταν υψηλότερη από αυτή της κανονικής άρδευσης. Διαπιστώθηκε ότι ο όγκος των ραγών του σταφυλιού αυξάνεται και αυτό μπορεί να οφείλεται στην επίδραση της απορρόφησης νερού, γεγονός που οδήγησε σε μείωση της συγκέντρωσης του χυμού. Ήταν γνωστό ότι το στρες του νερού επηρέαζε τον όγκο των καρπών του σταφυλιού. Για παράδειγμα, πειράματα που έγιναν σε σταφύλια «Riesling» έδειξαν ότι η συγκέντρωση πρωτεΐνης του οίνου «Riesling» αυξήθηκε μετά την καταπόνηση του νερού. Αν και δεν υπήρχε σημαντική διαφορά μεταξύ της επεξεργασίας υδατικής καταπόνησης και της κανονικής επεξεργασίας άρδευσης όσον αφορά τη σύσταση πρωτεΐνης, ο κίνδυνος αστάθειας του λευκού οίνου ήταν αντίστοιχα υψηλότερος λόγω της αύξησης της συγκέντρωσης πρωτεΐνης μετά την επεξεργασία του υδατικού στρες ([Liu et al., 2023](#)).

4.2.6 Τρόπος συγκομιδής

Όσον αφορά την μηχανική συγκομιδή δοκιμάστηκε ότι ο μηχανικός τραυματισμός θα μπορούσε να προκαλέσει την έκκριση πρωτεϊνών PR και να αυξήσει την περιεκτικότητα και τη δραστηριότητα των χιτινασών στις ράγες του σταφυλιού. Οι ερευνητές υποψιάζονταν ότι η μηχανική δύναμη που ασκούνταν στα αμπέλια επηρέαζε τη συγκέντρωση των πρωτεϊνών PR. Παραδείγματος χάρη, η μηχανική συγκομιδή θα μπορούσε να προκαλέσει φυσική βλάβη στο σπάσιμο του μίσχου. Σε πολλές περιπτώσεις, το διάστημα μεταξύ της συγκομιδής και της επεξεργασίας των σταφυλιών στο οινοποιείο μπορεί να είναι έως και 24 ώρες ή και μεγαλύτερο. Αυτό ήταν αρκετό για να καταστεί

δυνατή η μεγάλης κλίμακας έκφραση των γονιδίων των πρωτεϊνών PR στις ράγες του σταφυλιού που ήταν ακόμα μεταβολικά ενεργά. Διάφορες μέθοδοι συγκομιδής και συνθήκες επεξεργασίας θα μπορούσαν επίσης να επηρεάσουν τη συγκέντρωση των πρωτεϊνών PR στους οίνους.

Ορισμένες μελέτες διαπίστωσαν ότι η ποσότητα μπεντονίτη που απαιτείται για τη διαύγαση της μηχανικής συγκομιδής ήταν διπλάσια από τη χειροκίνητη συγκομιδή και η τελευταία συνήθως προκαλούσε μικρότερη ζημιά στα μούρα του σταφυλιού ([Liu et al., 2023](#)).

4.2.7. Θερμοκρασία Θέρμανσης και ψύξης - Heating and cooling times

Το τεστ θέρμανσης χρησιμοποιείται σε μεγάλο βαθμό στην οινοποίηση, καθώς συμβάλλει στον προσδιορισμό της ποσότητας του μπεντονίτη που απαιτείται να προστεθεί στη συνέχεια προκειμένου να αντιμετωπιστεί κατά το βέλτιστο τρόπο το πρωτεϊνικό θόλωμα στους οίνους. Σε σχετική έρευνα μελετήθηκαν 3 οίνοι βάσης αφρωδών κρασιών ως προς τη θολερότητα σε τιμές θερμοκρασίας υψηλότερες και, αντίστοιχα, χαμηλότερες από τις θερμοκρασίες που εφαρμόζονται σε τυπικά εργαστηριακά τεστ θέρμανσης, προκειμένου να εκτιμηθεί αν ο χρόνος θέρμανσης καθώς και ο ακόλουθος χρόνος ψύξης του οίνου σχετίζεται με την δημιουργία πρωτεϊνικού θολώματος. Από την παρούσα έρευνα προέκυψε πως όλα τα κρασιά (στα οποία εφαρμόστηκε θέρμανση στους 80°C και ψύξη στους 20°C) παρουσίαζαν τόσο αύξηση θολερότητας όσο αυξάνονταν οι παραπάνω χρόνοι κατά τη διεξαγωγή του τεστ. Σημαντική ήταν ωστόσο και η αύξηση της θολερότητας ως επακόλουθο, κατά αποκλειστικότητα της αύξησης του χρόνου ψύξης στα μοντέλα οίνων ([Cosme et al., 2020](#)).

Πρακτικά, διπλασιάζοντας τις ώρες εφαρμογής ψύξης σε σχέση με τις ώρες θέρμανσης των δειγμάτων παρατηρήθηκε αύξηση της θολερότητας σε ποσοστό 50% ([J.M. McRae et al., 2018](#)). Βάσει των προαναφερόμενων δεδομένων, πλέον θεωρείται αποτελεσματικότερη η εφαρμογή ψύξης σε ελαφρώς πιο εκτεταμένο βαθμό εν συγκρίσει της προγενέστερης θέρμανσης του οίνου, προκειμένου να επιτευχθούν αποτελέσματα πρόβλεψης της μελλοντικής πρωτεϊνικής θολερότητας όμοια με εκείνα που προκύπτουν από πιο χρονοβόρα τεστ της ίδιας μορφής στα οποία έχουν εφαρμοστεί εκτεταμένοι χρόνοι θέρμανσης. Συμπερασματικά, η μέθοδος αυτή παρουσιάζει ποικίλα οφέλη όπως η εξοικονόμηση χρόνου, οικονομικών και ενεργειακών πόρων, καθώς και οργανοληπτικά

πλεονεκτήματα λόγω του μικρότερου χρόνου έκθεσης του οίνου σε ακραίες συνθήκες θερμοκρασίας που τον απαλλάσσει από τα “φρέσκα” πρωτογενή του αρώματα.

4.2.8 Επίδραση Θειώδους

Ένας ακόμη παράγοντας που επιδρά στο θόλωμα του οίνου και ο οποίος αναφέρθηκε από τους Marangon et al. είναι τα θειικά. Από τη μία πλευρά, η επίδραση ρύθμισης του θεικού μπορεί να είναι η προώθηση της υδρόφοβης αλληλεπίδρασης επηρεάζοντας τη διαπερατότητα, οδηγώντας έτσι τη συσσώρευση πρωτεϊνών. Από την άλλη, μπορεί να γίνει με την αύξηση της ιοντικής ισχύος του μέσου για την καταστολή της ηλεκτροστατικής απόθησης μεταξύ των πρωτεϊνών. Σε μια πρόσφατη μελέτη, το όξινο θεικό κάλιο χρησιμοποιήθηκε ως ρυθμιστής θολότητας για τη μελέτη των ιδιοτήτων ορισμένων TLP που προκάλεσαν θολότητα. Ταυτόχρονα, οι Chagas et al. μέσω ενός πειράματος προσομοίωσης διαλύματος οίνου, πίστευαν ότι το διοξειδίο του θείου ήταν επίσης ένας βασικός παράγοντας στο σχηματισμό της θολώματος. Σε μελέτες άλλων ερευνητών, η αλληλεπίδραση μεταξύ διοξειδίου του θείου και πρωτεΐνης στο διάλυμα οίνου είχε επίσης επαληθευτεί ([Liu et al., 2023](#)).

5. Μέθοδοι Ελέγχου Πρωτεϊνικής Σταθερότητας

Για τη μείωση του κινδύνου θολότητας ή/και σχηματισμού οργανικών εναποθέσεων στο λευκό οίνο που σχετίζονται με την εκάστοτε θερμοευαίσθητη πρωτεΐνη οίνου ή κολλοειδή εναιωρήματα που κατακρημνίζονται πάνω από τον οίνο πριν από την εμφιάλωση, διάφορα test σταθερότητας πρωτεϊνών έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιούνται σήμερα στην οινοποιία. Αυτές οι δοκιμές εκτελούνται επίσης για τον καθορισμό της δόσης του παράγοντα διαλύγασης (π.χ. μπεντονίτης) που είναι απαραίτητος στην επεξεργασία για την πρωτεϊνική σταθεροποίηση του οίνου. Γενικά, οι εν λόγω δοκιμές περιλαμβάνουν τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε ολική πρωτεΐνη του οίνου ή μεθόδους που συνεπάγονται μείωση της διαλυτότητας πρωτεΐνης του οίνου με εφαρμογή θερμότητας ή χημικών ουσιών (Cosme et al., 2020).

5.1 Test Θέρμανσης

Όπως προαναφέρθηκε, αποτελεί την πιο χρησιμοποιούμενη μέθοδο στη βιομηχανία για την πρόβλεψη του δυναμικού σχηματισμού θολότητας οίνου και τον προσδιορισμό της σχετικής αστάθειας πρωτεΐνης, που είναι ίσως η πιο αξιόπιστη μέθοδος για την πρόβλεψη του σχηματισμού θολότητας/ιζήματος στη φιάλη κατά την αποθήκευση. Οι μηχανισμοί συσσωμάτωσης πρωτεϊνών αλλάζουν μεταξύ της μακροχρόνιας αποθήκευσης σε χαμηλότερες θερμοκρασίες και θέρμανση και μπορεί να επηρεαστεί από το ισοηλεκτρικό σημείο της πρωτεΐνης και το pH του διαλύματος. Δεν υπάρχει τυπικό πρωτόκολλο για την εκτέλεση της θέρμανσης, καθώς πολλοί ερευνητές και οι οινοβιομηχανίες χρησιμοποιούν διαφορετικούς χρόνους και θερμοκρασίες θέρμανσης. Ένα από τα περιγραφόμενα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι η αύξηση της οξείδωσης φαινολικών ενώσεων και συμπύκνωση με πρωτεΐνες σε υψηλές θερμοκρασίες, η οποία μπορεί να προκαλέσει κατακρήμνιση πρωτεϊνών και επομένως, να οδηγήσει σε υπερεκτίμηση των αποτελεσμάτων των δοκιμών (Cosme et al., 2020).

Πίνακας 4. Συνθήκες Test θέρμανσης που συνιστώνται για θέρμανση και ψύξη (Cosme et al., 2020)

Θέρμανση	Ψύξη
60 °C για 4 ημέρες	4 °C για 6 ώρες
80 °C για 2 ώρες	4 °C για 16 ώρες
80 °C για 2 ώρες	0 °C για 2 ώρες
80 °C για 2 ώρες	4 °C για 2 ώρες
80 °C για 2 ώρες	20 °C για 3 ώρες
80 °C για 3 ώρες	20 °C για 30 λεπτά
80°C για 6 ώρες	4 °C για 16 ώρες
80 °C για 30 λεπτά	Αδιευκρίνιστος χρόνος ψύξης
90 °C για 1 ώρα	4 °C για 18 ώρες
90 °C για 1 ώρα	4 °C για 6 ώρες

5.2 Test τριγλωροξικού οξέος (TCA Test)

Η δοκιμή τριγλωροξικού οξέος (TCA) καθιερώθηκε σχετικά με την ικανότητα αυτού του οξέος να κατακρημνίζει όλες τις πρωτεΐνες που υπάρχουν στο κρασί,

αποδίδοντας αποτελέσματα κοντά σε αυτά που λαμβάνονται από τον προσδιορισμό της ολικής πρωτεΐνης του οίνου. Η δοκιμή TCA αποτελείται από την προσθήκη 1 mL διαλύματος TCA σε 55% (v/v) σε 10 mL κρασιού ακολουθούμενη από θέρμανση σε λουτρό νερού στους 100 °C για 5 λεπτά ψύξη και παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά πριν μετρηθεί ο σχηματισμός θολότητας. Αυτή η δοκιμή μπορεί να συσχετιστεί με τη σταθερότητα της πρωτεΐνης. Ωστόσο δεν αποδίδει ικανοποιητικά αποτελέσματα σε βιομηχανική κλίμακα, γιατί υπερεκτιμά τη δόση του διαυγαστικού παράγοντα που απαιτείται για τη σταθεροποίηση του (Cosme et al., 2020).

5.3 Test Ταννίνης

Το test καθίζησης ταννίνης βασίζεται στην υπόθεση ότι οι πρωτεΐνες του οίνου θα μπορούσαν να καθιζάνουν κατά την αποθήκευση του οίνου με δέσμευση με φαινολικές ενώσεις και, κατ' επέκταση, να ληφθούν πληροφορίες σχετικά με την ποσότητα των πρωτεϊνών του οίνου που μπορούν να κατακρημνιστούν από τις τανίνες. Προηγούμενη εργασία που πραγματοποιήθηκε από Yokotsuka et al. έδειξε ότι η ικανότητα των φαινολικών ενώσεων να συνδέονται με πρωτεΐνες είναι ανάλογη του βαθμού πολυμερισμού τους. Αυτή η δοκιμή επηρεάζεται από πολλούς εγγενείς παράγοντες του οίνου, συγκεκριμένα από το pH, την περιεκτικότητα σε ολική πρωτεΐνη, την περιεκτικότητα σε σίδηρο, χαλκό και κάλιο και, ως εκ τούτου, δεν είναι καλός προγνωστικός παράγοντας πρόβλεψης της δόσης του διαυγαστικού παράγοντα που απαιτείται στην συνέχεια για τη σταθεροποίηση των οίνων (Cosme et al., 2020).

5.4 Bentotest

Το bentotest χρησιμοποιεί ένα διάλυμα φωσφομολυβδικού οξέος σε HCl το οποίο καθιζάνει τις πρωτεΐνες του οίνου εξουδετερώνοντας το πρωτεϊνικό φορτίο, οδηγώντας σε συσσωμάτωση με το ιόν του μολυβδαινίου.

Αυτή η διαδικασία μπορεί να κατακρημνίσει όλες τις πρωτεΐνες στο δείγμα του οίνου και χρησιμοποιείται κυρίως για τον προσδιορισμό της δόσης του προστιθέμενου μπεντονίτη. Ωστόσο, αυτή η δοκιμή έχει το μειονέκτημα της υπερεκτίμησης του παράγοντα διαύγασης που απαιτείται για την πρωτεϊνική σταθεροποίηση του οίνου (Cosme et al., 2020).

5.5 Test Αιθανόλης

Η δοκιμή αυτή καθιερώνεται στη μείωση της διηλεκτρικής σταθεράς του μέσου, με αποτέλεσμα τη μείωση της διαλυτότητας των πρωτεϊνών, που οδηγεί στην καθίζηση των λιγότερο διαλυτών πρωτεϊνικών κλασμάτων στο pH του οίνου. Αυτή η δοκιμή επηρεάζεται σημαντικά από τη συγκέντρωση της συνολικής πρωτεΐνης, το pH, την πηκτίνη, την τρυγική περιεκτικότητα σε οξύ και ασβέστιο, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε διαφορές στον σχηματισμό θολότητας του οίνου. Μία άλλη μελέτη απέδειξε ότι οι πολυσακχαρίτες είναι οι βασικές ενώσεις που κατακρημνίζονται από την προσθήκη αιθανόλης στα κρασιά, ακολουθούμενη από τις πρωτεΐνες και τις πολυφαινόλες. Επομένως, όπως και στην διεξαγωγή των προαναφερόμενων test, υπάρχει ο κίνδυνος υπερεκτίμησης της απαιτούμενης ποσότητας μέσου διαύγασης που έπεται να προστεθεί (Cosme et al., 2020).

5.6 Η μέθοδος N.I.R. - Φασματοσκοπική Μέθοδος

Η ανάλυση βασίζεται στην τεχνολογία εγγύς υπέρυθρης μετάδοσης, η οποία χρησιμοποιείται για τον ακριβή προσδιορισμό ποικίλων παραμέτρων, όπως λόγω χάρη η περιεκτικότητα σε υγρασία, συγκέντρωση λιπιδίων και, στην δοθείσα περίπτωση, η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες. Στην πράξη, το φως οδηγείται μέσω μιας οπτικής ίνας από το περίβλημα ενός λαμπτήρα βολφραμίου-αλογόνου που βρίσκεται στο πίσω μέρος του οργάνου προς τον μονοχρωμάτορα μέσα στα όργανα. Ο μονοχρωμάτορας παρέχει μονοχρωματικό φως σε εύρος φασμάτων από 850 nm έως 1050 nm. Με την μετάδοση του φωτός δια μέσω του δείγματος, το μη απορροφηθέν φως φτάνει στον ανιχνευτή. Εκείνος με τη σειρά του υπολογίζει το ποσοστό του φωτός και στέλνει το αποτέλεσμα στον επεξεργαστή ψηφιακού σήματος, που επικοινωνεί με τον ηλεκτρονικό υπολογιστή ο οποίος υπολογίζει το τελικό αποτέλεσμα (Mihaljev et al., 2015). Πλεονέκτημά της εν λόγω μεθόδου αποτελεί το γεγονός ότι είναι σημαντικά λιγότερο χρονοβόρα από τα προαναφερόμενα test που έχουν χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς για τον προσδιορισμό της ποσότητας του διαυγαστικού παράγοντα και έχει συγκριτικά ακριβέστερες τιμές πρόβλεψης (Cosme et al., 2020).

6. Κατεργασίες Διαύγασης – Μέθοδοι αντιμετώπισης και πρόληψης πρωτεϊνικού θολώματος

Στη λευκή οиноποίηση, οι παράγοντες διαύγασης που προστίθενται συχνότερα στο γλεύκος είναι ο μπεντονίτης και το καζεϊνικό κάλιο. Η κύρια επίδραση του μπεντονίτη είναι η κατακρήμνιση πρωτεϊνών με φορτίο προσρόφησης και εξουδετέρωσης έτσι ώστε να αφαιρούνται τα οξειδωτικά ένζυμα. Έχει επίσης μια περαιτέρω επίδραση σε άλλες αζωτούχες ενώσεις, όπως πολυπεπίδια και αμινοξέα. Το καζεϊνικό κάλιο επηρεάζει κυρίως τη σύνθεση πολυφαινόλης και για αυτό το λόγο οι αντιδράσεις browning εμφανίζονται σπανιότερα στον λευκό οίνο, σταθεροποιώντας το χρώμα του ([M Puig-Deu et al., 1999](#)).

Οι τρόποι που ακολουθούνται για την αντιμετώπιση του πρωτεϊνικού θολώματος αναφέρονται αναλυτικά παρακάτω, ενώ στον πίνακα 5. περιλαμβάνονται οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται με τον χρόνο προσθήκης τους και το ποσοστό μείωσης πρωτεϊνών που προκαλούν.

Πίνακας 5. Χρονομέτρηση (πριν την ζύμωση (BF), κατά τη διάρκεια (DF) και μετά τη ζύμωση (AF)), συνθήκες λειτουργίας και μείωση πρωτεϊνών με νέες μεθόδους σταθεροποίησης πρωτεϊνών χωρίς πρόσθετα ([Daniela Silva-Barbieri et al., 2022](#)).

Μέθοδος Σταθεροποίησης	Χρονική Στιγμή	Συνθήκες Εφαρμογής	Μείωση πρωτεϊνών (%)	Αναφορές
		DF	1.6–1.8 g/L	n/a [Lukic I. et al., 2020]
Βελτίωση κλασικής μεθόδου	Μπεντονίτης	AF	2–3 g/L	67–95% [Lukic I. et al., 2020, Jaeckels N. et al., 2017, Horvat I. et al., 2019]
	Υπερηχογράφημα υψηλής ισχύος	AF	30%/10 λεπτά; 60–90%/5–10 λεπτά	n/a [Celotti E. et al., 2021]
Φυσικές-ενζυματικές-μεικτές θεραπείες	Θέρμανση + ένζυμα	BF	75 °C για 1 λεπτό + 15 mg/L ενζύμων 1	81–84% [Marangon M. et al., 2012]
		AF	75 °C για 2 λεπτά + 2 mL/L ενζύμων 2	80–90% για CHI [Comuzzo P. et al., 2020]

	Υπερδιήθηση	AF	80% διήθημα/20% συγκρατείται, 10 kDa μεμβράνη	n/a	[Sui Y. et al., 2020]
	Υπερδιήθηση + θέρμανση + ένζυμα	AF	62 °C για 10 λεπτά + 30 mg/L ενζύμων 1	30–96%	[Sui Y. et al., 2020]
	Ακίνητοποιημένο ένζυμο που υποστηρίζεται σε χιτοζάνη	AF	Συνεχές PBR 3: 0.3–15 mL/min ροή και 106–260 g/L	4–68% 61–63%	[Benucci I. et al., 2016]
Θεραπείες με βάση την προσρόφιση	Μαγνητικά νανοσωματίδια επικαλυμμένα με ακρυλικό οξύ	AF	10 W για 10 λεπτά (εναπόθεση πλάσματος) και 13.3–25 g/L για 10 λεπτά	>90%	[Mierczynska-Vasilev A. et al., 2019, Mierczynska-Vasilev A. et al., 2017, Mierczynska-Vasilev et al., 2020]
	Ζεόλιθοι	AF	4–8 g/L ζεόλιθων για 1–3 ώρες	>90%	[Mercurio M. et al., 2010, Mierczynska-Vasilev et al., 2019]

Καβουρδισμένοι σπόροι σταφυλιού σε σκόνη	BF	5–15 g/L για 1 ώρα	37–85%	[Romanini E. et al., 2019, Romanini E. et al., 2021]
	AF	25–32 g/L για 1 ώρα	90–98%	[Romanini E. et al., 2019]
Ζιρκόνιο	DF	25 g/L πέλετ σε μεταλλικό κουτί για 3 ημέρες	~90%	[<u>Lucchetta M. et al., 2013</u>]
	AF	Batch: 25 g/L for 72–192 h	>70%	[<u>Marangon M. et al., 2010</u>]
	AF	Συνεχής: 175– 300 BV 4 (~5.7– 3.3 g/L) για 30 λεπτά χρόνου παραμονής	~42%	[<u>Salazar F.N. et al., 2006</u>]
		Λειτουργία κλειστού βρόχου: συσκευασμένο pellet (6,5 L), ταχύτητα ροής 300 L/h για 8– 139 ώρες	~54– 60%	

6.1 Μπεντονίτης ($\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 4\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$)

Όπως έχει προαναφερθεί οι πρωτεΐνες, και συγκεκριμένα εκείνες που προέρχονται από τα σταφύλια, είναι υπεύθυνες για τον σχηματισμό κολλοειδούς θολώματος στους λευκούς οίνους ([Silva-Barbieri et al., 2022](#)). Η καταλληλότερη μέθοδος αντιμετώπισης έως τώρα, είναι κατά κύρια βάση η χρήση του μπεντονίτη (αρνητικά φορτισμένη μοντοριλονιτική άργιλος), αν και μεγάλη πρόοδος έχει σημειωθεί τα τελευταία χρόνια όσον αφορά την αναζήτηση εναλλακτικών μεθόδων αντιμετώπισης ([Bonilla Eguizabal, Elba, 2021](#)). Παράλληλα με τη μηχανική διαύγαση του οίνου χάρη στον μπεντονίτη, επιτυγχάνεται η πρόληψη των θολωμάτων σιδήρου, ενώ ακόμα ένα σημαντικό πλεονέκτημά του αποτελεί η μείωση της οξειδωσιμότητας του γλεύκους, προσροφώντας τις πολυφαινολοξειδάσες.

Η μέθοδος αυτή όμως εμφανίζει σημαντικά μειονεκτήματα, όπως απώλεια του οίνου λόγω σχηματισμού ιζήματος με τον μπεντονίτη και οικονομικούς προβληματισμούς. Σύμφωνα με εκτίμηση του Αυστραλιανού Ινστιτούτου Οίνου AWRI, η παγκόσμια απώλεια κρασιού λόγω της διαύγασης με μπεντονίτη είναι πάνω από 1 δισεκατομμύριο δολάρια ΗΠΑ ετησίως ([Majewski et al., 2011](#)). Όσον αφορά την χρήση του μπεντονίτη ως μέσο διαύγασης διεθνώς, το κόστος του στην βιομηχανία του οίνου ανήκει στην τάξη των 300-500 δολαρίων Ηνωμένων Πολιτειών. Έχει υπολογιστεί ότι το ποσοστό της απώλειας του οίνου ανά φιάλη κατά την κατεργασία με μπεντονίτη αγγίζει τα 3-10% του όγκου του παραγόμενου οίνου ([Waters et al., 2005](#)).

Πρόσθετα προβλήματα αφορούν στη βιωσιμότητα και τα απορρέοντα απόβλητα από την εν λόγω μέθοδο διαύγασης. Επιπλέον, σημαντική είναι και η επίδραση στην γεύση του οίνου ([Pocock et al., 2008](#)), καθώς λόγω του αρνητικού του φορτίου και της μη επιλεκτικής του δράσης, ο μπεντονίτης απορροφά θετικά φορτισμένες ενώσεις, υποβαθμίζοντας το αρωματικό και γευστικό προφίλ του οίνου ([Albuquerque et al., 2021](#)). Κατά συνέπεια, ο μπεντονίτης μπορεί να έχει είτε θετική είτε αρνητική επίδραση στον παραγόμενο οίνο ανάλογα με τους στόχους του κολλαγίματος. Πιο συγκεκριμένα, ο μπεντονίτης, μπορεί να προκαλέσει μερικό αποχρωματισμό ([Waters et al., 2005](#)) και να απομακρύνει θρεπτικά συστατικά, όπως αμινοξέα. Έτσι λοιπόν μαζί με άλλους παράγοντες όπως η καζεΐνη και οι τανίνες, ο μπεντονίτης έχει την ικανότητα να επιταχύνει την καθίζηση των σωματιδίων. Ακόμη, μπορεί να προκληθεί καθίζηση ύστερα από την προσθήκη υπερβολικών ποσοτήτων πρωτεϊνικών παραγόντων διόγκωσης με σκοπό την διόρθωση της ([Ronald S. Jackson et al., 2008](#)). Τυπικές μορφές μπεντονίτη είναι ο

μπεντονίτης νατρίου, ο ενεργοποιημένος με νάτριο μπεντονίτης και ο συνδυασμένος με NaCa μπεντονίτης, οι οποίοι μπορούν να αφαιρέσουν σημαντική ποσότητα ολικών πρωτεϊνών.

6.1.1 Βελτίωση της κλασικής μεθόδου σταθεροποίησης με μπεντονίτη

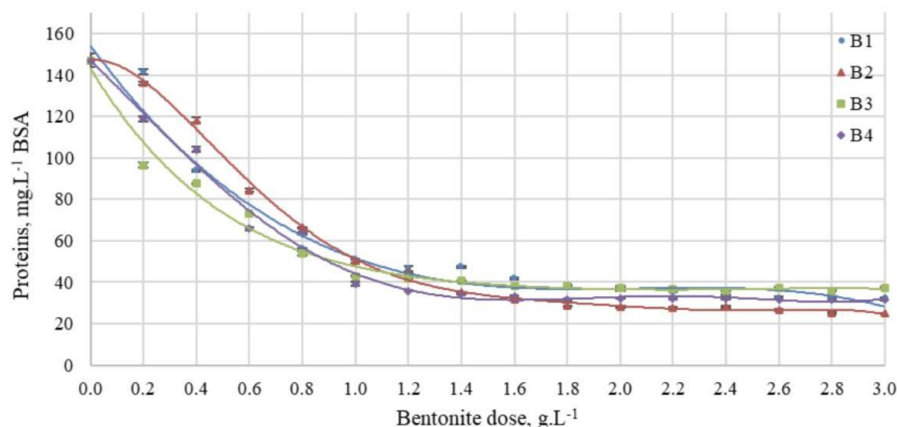
Οι δόσεις μπεντονίτη που είναι απαραίτητες για τη λήψη σταθερών οίνων μπορούν να αλλάξουν ανάλογα με τον τύπο του κρασιού, τον τύπο του μπεντονίτη και τον χρόνο προσθήκης. Η δόση του μπεντονίτη (μετά τη ζύμωση) βρέθηκε να είναι μεταξύ 2-3 g/L για τα λευκά κρασιά Chardonnay, Pinot gris, Malvazija istarska και Silvaner. Σταθερά κρασιά μπορούν να ληφθούν με χαμηλότερες δόσεις μπεντονίτη εάν εφαρμοστούν κατά τη ζύμωση, μειώνοντας τις απώλειες κρασιού και βελτιώνοντας την ποιότητα, ιδιαίτερα στο μέσο ή στο τέλος της ζύμωσης. Οι Lukić και Horvat μελέτησαν την προσθήκη μπεντονίτη πριν, κατά τη διάρκεια και μετά τη ζύμωση για να προσδιορίσουν τις δόσεις που απαιτούνται για την επίτευξη σταθεροποίησης της πρωτεΐνης (Lukić and Horvat, 2020). Πέτυχαν τα καλύτερα αποτελέσματα όταν προστέθηκε μπεντονίτης στη μέση και κοντά στο τέλος της ζύμωσης, μειώνοντας τις δόσεις μεταξύ 14% και 16% σε σύγκριση με τις προσθήκες μετά τη ζύμωση, με βέλτιστες δόσεις μεταξύ 1,6-1,8 g/L. Κατά αυτόν τον τρόπο, αποφεύχθηκαν μέσω της αξιοποίησης της χρονικής στιγμής της προσθήκης του μπεντονίτη οι προαναφερόμενες αρνητικές του επιπτώσεις κατά τον βέλτιστο τρόπο. Επιπλέον, διερευνήθηκε η μείωση των δόσεων του μπεντονίτη βελτιώνοντας τη σταθερότητα του κρασιού αποθηκευοντάς το σε ζυμομύκητες σε υψηλότερες θερμοκρασίες και χαμηλότερο pH πριν από την ψυχρή επεξεργασία (τρυγικό). Κατά αυτόν τον τρόπο, οι απώλειες κρασιού μπορούν να μειωθούν έως και 82,5% σε σύγκριση με την παραδοσιακή επεξεργασία μπεντονίτη, όταν συνδυάζονται η ενσωματωμένη προσθήκη, η φυγοκέντρωση και η βέλτιστη αποθήκευση με τις οινολάσπες.

6.1.2 Ικανότητα αποπρωτεϊνοποίησης

Μια σχετικά πρόσφατη μελέτη που διεξήχθη, έδειξε την αλλαγή του πρωτεϊνικού προφίλ ενός Chardonnay, υπό την επίδραση του μπεντονίτη, συμπεριλαμβάνοντας επιπλέον τον παράγοντα της ικανότητας αποπρωτεϊνοποίησης του εν λόγω μέσου. Ο παραπάνω οίνος ήταν ασταθής και το δείγμα λήφθηκε μετά το στάδιο της αλκοολικής ζύμωσης και πριν από οποιαδήποτε επεξεργασία είχε πραγματοποιηθεί σε αυτό. Το εν

λόγω θόλωμα, αντιμετωπίστηκε με την χρήση τεσσάρων διαφορετικών μπεντονίτων, προμηθευμένα από την βουλγαρική αγορά. Αυτοί οι μπεντονίτες είχαν χαρακτηριστεί ως εξής: B1-ενεργος μπεντονίτης ασβεστίου, B2-νάτριο-ασβέστιο μπεντονίτης, B3-νατριούχος μπεντονίτης και B4-νάτριο μπεντονίτης. Ο εξεταζόμενος οίνος, διαιρέθηκε σε όγκους των 100 mL. Σε αυτούς, με συνεχή ανάδευση (για 5 λεπτά), προστέθηκε μπεντονίτης σε αυξανόμενες δόσεις από 0,1 έως 3 g.L⁻¹ με τη μορφή εναιωρήματος 5%. Ύστερα από την καθίζηση 48 ωρών, το δείγμα οίνου που διαχωρίστηκε, στη συνέχεια μεταγγίστηκε και απομονώθηκε το υγρό από το ίζημα. Αυτό επιτεύχθηκε με την βοήθεια ενός φίλτρου K5 και υποβλήθηκε σε ανάλυση μέσω της μεθόδου Bradford με την τροποποίηση του Stosheck (Owusu-Apenten, 2002). Εφαρμόστηκε φασματοφωτομετρική μέθοδος με τη χρήση Shimadzu UV-1800 UV-VIS φασματοφωτόμετρου. Το αντιδραστήριο πρωτεΐνης παρασκευαζόταν καθημερινά σύμφωνα με την μέθοδο Bradford, ενώ πραγματοποιήθηκε κλασματοποίηση μέσω ηλεκτροφόρησης με τζέλ δωδεκυλοθεικού νατρίου-πολυακρυλαμιδίου. Συγκεκριμένα, η ποσότητα της πρωτεΐνης που βρέθηκε στο πρότυπο οίνο ήταν 147,1 mg.L⁻¹ βόειου ορού αλβουμίνης διαιρεμένη σε εννέα ηλεκτροφορητικά κλάσματα.

Η αλλαγή στη συγκέντρωση της πρωτεΐνης του οίνου που έχει υποστεί επεξεργασία με τα διαφορετικά είδη μπεντονίτη, βασίζεται στην εφαρμοσμένη δόση και φαίνεται στο παρακάτω σχεδιάγραμμα.



Εικόνα 13. Αλλαγή στην συγκέντρωση της πρωτεΐνης των πειραματικών οίνων που έχουν υποστεί επεξεργασία με διαφορετικούς μπεντονίτες, ανάλογα με την προστιθέμενη δόση.

Η σημαντικότερη μείωση, σημειώθηκε για το B3 μπεντονίτη και η πιο αδύναμη ήταν στην σειρά των δειγμάτων που υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με τον μπεντονίτη B2. Οι υπόλοιποι μπεντονίτες (B1 και B4), επέδειξαν την ίδια συμπεριφορά.

Αυτά τα αποτελέσματα μπορούν να εξηγηθούν, απο την διαφορετική ικανότητα αποπρωτεϊνοποίησης των εξεταζόμενων μπεντονιτών, τα οποία σε χαμηλότερες δόσεις είχαν πιο ορατές διαφορές. Σε υψηλότερες δόσεις, η αποτελεσματικότητα τους είναι σχεδόν ανάλογη. Η θεωρία ότι δεν υπάρχει κάποια άμεση σύνδεση μεταξύ της αξίας της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης και της κολλοειδούς σταθερότητας των λευκών οίνων έχει επιβεβαιωθεί. Τα μοριακά κλάσματα με την χαμηλότερη συγκέντρωση είναι ευκολότερο να απομακρυνθούν, από τον προστιθέμενο μπεντονίτη, και αυτό οφείλεται και πάλι στην ικανότητα αποπρωτεϊνοποίησης τους ([Ivan Bakardzhiyski, 2022](#)).

Τα τελευταία χρόνια, έχουν αναπτυχθεί διάφοροι εμπορικοί μπεντονίτες που διαφέρουν στις σχετικές ποσότητες τους σε Al_2O_3 , SiO_2 , Na_2O , K_2O , CaO , MgO , Fe_2O_3 , TiO_2 , MnO και P_2O_5 , αν και η ακριβής τους σύνθεση δεν αποκαλύπτεται. Αυτοί οι εμπορικοί μπεντονίτες μπορούν να σχηματίσουν είτε πιο συμπαγείς είτε πιο χνουδωτές οινολάσπες (για να μειώσουν τις απώλειες οινολάσπης), μπορεί να διαφοροποιήσουν την ικανότητά τους να απομακρύνουν πρωτεΐνες PR και φαινολικές ενώσεις ή να προσροφήσουν πρόσθετες ενώσεις (εκτός από πρωτεΐνες). Περαιτέρω έρευνες έχουν δείξει ότι οι μπεντονίτες μπορεί να μην αφαιρούν σημαντικό μέρος των γλυκοζυλιωμένων πρωτεϊνών πάνω από 70 kDa και έδειξαν ότι οι ισομορφές TLP που δεν έχουν αφαιρεθεί έχουν υδρόφοβη επιφάνεια. Άλλες μελέτες έδειξαν ότι ο μπεντονίτης θα μπορούσε να αφαιρέσει συγκεκριμένες ισομορφές πρωτεϊνών που μοιάζουν με θαυματίνη (TLP) που είναι υπεύθυνες για το σχηματισμό θολότητας. Ωστόσο, απαιτούνται περισσότερες μελέτες για την επαλήθευση της συγγένειας ορισμένων τύπων μπεντονιτών με συγκεκριμένες PR-πρωτεΐνες. Ως εκ τούτου, η επιλογή του σωστού μπεντονίτη και η κατανόηση των χαρακτηριστικών του είναι προκλητική και κρίσιμη για τον αποτελεσματικό διαχωρισμό των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στο σχηματισμό θολότητας στο λευκό κρασί ([Silva-Barbieri et al., 2022](#)).

6.2 Αφαίρεση πρωτεϊνών με υπερδιήθηση

Μία μέθοδος παρόμοια της προσθήκης του μπεντονίτη είναι εκείνη της υπερδιήθησης. Έχει επιβεβαιωθεί η ελάττωση του χρησιμοποιούμενου μπεντονίτη με την χρήση αυτής της μεθόδου σε ποσοστό μέχρι και 95%. Τα αρνητικά αυτής ωστόσο είναι η απώλεια σημαντικών κατηγοριών πρωτογενών και τριτογενών αρωμάτων, τα οποία συνεισφέρουν στο αρωματικό προφίλ του οίνου. Επίσης, οι οίνοι που έχουν δεχθεί την συγκεκριμένη επεξεργασία εμφανίζουν χαρακτηριστικά ελαφρύτερο σώμα, το οποίο

οφείλεται στην αφαίρεση των κολλοειδών συσσωματωμάτων. Στην βιομηχανία του οίνου, η υπερδιήθηση αποφεύγεται λόγω του υψηλού κόστους λειτουργίας και εξοπλισμού ([Luís Filipe-Ribeiro et al., 2021](#)). Αυτή η εφαρμογή δεν είναι απαραίτητως βιώσιμη σε οινοποιητική κλίμακα λόγω του κόστους του εξοπλισμού. Οι εναλλάκτες κατιόντων σε συσκευασμένη κλίμακα θα μπορούσαν αποδεδειγμένα να βελτιώσουν την αποτελεσματικότητα της διαδικασίας, αλλά δεν έχουν ακόμη υιοθετηθεί για την αφαίρεση πρωτεΐνης ([Steven C. Van Sluyter et al., 2015](#)).

6.3 Θερμική Σταθεροποίηση (Thermal Stability)

Αποτελεί μία ολοκληρωμένη μέθοδο αντιμετώπισης βασισμένη στην εφαρμογή του test θέρμανσης. Η Θερμική Σταθεροποίηση είναι μια σημαντική διαδικασία στην οινοποίηση που βοηθά στη διασφάλιση τόσο της σταθερότητας όσο και της ποιότητας του τελικού οίνου. Πρωταρχικός στόχος της είναι να αποτραπεί ο σχηματισμός ιζήματος ή ομίχλης στον οίνο που θα μπορούσε να συμβεί ως αποτέλεσμα της καθίζησης πρωτεϊνών και τρυγικών αλάτων όταν ο οίνος εκτίθεται σε διάφορες θερμικές διακυμάνσεις. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει την υποβολή του οίνου σε έναν ελεγχόμενο κύκλο θέρμανσης και ψύξης. Υπάρχουν τρεις βασικές κατηγορίες θερμικής σταθεροποίησης στην οινοποίηση:

6.3.1 Σταθεροποίηση των πρωτεϊνών

Οι φυσικές πρωτεΐνες του οίνου μπορεί να γίνουν ασταθείς και να δημιουργήσουν θολώματα όταν εκτεθούν σε ακραίες μεταβολές θερμοκρασίας. Με την σταθεροποίηση της θερμότητας, οι πρωτεΐνες αυτές καθιζάνουν με αποτέλεσμα την αποφυγή σχηματισμού θολώματος.

6.3.2 Σταθεροποίηση τρυγικού

Τα τρυγικά άλατα είναι φυσικές ενώσεις που βρίσκονται τόσο στο σταφύλι όσο και στον παραγόμενο οίνο. Έχουν την δυνατότητα να κρυσταλλωθούν και στην συνέχεια να καθιζάνουν έξω από τον οίνο, δημιουργώντας ίζημα. Η θερμική σταθεροποίηση μπορεί να προκαλέσει το ίζημα αυτό, και μετέπειτα να αφαιρεθεί.

6.3.3 Μικροβιακή σταθεροποίηση

Τέλος έχουμε τον έλεγχο του μικροβιακού πληθυσμού του οίνου, καθώς οι υψηλές θερμοκρασίες σκοτώνουν έναν μεγάλο αριθμό μικροοργανισμών που συναντώνται σε αυτό, επιτυγχάνοντας καθολική σταθεροποίηση του οίνου ([Liu et al., 2023](#)). Σύμφωνα με σχετικές έρευνες, λαμβάνοντας υπόψη τρεις πολύ σημαντικούς παράγοντες (pH, ιοντική ισχύς και θερμοκρασία) διερευνήθηκε η επίδραση τους συνδυαστικά όσον αφορά τη σταθερότητα της πρωτεΐνης του οίνου. Τα αποτελέσματα έδειξαν τρεις κατηγορίες πρωτεϊνών με χαμηλή σταθερότητα (β-γλυκανάσες, χιτινάσες, και κάποιες όμοιες της θαυματίνης). Ωστόσο, στους 25°C στο χαμηλότερο pH μακριά από το ισοηλεκτρικό σημείο της πρωτεΐνης παρατηρήθηκε μέγιστη αστάθεια. Η αύξηση της θερμοκρασίας επέφερε μετατόπιση της μέγιστης θολερότητας σε υψηλότερο pH ([Dufrechou et al., 2012](#)).

Ακόμη πραγματοποιήθηκε μια μελέτη με βάση την θερμική ξεδίπλωση πρωτεΐνης, όμοιας με της θαυματίνης, χιτινάσης και ιμβερτάσης όπου απομονώθηκαν από το *Vitis Vinifera* Sauvignon Blanc και από το το χυμό του Semillon. Έπειτα, κατά την διεξαγωγή διαφορικής θερμιδομετρικής σάρωσης, η χιτινάση είχε χαμηλή θερμοκρασία τήξης με αποτέλεσμα την παρατήρηση συσσωματώματος. Αυτό έδειξε ότι η χιτινάση ήταν ένας σημαντικός παράγοντας της θολερότητας που προκλήθηκε από τη θερμότητα σε μη εκλεπτυσμένους οίνους. Η κινητική της ξεδίπλωσης της χιτινάσης F1 (Sauvignon Blanc) μελετήθηκε με την εφαρμογή φασματομετρικού κυκλικού διαχωρισμού. Το ξεδίπλωμα της χιτινάσης, προσαρμόζεται με τη συμπεριφορά Arrhenius με ενέργεια ενεργοποίησης 320 kJ/mol. Αυτό, έδωσε τη δυνατότητα δημιουργίας ενός προγνωστικού μοντέλου για την σταθερότητα της πρωτεΐνης, προβλέποντας χρόνο ημιζωής 9 ετών στους 15°C, 4,7 ημέρες στους 30°C και 17 λεπτά στους 45°C. Το ξεδίπλωμα της χιτινάσης σύμφωνα με μελέτες κυκλικού διχρωμισμού ακολουθεί τρία στάδια: Ένα αρχικό μη αναστρέψιμο βήμα από τη φυσική σε μια μη αναδιπλωμένη διαμόρφωση, ένα αναστρέψιμο βήμα μεταξύ μιας συμπυκμένης και μιας μη αναδιπλωμένης μη εγγενούς διαμόρφωσης, ακολουθούμενη από μη αναστρέψιμη συσσωμάτωση που σχετίζεται με το σχηματισμό ορατής θολότητας ([Falconer et al., 2010](#)).

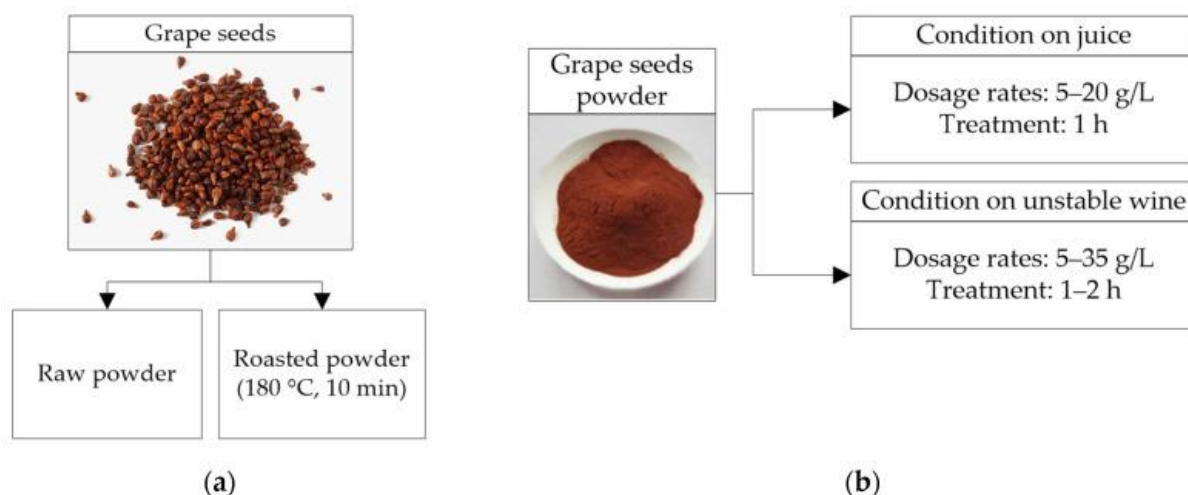
6.4 Υγρή Χρωματογραφία - HPLC

Η προσρόφιση πρωτεϊνών οίνου από φαινολικές ενώσεις (παράγωγα ταννικού οξέος), ακινητοποιημένες σε χρωματογραφικές ρητίνες αγαρόζης, εφαρμόστηκε επίσης για τη σταθεροποίηση του οίνου όσον αφορά τις ασταθείς στον οίνο πρωτεΐνες. Τα παράγωγα

ταννικού οξέος αποκάλυψαν την ικανότητα εξάλειψης των πρωτεϊνών του κρασιού, ωστόσο μετά από μικρό αριθμό κύκλων επανάληψης της μεθόδου η ικανότητα δέσμευσης των πρωτεϊνών από τα παράγωγα του ταννικού οξέος μειώθηκε σημαντικά ([Cosme et al., 2020](#)).

6.5 Χρήση σπόρων σταφυλιού (GSP) για τη μείωση του σχηματισμού θολερότητας στα λευκά κρασιά

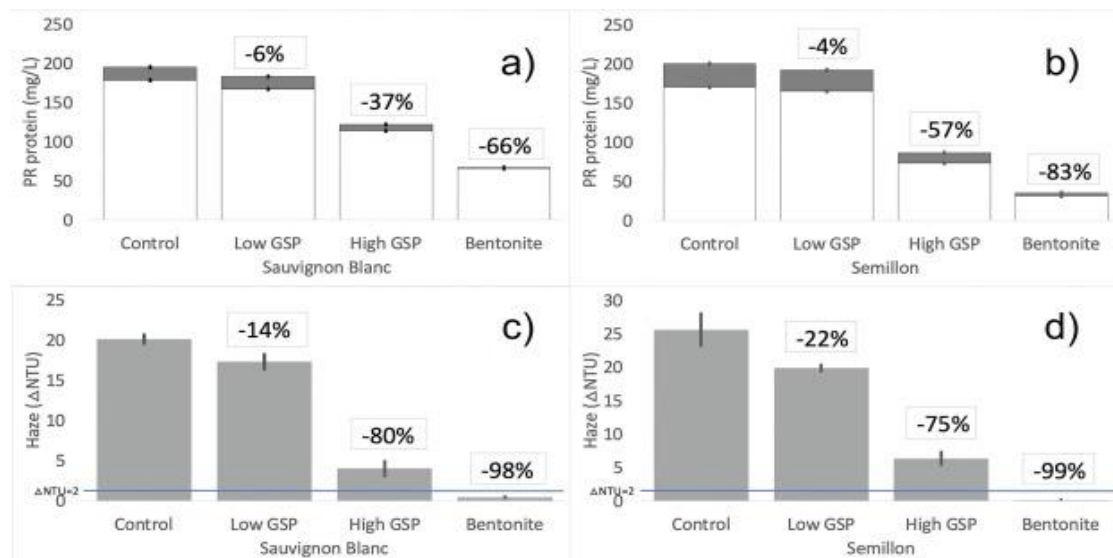
Οι σπόροι σταφυλιού περιέχουν σημαντικές ποσότητες συμπυκνωμένων τανινών, που αντιστοιχούν συνολικά στο 60-70% των συνολικών εκχυλίσμων φαινολικών του σταφυλιού. Αυτές οι φλαβαν-3-όλες υπάρχουν ως μονομερή, διμερή και τριμερή κατεχίνης, επικατεχίνης και επικατεχίνης-3-O-γαλλικής που συνδέονται με δεσμούς C4-C8 και/ή C4-C6. Σε ορισμένες μελέτες, έχουν απομονωθεί ολιγομερή υψηλού μοριακού βάρους, υποδηλώνοντας μια πιο σύνθετη μεταβλητότητα των ενώσεων, παρόλο που γενικά ο μέσος βαθμός πολυμερισμού των τανινών των σπόρων είναι χαμηλότερος από ό,τι στο φλοιό. Λαμβάνοντας υπόψη ότι οι τανίνες των σπόρων εκχυλίζονται πιο δύσκολα από τις τανίνες του φλοιού και διαλυτοποιούνται μόνο με παρατεταμένες διαβρώσεις, οι σπόροι από την λευκή οινοποίηση διατηρούν τις περισσότερες από τις συμπυκνωμένες τανίνες, ώστε να χρησιμοποιηθούν ως σκόνη των σπόρων του σταφυλιού για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών PR από ασταθή οίνους. Οι μη ταννικές φαινολικές ενώσεις έχουν μετρηθεί σε υψηλές συγκεντρώσεις σε πρωτεϊνικά ιζήματα παρόλο που αυτή η κατηγορία ενώσεων δεν αυξάνει άμεσα την παραγωγή θολώματος στον οίνο. Αντίθετα, οι συμπυκνωμένες τανίνες διαδραματίζουν πολύ πιο σημαντικό ρόλο στη δέσμευση πρωτεϊνών μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων και συγκόλλησης υδρογόνου.



Εικόνα 14. Παρασκευή σπόρων σταφυλιού σε ακατέργαστη (a) και καβουρδισμένη σκόνη (b). Διεργασίες σταθεροποίησης πρωτεϊνών παρτίδας σε διαφορετικές συνθήκες λειτουργίας πριν και μετά τη ζύμωση (μη διαυγασμένοι χυμοί σταφυλιών και ακατέργαστοι λευκοί οίνοι) χρησιμοποιώντας ακατέργαστη και καβουρδισμένη σκόνη σπόρων σταφυλιού ([Silva-Barbieri et al., 2022](#)).

Σε εργαστηριακό επίπεδο, η σκόνη από σπόρους σταφυλιού (Grape Seeds Powder, GSP) προστέθηκε σε μία υψηλή δόση (15g/L) και μία χαμηλή δόση (7,5g/L) σε σταφυλοχυμούς οίνων των ποικιλιών Semillon (SEM) και Sauvignon Blanc (SAB) πριν τη ζύμωση. Μετά τη δημιουργία των αντίστοιχων τυφλών δειγμάτων που επεξεργάστηκαν με τις αντίστοιχες ποσότητες μπεντονίτη, το σύνολο των δειγμάτων οδηγήθηκε σε χημική και αισθητηριακή ανάλυση μετά από την εμφιάλωση και την ακόλουθη παρατεταμένη αποθήκευσή τους, ώστε να εκτιμηθεί η εξέλιξη του πρωτεϊνικού θολώματος που αντιστοιχεί σε κάθε μία από τις προαναφερόμενες περιπτώσεις.

Η θεραπεία με GSP μείωσε τη συγκέντρωση πρωτεϊνών PR έως και 57% και 37% για SEM και SAB, αντίστοιχα και μείωσε την ποσότητα της θολερότητας που σχηματίστηκε σε δοκιμή θερμότητας κατά 75% και 80%, αντίστοιχα. Αυτό υποδηλώνει ότι η προσθήκη GSP μπορεί να είναι μια βιώσιμη λύση για την ελαχιστοποίηση της προσθήκης μπεντονίτη. Ο αντίκτυπος του GSP στην αίσθηση και το χρώμα του οίνου υποδηλώνει ότι η χρήση του GSP μπορεί να είναι καλύτερα προσαρμοσμένη σε οίνους που απαιτούν μικρότερες δόσεις παράγοντα διαύγασης πρωτεϊνών και εκείνες που επωφελούνται από μεγαλύτερες ιδιότητες υφής. Η χρήση του GSP μπορεί να μειώσει την ποσότητα μπεντονίτη που απαιτείται για τη σταθεροποίηση των κρασιών και μπορεί να παρέχει μια βιώσιμη και οικονομική εναλλακτική λύση, ειδικά για τα στυλ του λευκού οίνου υφής ([Romanini et al., 2021](#)).



Εικόνα 15. Οίνοι περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη PR [TLP (λευκό) + χιτινάσες (γκρι)] επεξεργασμένοι με σκόνη σπόρων σταφυλιού (GSP) (χαμηλή και υψηλή δόση), επεξεργασμένοι με μπεντονίτη και μη επεξεργασμένο μάρτυρα. a) Sauvignon Blanc (SAB), b) Semillon (SEM). Οι ποσοστιαίες τιμές αντιπροσωπεύουν τη μείωση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης PR στα επεξεργασμένα κρασιά σε σύγκριση με τους οίνους ελέγχου. Οι τιμές της θαυματίνης και των χιτινασών εκφράζονται σε mg/L ισοδύναμα θαυματίνης και παρουσιάζονται ως μέσος όρος και τυπική απόκλιση πειραμάτων εις τριπλούν. c) Σταθερότητα δοκιμής θερμότητας για Sauvignon blanc (SAB). d) Θερμική σταθερότητα δοκιμής για Semillon (SEM) επεξεργασμένο με σκόνη σπόρων σταφυλιού (χαμηλή και υψηλή δόση), κατεργασμένο με μπεντονίτη και μη επεξεργασμένο μάρτυρα. Τα κρασιά θεωρούνται σταθερά όταν $\Delta NTU < 2$. ([Romanini et al., 2021](#)).

Επιπλέον, η επίδραση διαφορετικών φυτικών πρωτεϊνών (πρωτεΐνες πατάτας, μπιζελιού και σπόρων σταφυλιού) τέθηκε σε εργαστηριακή αξιολόγηση σε οίνους της ποικιλίας Syrah που προήλθαν από σταφύλια θερμού κλίματος της περιοχής “Condado de Huelva” Designation of Origin, (Νοτιοδυτική Ισπανία) ως εναλλακτική στη χρήση των παραδοσιακών μέσων κολλαρίσματος, όπως είναι η αλβουμίνη αυγού και γενικότερα πρωτεΐνες ζωικής προέλευσης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι φυτικές πρωτεΐνες (όπως οι πρωτεΐνες πατάτας και μπιζελιού, και πρωτεΐνες σπόρων σταφυλιού ως πρόσφατη πρόταση) είναι κατάλληλες πηγές για χρήση ως διαυγαστικοί παράγοντες τόσο σε προηγούμενα όσο και σε προχωρημένα στάδια οινοποίησης ερυθρών κρασιών από θερμό κλίμα ως εναλλακτική της παραδοσιακής εκχύλισης παράγοντες ζωικής προέλευσης όπως η αλβουμίνη αυγού. Η αποτελεσματικότητα στη μείωση της θολότητας του κρασιού και ο αντίκτυπος στη φαινολική σύνθεση (άχρωμα φαινολικά και ανθοκυανικές χρωστικές) και στην ποιότητα και σταθερότητα του χρώματος, έχουν αποδείξει στις περισσότερες

περιπτώσεις αισθητηριακά οφέλη σε εκλεκτά κρασιά σε σχέση με μη ραφιναρισμένα, σε σύγκριση με τη λευκωματίνη αυγού. Ως εκ τούτου, η αξιοποίηση για την πιθανή χρήση τους στην οινοποιία θα μπορούσε να έχει μεγάλο ενδιαφέρον. Αν και η χρήση πρωτεϊνών σπόρων από υποπροϊόντα σταφυλιού έχει το πλεονέκτημα ότι είναι ενδογενής για το σταφύλι, δεν είναι αλλεργιογόνο και προσθέτει αξία σε αυτό το υποπροϊόν, απαιτούνται ακόμη περαιτέρω μελέτες για τη βελτιστοποίηση της αποτελεσματικότητάς τους ως λεπτού παράγοντα σε σχέση με την καθαρότητα πρωτεΐνης του εκχυλίσματα, τη δόση που εφαρμόζεται και τον χρόνο επαφής, και ως εκ τούτου, την εφαρμογή της οινοβιομηχανίας.

6.6 Μαγνητικός διαχωρισμός

Μια νέα τεχνολογική ανακάλυψη η οποία επιτρέπει την επιλεκτική αφαίρεση πρωτεϊνών, που σχετίζονται με την παθογένεση, όπως πρωτεΐνες που μοιάζουν με τη θαυματίνη (TLP) και χιτινάσες από οίνους, είναι ο μαγνητικός διαχωρισμός. Η πρωτοπόρα αυτή διαδικασία έρχεται να χρησιμοποιήσει μαγνητικά νανοσφαιρίδια με προσεκτικά συντονισμένες επιφανειακές λειτουργίες οι οποίες συλλαμβάνουν πρωτεΐνες θολώματος και έπειτα μπορούν να αφαιρεθούν με την εφαρμογή μιας εξωτερικής μαγνητικής δύναμης ([Mierczynska-Vasilev et al., 2019](#)), έχοντας πρώτα συνδεθεί στην επιφάνεια του οίνου με την προσθήκη των εν λόγω επικαλυμμένων νανοσωματιδίων ([Cosme et al., 2020](#)). Με την χρήση μιας προσαρμοσμένης μηχανικής τεχνολογίας για την ενθυλάκωση των σωματιδίων, η επιφανειακή χημεία των μαγνητικών σωματιδίων προσαρμόστηκε μέσω εναπόθεσης ακρυλικού οξέος στο πλάσμα ([Cavallaro & Vasilev, 2015](#)). Εκτός από την αφαίρεση πρωτεΐνης σε πρότυπα διαλύματα, τα σωματίδια υποβλήθηκαν με επιτυχία σε οίνους που ήταν θερμικά ασταθείς. Αυτή η νέα μέθοδος διαχωρισμού είναι ταυτόχρονα αποτελεσματική και απλή στην αφαίρεση οικογένειας πρωτεϊνών PR, με τα TLPs και τις χιτινάσες από τους λευκούς οίνους. Επιπρόσθετα, σημαντικό πλεονέκτημα είναι ότι η περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά ύστερα από την αφαίρεση της πρωτεΐνης, με την συγκεκριμένη μέθοδο, δεν αλλοιώθηκε και το ότι δόθηκε η δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης των νανοσωματιδίων σε πολλαπλούς κύκλους διαύγασης και αναγέννησης ([Mierczynska-Vasilev et al., 2019](#)). Με σκοπό την ενίσχυση της αποτελεσματικότητας όσον αφορά στην αφαίρεση των περισσότερων από τις οινοδιαλυτές πρωτεΐνες στα κρασιά, αυτά τα σωματίδια εφαρμόστηκαν σε συγκέντρωση 1,66% (v/v), που αντιστοιχεί σε 13,3 g/L. Αυτό μπορεί να συσχετιστεί με το pKa της καρβοξυλικής ομάδας που υπάρχει στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων, το οποίο μπορεί να είναι πολύ

κοντά στο pH του οίνου, επηρεάζοντας την ικανότητα ανταλλαγής κατιόντων ([Cosme et al., 2020](#)).

Αυτό το πείραμα βασίστηκε στην επίδραση των ιδιοτήτων της επιφάνειας στην αποτελεσματικότητα της τεχνολογίας για την αφαίρεση των πρωτεϊνών που προκαλούν θόλωμα στον οίνο. Χρησιμοποιήθηκε μια σειρά επιφανειακών επικαλύψεων με αρνητικά ή θετικά επιφανειακά φορτία που παρέχουν διαφορετικό μηχανισμό αλληλεπίδρασης με τις πρωτεΐνες. Βασική προϋπόθεση για την επιλογή επικαλύψεων είναι να είναι υδρόφιλες έτσι ώστε να γίνονται αντιληπτά τα νανοσωματίδια. Τα μονομερή ακρυλικού οξέος, αλλυλαμίνης και 2-μεθυλ-2-οξαζολίνης χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή επικαλύψεων πλάσματος πλούσια σε λειτουργικές ομάδες καρβοξυλίου, αμίνης και οξαζολίνης. Οι επικαλύψεις χαρακτηρίστηκαν με φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίου ακτίνων X (XPS), φασματοσκοπία υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier (FTIR), περίθλαση ακτίνων X (XDR) και μετρήθηκε το επιφανειακό τους φορτίο. Η εξέταση της αποτελεσματικότητας των επικαλύψεων στην απομάκρυνση των πρωτεϊνών που προκαλούν θόλωμα έγινε σε μη κολλαρισμένο Semillon και Sauvignon Blanc ([Mierczynska-Vasilev et al., 2017](#)).

6.7 Αποικοδόμηση πρωτεϊνών με ένζυμα

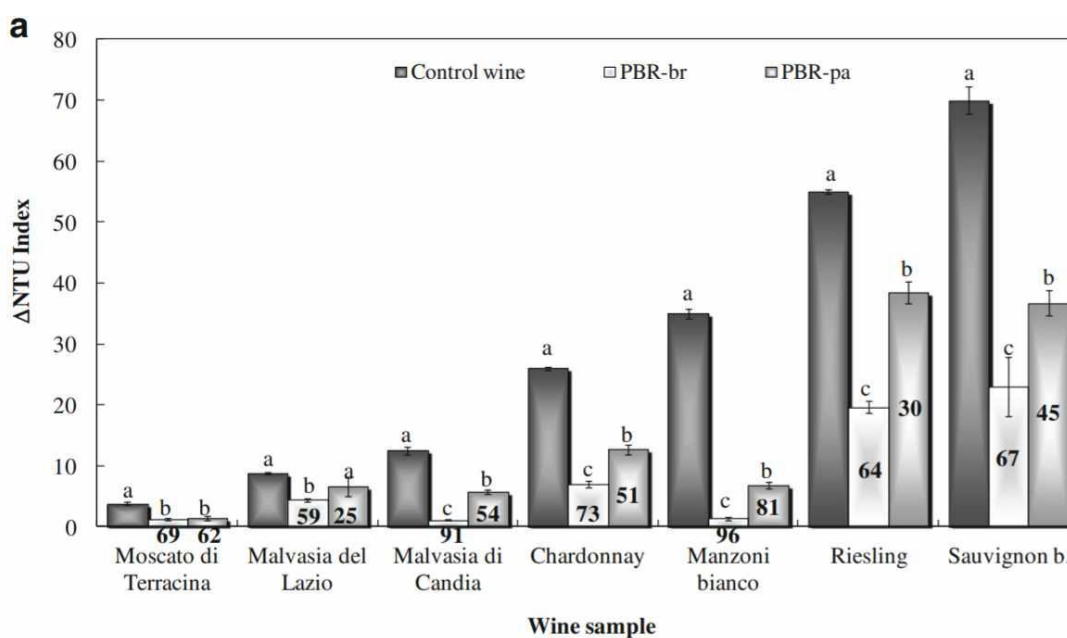
Στην οινοποίηση, είτε κατά το στάδιο της πίεσης είτε στη ζύμωση, επιλέγεται συχνά η προσθήκη ενζύμων στο γλεύκος, κυρίως πρωτεασών, προκειμένου να αποικοδομήσουν τις πρωτεΐνες των σταφυλιών, μέσω της πρωτεόλυσης, προς αποφυγή δημιουργίας πρωτεϊνικού θολώματος. Υπάρχουν δύο τύποι ενζυματικής δραστηριότητας που σχετίζονται με την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών του κρασιού: η υδρόλυση των πεπτιδικών δεσμών από τις πρωτεάσες και η αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών από τις πρωτεϊνικές δισουλφιδικές αναγωγάσες. Οι πρωτεάσες καταλύουν την υδρόλυση του πεπτιδικού δεσμού μέσω πυρηνόφιλης επίθεσης που προκαλείται είτε από μια πλευρική αλυσίδα αμινοξέων της πρωτεάσης, όπως για τις πρωτεάσες κυστεΐνης και σερίνης, είτε από ένα ενεργοποιημένο μόριο νερού, όπως για τις μεταλλοπρωτεάσες και τις ασπαρατικές πρωτεάσες ([Steven C. Van Sluyter et al., 2015](#)).

Τα πλεονεκτήματα της συγκεκριμένης μεθόδου ποικίλουν, καθώς τα προστιθέμενα ένζυμα δεν χρειάζεται να αφαιρεθούν στην πορεία, αλλά αφήνονται να καταναλωθούν από τους ζυμομύκητες ως πηγή αζώτου, ελατώνοντας ικανοποιητικά τις απαιτούμενες προσθήκες σε άζωτο και ενώσεις που το περιέχουν. Ωστόσο προέκυψαν στην πορεία

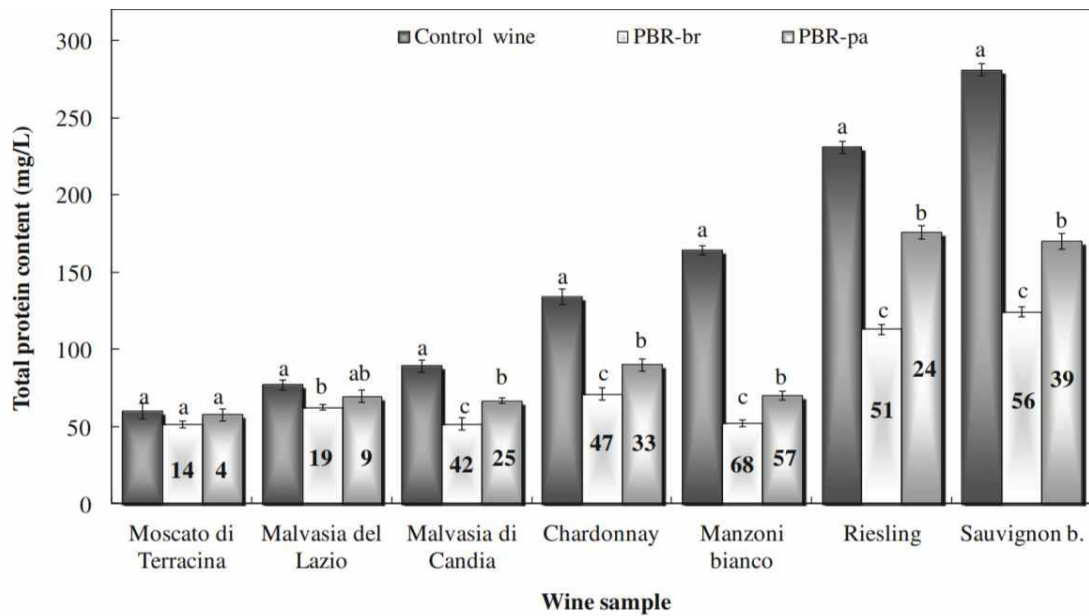
δυσκολίες που αφορούσαν στην ανθεκτικότητα των θερμικά ασταθών πρωτεϊνών του οίνου απέναντι στις πρωτεάσες σε συνθήκες οινοποίησης. Για τον λόγο αυτό, προτάθηκε μετά από σχετική έρευνα, η θέρμανση του σταφυλοχυμού πριν την προσθήκη των πρωτεασών, προκειμένου οι πρωτεΐνες να αποικοδομηθούν και να εκτεθούν σε μεγάλο βαθμό στην ενζυμική δραστηριότητα ([Marangon et al., 2012](#)). Πιθανά μειονεκτήματα της συνολικής μεθόδου είναι η διασφάλιση της λειτουργικότητας των χρησιμοποιούμενων ενζύμων σε χαμηλές θερμοκρασίες (περίπου 10–20 °C) και σε αλκοολικό περιβάλλον ([Albuquerque et al., 2021](#)), καθώς και οι επιπτώσεις της θέρμανσης του γλεύκους στο οργανοληπτικό προφίλ του οίνου. Παρά ταύτα, επιπλέον μελέτες έχουν διεξαχθεί ως προς την εύρεση του κατάλληλου χρόνου έκθεσης σε υψηλή θερμοκρασία και την τιμή της εν λόγω θερμοκρασίας, προκειμένου να επιτευχθεί αποτελεσματική αποικοδόμηση της πρωτεΐνης χωρίς την υποβάθμιση του γευστικού και αρωματικού χαρακτήρα του οίνου. Επιπρόσθετα, παρατηρείται μείωση της απώλειας σε οίνο, εν αντιθέσει της μεθόδου προσθήκης μπεντονίτη. Συνεπώς, επιτυγχάνεται ορθή διαύγαση των οίνων, ελαχιστοποιώντας τις προαναφερόμενες απώλειες που προκαλεί η καθιερωμένη χρήση του μπεντονίτη ([Steven C. Van Sluyter et al., 2015](#)). Ωστόσο, αν και αρκετές ασπαρτικές και γλουταμικές πεπτιδάσες βρέθηκαν να είναι δραστικές σε όξινες συνθήκες, ήταν σε θέση να διασπάσουν τις πρωτεΐνες του κρασιού μόνο σε μέτριες θερμοκρασίες γύρω στους 45 ή 55 °C σε σημαντικές ποσότητες. Επιπλέον, ο μπεντονίτης είναι επίσης απαραίτητος για την πλήρη διαύγαση του οίνου ακόμη και μετά από εφαρμογή πρωτεολυτικών επεξεργασιών, κάτι που εξακολουθεί να συνεπάγεται συνδυασμό τεχνικών και τις επιβλαβείς επιπτώσεις της επεξεργασίας με μπεντονίτη. Τέλος, αν και έχουν επιτευχθεί κάποιες πρόοδοι, ο OIV (Διεθνής Οργανισμός Αμπέλου και Οίνου) δεν έχει ακόμη εγκρίνει βιομηχανικές εφαρμογές πρωτεόλυσης για όλα τα είδη πεπτιδασών στην οινοποίηση, γεγονός που καθιστά δύσκολη την εφαρμογή της ([Albuquerque et al., 2021](#)).

Γενικά, οι φυτικές πεπτιδάσες έχουν επίσης δείξει αποτελεσματικότητα στη μείωση της θολότητας στα κρασιά. Συγκεκριμένα, επιβεβαιώθηκε πως ένα ακινητοποιημένο στέλεχος ενζύμου ανανά (*Ananus bracteratus*), συγκεκριμένα η βρωμελίνη, ήταν σε θέση να μειώσει τουλάχιστον το 70% του σχηματισμού θολότητας του κρασιού σε έναν αναδεδυμένο αντιδραστήρα στους 20 °C, 24 h. Η παπαΐνη από το λατέξ *Carica papaya* προτάθηκε επίσης για εφαρμογή στη διαύγαση του οίνου λόγω της ικανότητάς της να υδρολύει συνθετικά υποστρώματα σε pH 3,2, παρουσία αιθανόλης. Ωστόσο, οι ερευνητές συζήτησαν επίσης την αναποτελεσματικότητα των φυτικών πεπτιδασών υπό όξινες συνθήκες, όπως η φικίνη από το *Ficus sp.* ή την ήδη αναφερθείσα παπαΐνη και βρωμελίνη.

Από ζωικές πηγές, μια πεψίνη χοίρου (από τον βλεννογόνο του στομάχου των χοίρων) έδειξε πιθανές εφαρμογές καθώς ήταν ενεργή στο pH του κρασιού, αλλά μόνο όταν τα κρασιά θερμάνθηκαν στους 90 °C για 1 λεπτό (βραχυπρόθεσμη θέρμανση) ή στους 45 °C για 1 ημέρα. Παρόλο που οι πεπτιδάσες φυτικής προέλευσης όπως η παπαΐνη και η βρομελίνη μπορεί να είναι ενεργές σε τιμές pH που υπάρχουν στα φρούτα (από 2,5 έως 4), δεν έχουν προταθεί για εφαρμογές εκχύλισης οίνου μέχρι στιγμής, σε αντίθεση με τα ένζυμα μυκητιακής προέλευσης ([Albuquerque et al., 2021](#)).

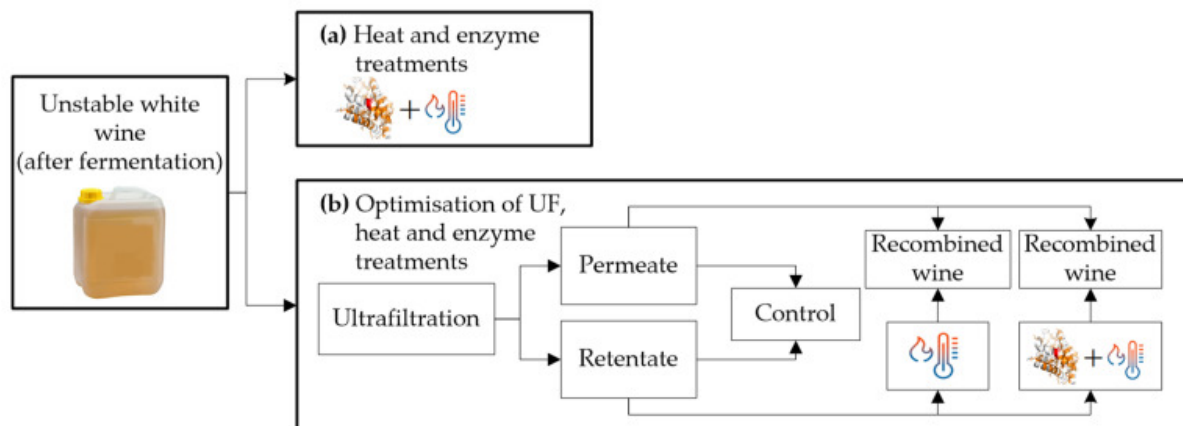


Εικόνα 16. Δυναμικό σχηματισμού θολώματος (ΔNTU Index) οίνων πριν και μετά από ενζυματική θεραπεία σε αντιδραστήρα συσκευασμένης κλίνης που περιέχει ακινητοποιημένη βρομελίνη (PBR-br) ή ακινητοποιημένη παπαΐνη (PBR-pa), με την ανάλογη απόδοση αφαίρεσης θολερότητας (ποσοστό της θολότητας που αφαιρείται από τον επεξεργασμένο οίνο). Οι αναφερόμενες τιμές είναι μέσες τιμές διαστήματος εμπιστοσύνης $\pm 95\%$ και αντιστοιχούν σε εις τριπλούν ανάλυση ([Benucci et al., 2016](#)).



Εικόνα 17. Συνολική περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη (mg/L) των οίνων πριν και μετά την ενζυμική επεξεργασία σε αντιδραστήρα συσκευασμένης κλίνης που περιέχει ακινητοποιημένη βρομελίνη (PBR-br) ή ακινητοποιημένη παπαΐνη (PBR-pa), με την αντίστοιχη απόδοση αφαίρεσης πρωτεΐνης (ποσοστό των πρωτεϊνών που αφαιρέθηκαν από τον κατεργασμένο οίνο) ([Benucci et al., 2016](#)).

Επιπλέον, οι πρωτεάσες έρχονται να αντικαταστήσουν τον μπεντονίτη ως εναλλακτική λύση αλλά έως τώρα καμία δεν έχει λειτουργήσει άκρως ικανοποιητικά υπό συνθήκες οινοποίησης. Αξιόλογο παράδειγμα ενζύμου φυτικής προέλευσης αποτελεί το AGP, ένα μείγμα ασπεργιλλοπεψινών I και II. Είναι μια κατηγορία τροφίμων, καλά χαρακτηρισμένη και οικονομική πρωτεάση η οποία είναι ενεργή στο pH του οίνου και σε υψηλές θερμοκρασίες (60-80°C). Το AGP προστέθηκε σε δυο διαυγασμένους σταφυλοχυμούς υπό και χωρίς θερμική επεξεργασία (75°C, 1 λεπτό) πριν την ζύμωση. Το AGP έδειξε κάποια δραστηριότητα σε θερμοκρασίες ζύμωσης (~20% μείωση της συνολικής πρωτεΐνης σε συσχέτιση με τον οίνο ελέγχου) και αξιοσημείωτη δραστηριότητα όταν συνδυάστηκε με θέρμανση χυμού (~90% συνολικής μείωσης της πρωτεΐνης). Οι πρωτεΐνες του σταφυλιού οι οποίες είναι πιο σταθερές στην θερμότητα, δηλαδή εκείνες που δεν σχετίζονται με την θολερότητα του οίνου, δεν επηρεάστηκαν από τις επεξεργασίες και επομένως αντιπροσωπεύουν το υπολειπόμενο 10% της πρωτεΐνης, που ύστερα από τις επεξεργασίες, ήταν ακόμα διαλυτές ([Marangon et al., 2012](#)).



Εικόνα 18. Θερμική επεξεργασία στους 75 °C για 2 λεπτά μαζί με προσθήκη ενζύμων AGP. (β) Επεξεργασία υπερδιήθησης (UF) και επεξεργασίες ελέγχου με κρασί, θερμότητα και θερμότητα + AGP. ([Silva-Barbieri et al., 2022](#))

6.8 Προσθήκη πολυσακχαριτών

Μια εναλλακτική λύση στην διαύγαση των πρωτεϊνών του οίνου που προκαλούν θόλωμα περιλαμβάνει την προσθήκη πολυσακχαριτών. Μια έρευνα κλασματοποιημένων μακρομορίων οίνου από το κρασί Muscat Gordo Blanco έδειξε ότι ορισμένα κλάσματα πλούσια σε πολυσακχαρίτες προφανώς προστατεύουν ορισμένες πρωτεΐνες οίνου από το σχηματισμό θολώματος που προκαλείται από την έκθεση σε θερμότητα. Τα απομονωμένα κλάσματα πλούσια σε πολυσακχαρίτες, γνωστά ως “παράγοντες προστασίας από θόλωμα (HPFs: Haze - protective factors), εμφάνισαν θολερότητα σε μικρότερο βαθμό, αφού θερμάνθηκαν. Τα εν λόγω αποτελέσματα παρατηρήθηκαν τόσο σε μεμονωμένα κλάσματα πολυσακχαριτών όσο και σε κλάσματα που συνδύαζαν τα προαναφερόμενα μακρομόρια και τις πρωτεΐνες που συνήθως εντοπίζονται στους οίνους. Ωστόσο η συγκεκριμένη προσθήκη αποδείχθηκε αργότερα ότι βασίζεται αποκλειστικά στην μείωση του θολώματος σε μοριακό επίπεδο και όχι στην πλήρη εξάλειψη του φαινομένου. Συγκεκριμένα, αποδείχθηκε ότι με την προσθήκη ενός μη καθορισμένου κλάσματος μαννοπρωτεΐνης ζύμης, το μέγεθος των σωματιδίων του θολώματος που σχηματίστηκε κατά τη θέρμανση μειώθηκε από 30 μm σε 5 μm, γεγονός που το κατέστησε ελάχιστα ανιχνεύσιμο με απλή μη μικροσκοπική παρατήρηση ([E. J. Waters et al., 2005](#)). Η προσθήκη μαννοπρωτεϊνών έχει ήδη εγκριθεί από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Οίνου (OIV) για χρήση όσον αφορά την αντιμετώπιση πρωτεϊνικών θολωμάτων ([Filipe-Ribeiro et al., 2022](#))

6.9 Ζεόλιθοι (Zeolites)

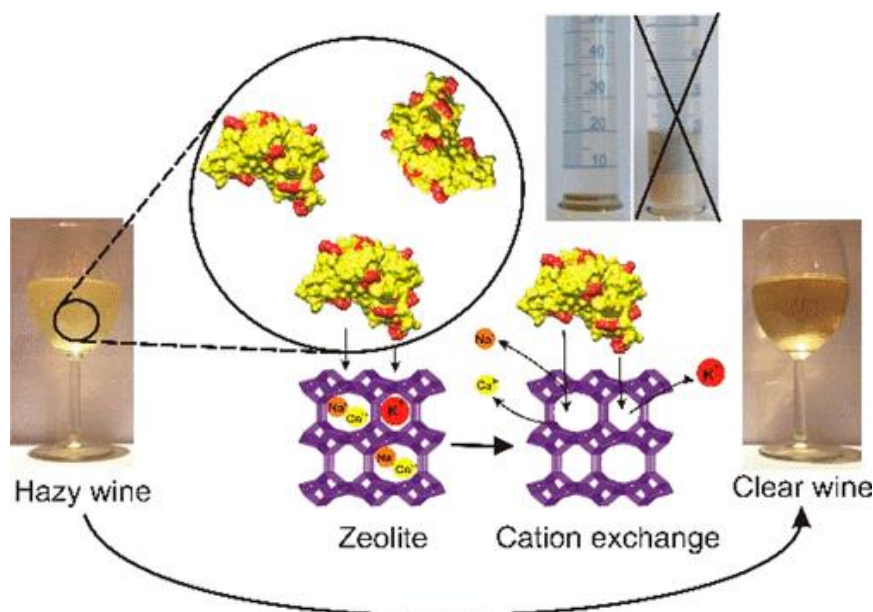


Εικόνα 19. Εικόνα του ζεόλιθου, ενός φυσικού, αδρανούς, αργιλοπυριτικού πετρώματος.
(*"Zeolite"*. Encyclopedia Britannica, 21 Dec. 2023)

Το βασικό δομικό χαρακτηριστικό ενός ζεόλιθου είναι ένα τρισδιάστατο τετραεδρικό πλαίσιο στο οποίο κάθε άτομο οξυγόνου μοιράζεται από δύο τετράεδρα. Εάν όλα τα τετράεδρα περιείχαν πυρίτιο, το πλαίσιο θα ήταν ουδέτερο. Η αντικατάσταση του πυριτίου από αλουμίνιο δημιουργεί ανισορροπία φορτίου και απαιτεί την παρουσία άλλων μεταλλικών ιόντων σε σχετικά μεγάλες κοιλότητες του σκελετού. Στους φυσικούς ζεόλιθους αυτά τα μεταλλικά ιόντα είναι τυπικά μονοσθενή ή δισθενή ιόντα όπως το νάτριο, το κάλιο, το μαγνήσιο, το ασβέστιο και το βάριο (<https://www.britannica.com/science/zeolite>).

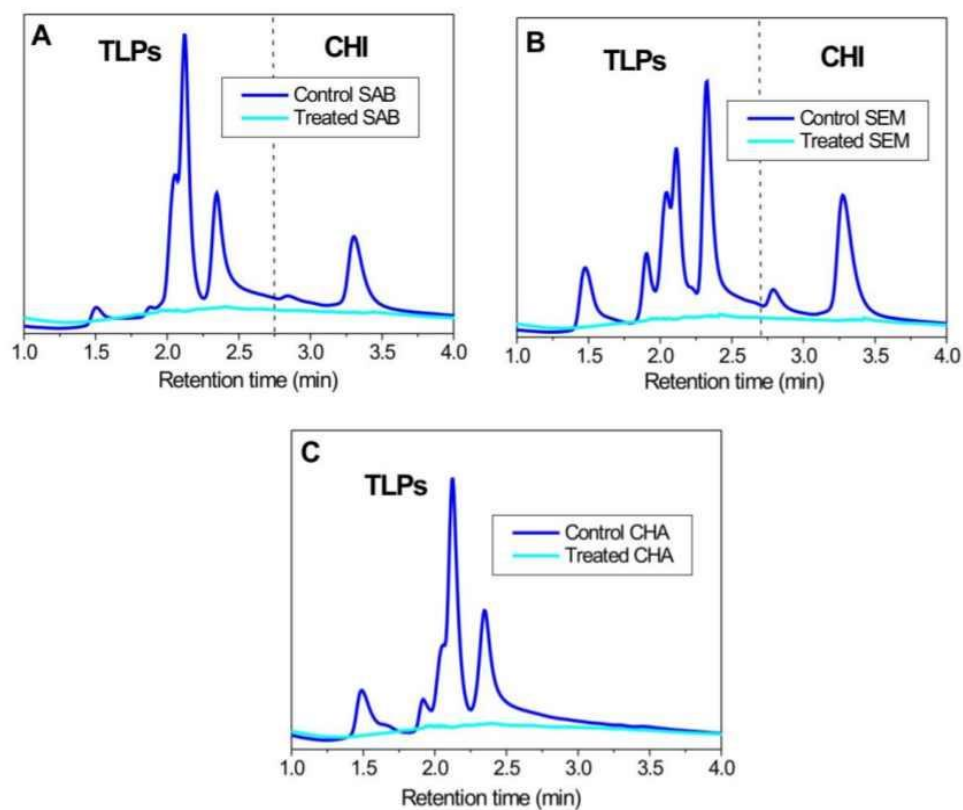
Οι ζεόλιθοι χαρακτηρίζονται από την παρουσία του λεγόμενου ζεολιθικού νερού στη σύνθεσή τους, το οποίο αφαιρείται από τη δομή του κατά τη θέρμανση και αφήνει αναλλοίωτη την ανοιχτή σκελετική δομή του κρυστάλλου. Μια δομή σαν αυτή προσφέρει μοναδικές ιδιότητες μοριακού κόσκινου, ρόφησης και ανταλλαγής ιόντων που έχουν εφαρμοστεί σε πολλές πτυχές της ζωής: από την επεξεργασία νερού και λυμάτων (αφαίρεση ιόντων αμμωνίου, ραδιενεργά στοιχεία, βαρέα μέταλλα, ρύπανση από πετρέλαιο) στην προσρόφηση νερού και αερίων, καθώς και στη γεωργία και άλλους τύπους βιομηχανίας. Το 2010, οι Mercurio et al. χρησιμοποίησαν ζεολιτισμένους τούφους για την επεξεργασία και σταθεροποίηση ιταλικών κρασιών από την περιοχή της Καμπανίας. Ως αποτέλεσμα της ευρείας εφαρμογής τους, οι φυσικοί ζεόλιθοι αναφέρονται ως «μαγικοί βράχοι» από ερευνητές και ορυκτολόγους. Η έρευνα βρίσκεται σε εξέλιξη για την ενίσχυση της χρήσης ζεόλιθων. Λόγω του υπερβολικού αρνητικού φορτίου στην επιφάνεια των

ζεόλιθων είναι εξαιρετικός υποψήφιος για την αφαίρεση πρωτεϊνών από τα κρασιά. Σε αντίθεση με τον μπεντονίτη, οι ζεόλιθοι δεν έχουν συμπεριφορά συρρίκνωσης-διόγκωσης. Οι υψηλές αναλογίες ζεόλιθου/οίνου επέτρεψαν τη σταθεροποίηση της πρωτεΐνης του οίνου και, δευτερευόντως, η επεξεργασία με σκόνη πλούσια σε ζεόλιθο μείωσε σημαντικά τη συγκέντρωση ιόντων καλίου, βελτιώνοντας και την τρυγική σταθερότητα (Cosme et al., 2020)



Εικόνα 20. Σχηματικό διάγραμμα πιθανού μηχανισμού προσρόφησης της πρωτεΐνης που προκαλεί θολότητα σε φυσικό ζεόλιθο, μέσω ανταλλαγής των θετικών ιόντων Na^+ , K^+ , Ca^{2+} που συγκρατεί ο ζεόλιθος με το θετικό φορτίο της πρωτεΐνης (Mierczynska-Vasilev et al., 2019).

Σε σχετική έρευνα βασισμένη τον μηχανισμό προσρόφησης πρωτεϊνών που σχηματίζουν θόλωμα σε φυσικό ζεόλιθο, πραγματοποιήθηκε πρωτεϊνική ανάλυση τριών δειγμάτων οίνων με HPLC. Στη συνέχεια, στα χρωματογραφήματα HPLC των προαναφερόμενων δειγμάτων κρασιού έγινε προσθήκη 10 g/L φυσικού ζεόλιθου. Οι αρχικές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης στα κρασιά Sauvignon Blanc (SAB), Semillon (SEM) και Chardonnay (CHA) ήταν 182, 165 και 103 mg/L, αντίστοιχα. Ενώ στα κρασιά Sauvignon Blanc και Semillon υπήρχαν τόσο χιτινάσες όσο και πρωτεΐνες που μοιάζουν με θαυματίνη (TLP), δεν υπήρχαν χιτινάσες στο κρασί Chardonnay. Μετά από επεξεργασία με 10 g/L φυσικού ζεόλιθου, οι πρωτεΐνες που σχετίζονται με την παθογένεια συλλήφθηκαν επιλεκτικά και αφαιρέθηκαν πλήρως (Mierczynska-Vasilev et al., 2019).



Εικόνα 21. Τα χρωματογραφήματα HPLC των 3 δειγμάτων οίνων Sauvignon Blanc (SAB), Semillon (SEM) και Chardonnay (CHA) πριν και μετά την κατεργασία με φυσικό ζεόλιθο ([Mierczynska-Vasilev et al., 2019](#))

Ο στόχος αυτής της μελέτης ήταν να διερευνήσει την ικανότητα των φυσικών ζεόλιθων να σταθεροποιούν πρωτεϊνικά τους λευκούς οίνους και να εξετάσει την επίδραση της επεξεργασίας με ζεόλιθο στην ποιότητα των επεξεργασμένων οίνων. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με αυτά που λήφθηκαν μετά από διόγκωση με δύο εμπορικούς μπεντονίτες (Vitiben και Pluxcompact). Διαπιστώθηκε ότι το μέγεθος των σωματιδίων του ζεόλιθου στο εύρος των 20-50 μm και ένας χρόνος επεξεργασίας 3 ωρών ήταν επαρκής για να επιτευχθεί πλήρης θερμική σταθερότητα. Το Semillon σταθεροποιήθηκε πλήρως με την εφαρμογή 4 g/L ζεόλιθου, ενώ τα κρασιά Sauvignon Blanc και Chardonnay σταθεροποιήθηκαν πλήρως σε δόση 6 g/L ζεόλιθου. Επιπρόσθετα, οι ζεόλιθοι μείωσαν τη συγκέντρωση καλίου στους επεξεργασμένους οίνους, κάτι που εν δυνάμει μπορεί να συνεισφέρει στη βελτίωση της σταθερότητας του τρυγικού άλατος. Επιπλέον, σε αντίθεση με τους μπεντονίτες, οι ζεόλιθοι δεν προκάλεσαν σημαντική απώλεια κρασιού και μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν ως βελτιωτικά εδάφους στη γεωργία. Συμπερασματικά, οι

φυσικοί ζεόλιθοι μπορούν να προσφέρουν στους οινοπαραγωγούς μια εναλλακτική λύση στον ευρέως χρησιμοποιούμενο μπεντονίτη για την απομάκρυνση του πρωτεϊνικού θολώματος από τους λευκούς οίνους ([Mierczynska-Vasilev et al., 2019](#)).

6.10 Διοξείδιο του ζirkονίου - ZrO_2

Το διοξείδιο του ζirkονίου, ένα οξείδιο μετάλλου συνήθως γνωστό ως ζirkόνιο, είναι ένα υλικό που χαρακτηρίζεται από ωφέλιμες για τον σκοπό αυτό ιδιότητες, όπως χαμηλή θερμική αγωγιμότητα, χαμηλό δυναμικό διάβρωσης, σκληρότητα και υψηλή θερμική και μηχανική αντίσταση ([Manicone et al., 2007](#)). Λόγω των χαρακτηριστικών του, έχει πολλές εφαρμογές όπως ως καταλύτη ή υλικό στήριξης, πυρίμαχο υλικό, κεραμικό υλικό και τέλος ως μέσο βιομηχανικής υποστήριξης σε ιατρικά εμφυτεύματα ([Marangon et al., 2010](#)).

Το οξείδιο του ζirkονίου έχει αποδειχθεί ότι έχει την ικανότητα να απορροφά ασταθείς πρωτεΐνες για το κρασί, σταθεροποιώντας το κρασί και εξαλείφοντας, κατά προτίμηση, τα κλάσματα πρωτεΐνης του κρασιού μεταξύ 20-30 kDa ([Vasselina Pashova et al., 2004](#)). Αυτό το προσροφητικό επέτρεψε τη σταθεροποίηση του οίνου μέσω μιας συνεχούς διαδικασίας σταθεροποίησης με μικρές αρνητικές επιπτώσεις στα φυσικοχημικά και αισθητηριακά χαρακτηριστικά του. Πιο συγκεκριμένα διεξάχθηκε ένα πείραμα στο οποίο σφαιρίδια ζirkονίου εγκλωβίστηκαν σε ένα μεταλλικό «κλουβί», και εμβαπτίστηκαν μέσα στον οίνο. Το ζirkόνιο επιβεβαιώθηκε ότι είναι εξαιρετικός υποψήφιος για την απορρόφηση πρωτεΐνης από οίνους. Η προτεινόμενη τροποποίηση της εφαρμογής του στον οίνο (σφαιρίδια κλεισμένα σε μεταλλικό κλουβί) αντιπροσωπεύει ένα βήμα μπροστά στην υιοθέτηση αυτού του υλικού εμπορικά. Άλλες ενδεχόμενα ακινητοποίησης μπορεί να είναι πιο κατάλληλα για παραγωγή οίνων μεγαλύτερης κλίμακας από τη συγκεκριμένη μέθοδο, και αυτό θα πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω. Αυτή η μελέτη έδειξε επίσης ότι η αναγέννηση του υλικού μπορεί να είναι σχετικά απλή. Η ικανότητά του να μειώνει την οξύτητα και τη συγκέντρωση μεταλλικών ιόντων μπορεί να είναι ένα επιπλέον πλεονέκτημα για την παραγωγή οίνου και θα μπορούσε επίσης να αξιοποιηθεί δυναμικά από άλλους κλάδους της βιομηχανίας. Ένα από τα κύρια μειονεκτήματα της θεραπείας με ζirkόνιο φαίνεται να είναι η αναγκαιότητα ανάδευσης και τα σχετικά υψηλά επίπεδα δοσολογίας. Η εύκολη διαδικασία αναγέννησης μειώνει κατά κάποιον τρόπο τις αρνητικές πτυχές των απαιτήσεων για υψηλές δόσεις, επειδή το υλικό μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί πολλές φορές. Ωστόσο, οι φυσικές ιδιότητες του ζirkονίου που

χρησιμοποιήθηκε σε αυτή τη μελέτη δεν βελτιστοποιήθηκαν. Είναι πιθανό, εάν βελτιστοποιηθούν, οι ρυθμοί προσθήκης και οι χρόνοι επαφής να μειωθούν σημαντικά. Αυτό το ζήτημα της ανάγκης για ανάδευση θα μπορούσε να ξεπεραστεί με επεξεργασία των οίνων όταν συμβαίνει ανάδευση για άλλους λόγους, όπως κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Τα προκαταρκτικά αποτελέσματα δείχνουν ότι αυτή η λύση είναι και εφικτή και πολλά υποσχόμενη ([M.Lucchetta et al., 2013](#); [M.Marangon et al., 2010](#)).

6.11 Μαννοπρωτεΐνες

Οι μαννοπρωτεΐνες είναι μία από τις κύριες ομάδες πολυσακχαριτών που υπάρχουν στο κρασί και προστίθενται όλο και περισσότερο σε οινολογικά προϊόντα στα κρασιά με σκοπό την πρόληψη της κατακρήμνισης τρυγικού και πρωτεϊνών. Επιπλέον, η αλληλεπίδραση μεταξύ μαννοπρωτεϊνών και φαινολικών ενώσεων του κρασιού είναι ένα θέμα μεγάλου ενδιαφέροντος. Μελέτες έδειξαν τον πιθανό αντίκτυπο στη σταθερότητα του χρώματος και μια βελτίωση στα αισθητηριακά χαρακτηριστικά, δηλαδή τη μείωση της στυπτικότητας του ερυθρού οίνου και τη βελτίωση του αρωματικού προφίλ του ([Ghanem et al., 2017](#)).

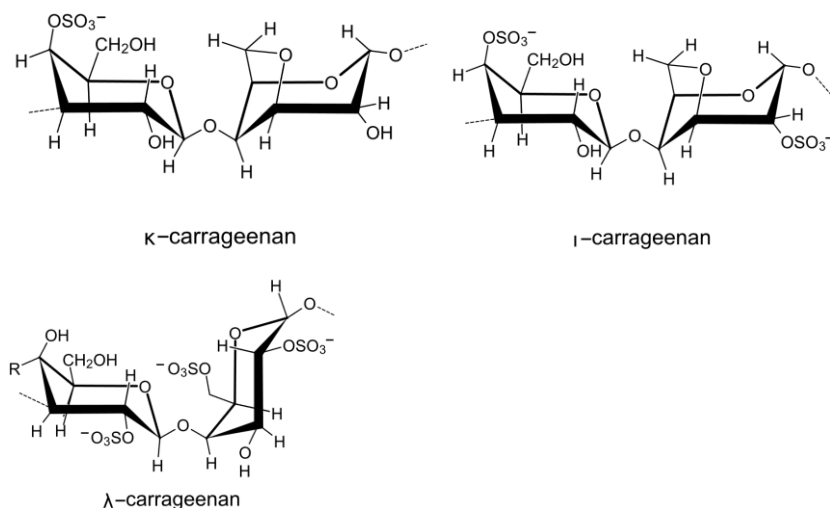
Εκχυλίσματα μαννοπρωτεϊνών μπορούν να προστεθούν στο κρασί για τη βελτίωση της ποιότητας και της σταθερότητάς του, και αρκετά εμπορικά προϊόντα είναι διαθέσιμα από την έγκρισή τους (Κανονισμός του Συμβουλίου της Ευρωπαϊκής Ένωσης (ΕΚ) αριθ. 2165/2005).

Γενικά, το πρωτέωμα των εκχυλισμάτων πλούσιων σε μαννοπρωτεΐνες αποκάλυψε βασικές πρωτεΐνες που θα μπορούσαν δυνητικά να συνδεθούν με την παρατηρούμενη μείωση της θολότητας του οίνου αυξάνοντας την πρωτεϊνική σταθερότητα των λευκών οίνων. Στην αναζήτηση πιο βιώσιμης και λιγότερο επιδραστικής εναλλακτικής λύσης αντί του μπεντονίτη για τη σταθεροποίηση της πρωτεΐνης του κρασιού, η απελευθέρωση ζυμομυκήτων στις ενώσεις του οίνου ικανή να βελτιώσει φυσικά τη σταθερότητά του θα ήταν ευπρόσδεκτη από τους οινοποιούς. Ως εκ τούτου, προσεγγίσεις που περιλαμβάνουν ζυμώσεις με στελέχη που υπερπαράγουν και απελευθερώνουν κυτταρικά τοιχώματα ζυμομύκητα στο μέσο, ειδικά μαννοπρωτεΐνες, σε συνθετικό γλεύκος ή μέσο ανάπτυξης (π.χ. YPD) θα μπορούσαν να αντιπροσωπεύουν μια συναρπαστική εναλλακτική για τη βελτίωση της σταθερότητας του οίνου στην οινική βιομηχανία. Επιπλέον, αποδείχθηκε ότι η εκτέλεση της αλκοολικής ζύμωσης του οίνου απευθείας χρησιμοποιώντας *S. bacillaris* σε μια διαδοχική ζύμωση με *S. cerevisiae* μπορεί να είναι ένας τρόπος για να

απελευθερωθούν φυσικά αυτοί οι πολυσακχαρίτες και οι πρωτεΐνες των κυτταρικών τοιχωμάτων στη μήτρα, μειώνοντας έτσι τη θολότητα του οίνου. Επιπλέον, η αποικοδόμηση των πρωτεϊνών σταφυλιού από τα ένζυμα των κυτταρικών τοιχωμάτων της ζύμης θα μπορούσε ενδεχομένως να χρησιμοποιηθεί για να αυξήσει φυσικά τη διαθεσιμότητα αζώτου, μειώνοντας την προσθήκη αζώτου κατά τη διαδικασία οινοποίησης. Ωστόσο, οι μηχανισμοί με τους οποίους οι ενώσεις της ζύμης συμβάλλουν στη σταθερότητα της πρωτεΐνης του οίνου παραμένουν ακόμα ασαφείς. Έτσι, η εφαρμογή επί τόπου αναλύσεων για τη διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών σταφυλιού, των υπεύθυνων ενώσεων που προκαλούν σχηματισμό θολώματος και πολυσακχαριτών/γλυκοζυλιωμένων πρωτεϊνών που υπάρχουν σε εκχυλίσματα πλούσια σε μαννοπρωτεΐνες μπορεί να είναι ένα συναρπαστικό εργαλείο για την κατανόηση των μηχανισμών προστασίας από την θολότητα στα κρασιά ([Moreira et al., 2023](#)).

6.12 Καραγενάνη

Η πρωτεϊνική σταθεροποίηση οίνων με χρήση πολυσακχαριτών όπως οι καραγενάνες είναι πλέον κατοχυρωμένη στις βιομηχανίες ζύθου και γάλακτος. Οι καραγενάνες είναι φυσικοί πολυσακχαρίτες που εξάγονται από κόκκινα φύκια του είδους *Rhophyta* και επομένως είναι ένας πιθανός ανανεώσιμος παράγοντας θερμικής σταθεροποίησης. Η χρήση του ως πρόσθετο στον οίνο έχει επιτραπεί στην Αυστραλία, τη Νέα Ζηλανδία, την Ευρώπη και τις ΗΠΑ. Αυτοί οι πολυσακχαρίτες αποτελούνται από έναν σκελετό γαλακτάνης από εναλλασσόμενα υπολείμματα 1,3-συνδεδεμένου-β-D-γαλακτοπυρανοσυλίου και 3,6-άνυδρο-D-γαλακτόζης με μοριακή μάζα μεταξύ 200 και 800 kDa και μπορεί να περιέχουν ομάδες θειικών εστέρων. Υπάρχουν τρεις εμπορικά διαθέσιμοι δομικοί τύποι καραγενανών, συγκεκριμένα η κ-, λ- και ι-καραγενάνη.

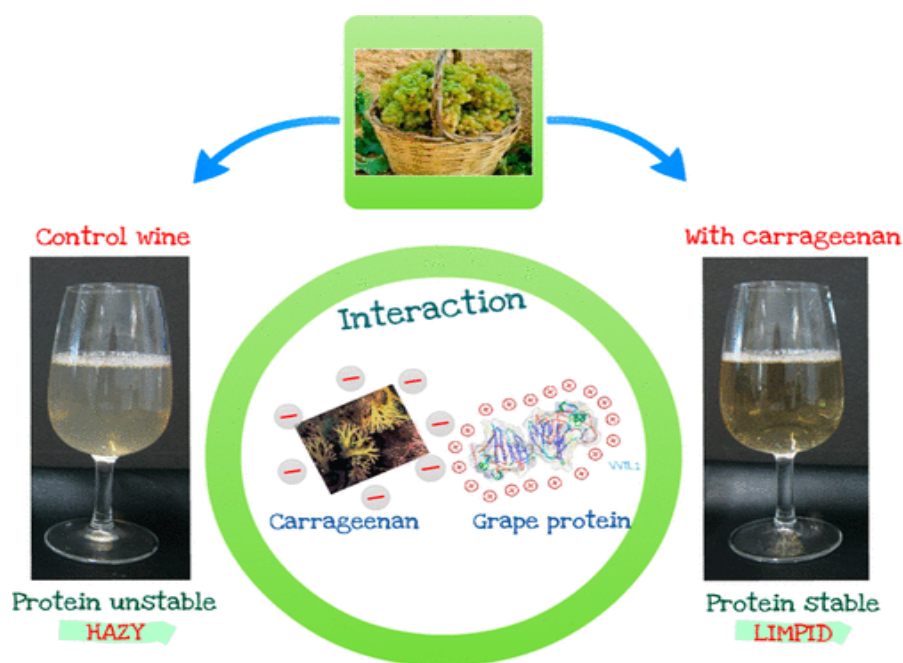


Εικόνα 22. Δομές της κ-, λ- και ι-καραγενάνης

Αυτοί οι πολυσακχαρίτες θεικών εστέρων χρησιμοποιούνται ευρέως σε βιομηχανικές εφαρμογές στις οποίες χρησιμοποιούνται κ-καρραγενάνες (επανάληψη G4S-DA) και ι-καρραγενάνες (επανάληψη G4S-DA2S) για τις πηκτωματοποιητικές τους ιδιότητες και η λ-καρραγενάνη (G2S-D2S6S), μία μη πηκτωματοποιήσιμη καρραγενάνη, ως πηκτικό παράγοντα. Οι ισχυρές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ομάδων θειικού εστέρα των γειτονικών ελίκων, που προκαλούνται από ιόντα καλίου (K^+) και ασβεστίου (Ca^{2+}), είναι υπεύθυνες για τη σταθεροποίηση των τρισδιάστατων δομών των κ- και ι-καρραγενανών, αντίστοιχα. Οι καρραγενάνες εμφανίζονται φυσικά ως άλας K^+ , αν και μπορούν να τροποποιηθούν στο άλας νατρίου (Na^+) μέσω μιας διαδικασίας ανταλλαγής ιόντων ([Ratnayake et al., 2019](#))

Η καρραγενάνη που προστέθηκε σε διαφορετικά στάδια της οινοποίησης αξιολογήθηκε για την απομάκρυνση της πρωτεΐνης και τον αντίκτυπό της στη θερμική σταθερότητα του κρασιού και στο χημικό και αισθητηριακό προφίλ των κρασιών. Πραγματοποιήθηκε προσθήκη σε Semillon κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και μετά τη ζύμωση και στους τελικούς οίνους, και το αποτέλεσμα κάθε προσθήκης συγκρίθηκε με αυτό της διόγκωσης μπεντονίτη στο ίδιο χρονικό σημείο. Τα δεδομένα για τη συγκέντρωση πρωτεΐνης, τη σταθερότητα στη θερμότητα και τις απαιτήσεις για μπεντονίτη υποδεικνύουν ότι όταν προστέθηκε στη σωστή δόση η καρραγενάνη ήταν πολύ αποτελεσματική στη σταθεροποίηση των κρασιών σε δοσολογίες τουλάχιστον τρεις φορές χαμηλότερες από αυτές του μπεντονίτη. Επιπλέον, η επεξεργασία με καρραγενάνη δεν προκάλεσε αύξηση στον όγκο της οινολάσπης σε σχέση με τον μπεντονίτη και οδήγησε σε πολύ παρόμοιες

χημικές παραμέτρους με το κρασί χωρίς φινίρισμα και με μπεντονίτη. Αισθητηριακά, παρόλο που το κρασί επεξεργασμένο με καραγενάνη ήταν σημαντικά διαφορετικό από τον οίνο που δεν είχε υποστεί διαύγαση, το μέγεθος της διαφοράς δεν διέφερε σημαντικά σε σύγκριση με την επεξεργασία με μπεντονίτη. Η σκοπιμότητα της χρήσης καραγενάνης σε ένα περιβάλλον παραγωγής οινοποιείου θα πρέπει να καθοριστεί από μεμονωμένα οινοποιεία, καθώς θα πρέπει να ληφθούν υπόψη τεχνικά ζητήματα όπως η δημιουργία αφρού, η βραδύτερη ικανότητα φιλτραρίσματος και ο κίνδυνος υπερκολλαρίσματος σε σχέση με τα οφέλη, ιδιαίτερα όταν η καραγενάνη χρησιμοποιείται πριν ή κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (Marangon et al., 2013).



Εικόνα 23. Διαύγαση ασταθούς οίνου με προσθήκη καραγενάνης (Marangon et al., 2013)

Πραγματοποιήθηκε σε εργαστηριακό επίπεδο σύγκριση μεταξύ της προσθήκης καραγενάνης και μπεντονίτη, σε διαφορετικές φάσεις της οινοποίησης, ως προς τις χημικές παραμέτρους του οίνου που αναγράφονται στον παρακάτω Πίνακα.

Παράμετροι όπως αλκοόλη, πτητική οξύτητα, ελεύθερο και ολικό SO₂, χρόνος ολοκλήρωσης της ζύμωσης, κιτρικό οξύ, ηλεκτρικό οξύ και γαλακτικό οξύ δεν έδειξαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των θεραπειών. Σε έξι μόνο περιπτώσεις η παράμετρος που μετρήθηκε διέφερε σημαντικά από τον μη εκλεπτυσμένο μάρτυρα: Ο οίνος με προσθήκη καραγενάνης 1/2 είχε σημαντικά χαμηλότερη ποσότητα μηλικού οξέος από το μη εκλεπτυσμένο κρασί, παρόλο που η συνολική του οξύτητα δεν ήταν διαφορετική από αυτή

του μάρτυρα. Όταν προστέθηκαν κατά τη ζύμωση, τα επεξεργασμένα με καραγενάνη κρασιά (Car ferm) είχαν σημαντικά λιγότερα υπολειμματικά σάκχαρα και γλυκερίνη από τον έλεγχο, ενώ όταν προστέθηκε η καραγενάνη μετά τη ζύμωση επηρέασε σημαντικά το pH και τη συνολική οξύτητα του προκύπτοντος κρασιού. Η διόγκωση μπεντονίτη προκάλεσε σημαντική μείωση στην ποσότητα λυκερίνης, αλλά μόνο όταν προστέθηκε μετά τη ζύμωση. Γενικά, σε σύγκριση με το μη εκλεπτυσμένο κρασί, οι επτά επεξεργασίες δεν προκάλεσαν καμία σημαντική επίδραση στις κοινές παραμέτρους οινοποίησης που μετρήθηκαν ([Marangon et al., 2013](#)).

Πίνακας 6. Επίδραση των επεξεργασιών με καραγενάνη και μπεντονίτη στις χημικές παραμέτρους του εμφιαλωμένου οίνου ([M. Marangon et al., 2013](#)).

παράγοντας	αφιλτράριστο	Οίνος με καραγενάνη	Οίνος με Μπεντονίτη	Οίνος με καρ. 1/2	Καρ. ζύμωση	Μπεντονίτης της ζύμωσης	Καρ. Μετά τη ζύμωση	Μπεντονίτης πριν τη ζύμωση
αλκοόλη (% v/v)	11.70 a	11.70 a	11.70 a	11.67 a	11.70 a	11.70 a	11.60 a	11.67 a
γλυκόζη + φρουκτόζη (g/L)	0.20 a	0.20 a	0.20 a	0.13 ab	0.10 b	0.20 a	0.17 ab	0.13 ab
Πτητική οξύτητα (g/L)	0.26 a	0.26 a	0.26 a	0.30 a	0.34 a	0.32 a	0.26 a	0.28 a
Ολική οξύτητα (εκφρασμένη σε τρυγικό οξύ) (g/L)	5.90 b	5.97 b	5.90 b	5.90 b	6.00 ab	5.90 b	6.13 a	5.93 b
pH	3.16 b	3.17 ab	3.17 ab	3.17 ab	3.16 b	3.17 ab	3.21 a	3.18 ab
ελεύθερο SO ₂ (mg/L)	38.33 a	35.67 a	37.33 a	36.33 a	37.67 a	37.00 a	36.67 a	37.00 a
Ολικό SO ₂ (mg/L)	100.67 a	98.00 a	102.33 a	99.67 a	101.67 a	98.33 a	97.00 a	96.67 a

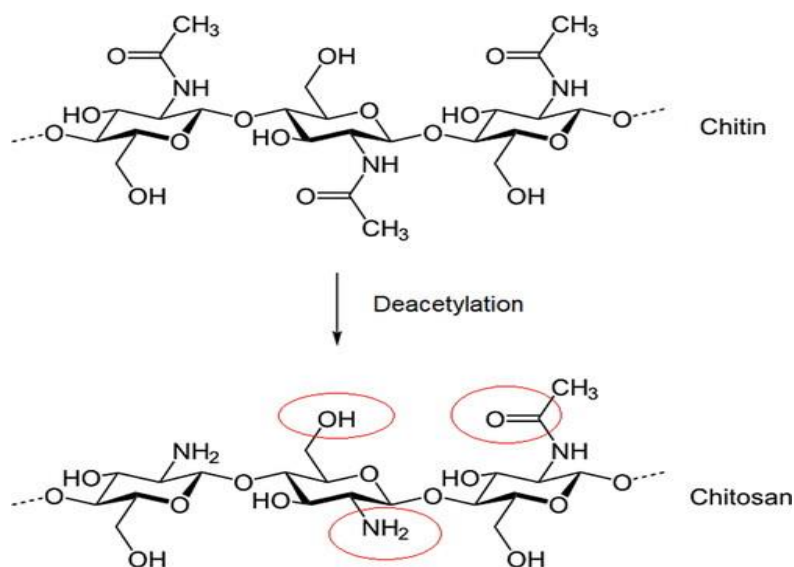
Χρόνος ζύμωσης (ημέρες)	7.00 a	7.00 a	7.00 a	7.00 a	7.00 a	7.00 a	7.00 a	7.00 a	7.00 a
citric acid (g/L)	0.26 a	0.25 a	0.26 a	0.24 a	0.25 a	0.27 a	0.29 a	0.26 a	0.26 a
Τρυγικό οξύ (g/L)	2.76 ab	2.78 ab	2.79 ab	2.61 b	2.82 a	2.68 ab	2.81 a	2.66 ab	2.66 ab
Μηλικό οξύ (g/L)	2.87 a	2.87 a	2.92 a	2.68 b	2.83 ab	2.89 a	2.79 ab	2.85 ab	2.85 ab
Ηλεκτρικό οξύ (g/L)	2.01 a	1.98 a	2.03 a	1.90 a	1.97 a	1.99 a	1.93 a	1.97 a	1.97 a
Γαλακτικό οξύ (g/L)	0.56 a	0.52 a	0.56 a	0.50 a	0.54 a	0.53 a	0.51 a	0.51 a	0.51 a
γλυκερόλη (g/L)	6.79 a	6.49 ab	6.64 a	6.34 abc	5.84 bc	6.68 a	6.59 a	5.70 c	5.70 c

Οι κ-καραγενάνες έχουν αποδείχθει ως προς την ικανότητα να παράγουν θερμικά σταθερό οίνο χωρίς αύξηση της οινολάσπης ή της θολότητας του. Η κάπα-καρραγενάνη με ιόντα K^+ που προστέθηκαν στον οίνο ήταν η πιο αποτελεσματική θεραπεία για την παραγωγή θερμοσταθερού οίνου με ελάχιστη επίδραση στα αισθητήρια προφίλ, τις οινολάσπες, τη θολότητα, τη δυνατότητα φιλτραρίσματος και τη συγκέντρωση μεταλλικών ιόντων σε σύγκριση με τους μη επεξεργασμένους οίνους ελέγχου. Η αισθητηριακή ανάλυση έδειξε επίσης ότι οι οίνοι που ήταν θερμικά σταθεροποιημένοι με καρραγενάνη είχαν πιο έντονα προφίλ γεύσης και αρώματος από εκείνους που σταθεροποιήθηκαν με προσθήκη μεντονίτη. Η διαύγαση χυμού με πηκτινάση βελτίωσε σημαντικά τη δυνατότητα φιλτραρίσματος όλων των οίνων που έχουν υποστεί επεξεργασία με καρραγενάνη. Η δυνατότητα των καρραγενανών να διευκολύνουν τον διπλό ρόλο ως παράγοντα διαύγασης στην υποβοήθηση της επίπλευσης και ως παράγοντα σταθεροποίησης της θερμότητας θα πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω δεδομένων των

ιδιοτήτων επίπλευσης των καραγενανών. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έδειξαν ότι η κάπα-καραγενάνη, ένας ανανεώσιμος παράγοντας διαύγασης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη σταθεροποίηση των οίνων ως μια χρήσιμη εναλλακτική λύση στον μπεντονίτη (Ratnayake et al., 2019).

6.13 Χιτίνη και Χιτοζάνη

Η χιτίνη είναι ο δεύτερος πιο άφθονος πολυσακχαρίτης στη γη, μετά την κυτταρίνη. Αυτό το βιοπολυμερές, που αποτελείται από μονάδες 2-ακεταμιδο-2-δεοξυ-β-D-γλυκόζης (N-ακετυλογλυκοζαμίνη) που συνδέονται με β(1→4) δεσμούς, συντίθεται σε μεγάλες ποσότητες από μεγάλο αριθμό ζωντανών οργανισμών και σχηματίζει τον εξωσκελετό των αρθρόποδων και των εντόμων, τα κελύφη των καρκινοειδών και τα κυτταρικά τοιχώματα μυκήτων και φυτών.



Εικόνα 24. Χημικές δομές χιτίνης και ΚΤ. Τα κυκλωμένα τμήματα τονίζουν αυτά που μπορεί να συμβάλλουν στην αντιδραστικότητα και τη φυσικοχημική συμπεριφορά του ΚΤ.

Ένα κύριο παράγωγο της χιτίνης είναι η χιτοζάνη (ΚΤ), η οποία μπορεί να ληφθεί βιομηχανικά με N-αποακετυλίωση χιτίνης σε ποικίλους βαθμούς (>50%) μέσω μιας διαδικασίας που περιλαμβάνει αποπρωτεϊνοποίηση, απομεταλλοποίηση, αποχρωματισμό και αποακετυλίωση. Η αποακετυλίωση παράγει ελεύθερες ομάδες αμίνης (-NH₂) κατά μήκος της ραχοκοκαλιάς του πολυσακχαρίτη. Αυτό προσδίδει στην ΚΤ έναν πολυκατιονικό χαρακτήρα και, ανάλογα με το βαθμό αποακετυλίωσης (DD) και το μοριακό βάρος (MW), μεταβάλλεται η διαλυτότητα σε όξινα μέσα (Friedman and Juneja Citation2010) και το καθιστά πολυμερές που διαφέρει από άλλα ουδέτερα ή αρνητικά φορτισμένα φυσικά πολυσακχαρίτες. Η χιτοζάνη μπορεί να παρασκευαστεί σε διάφορες

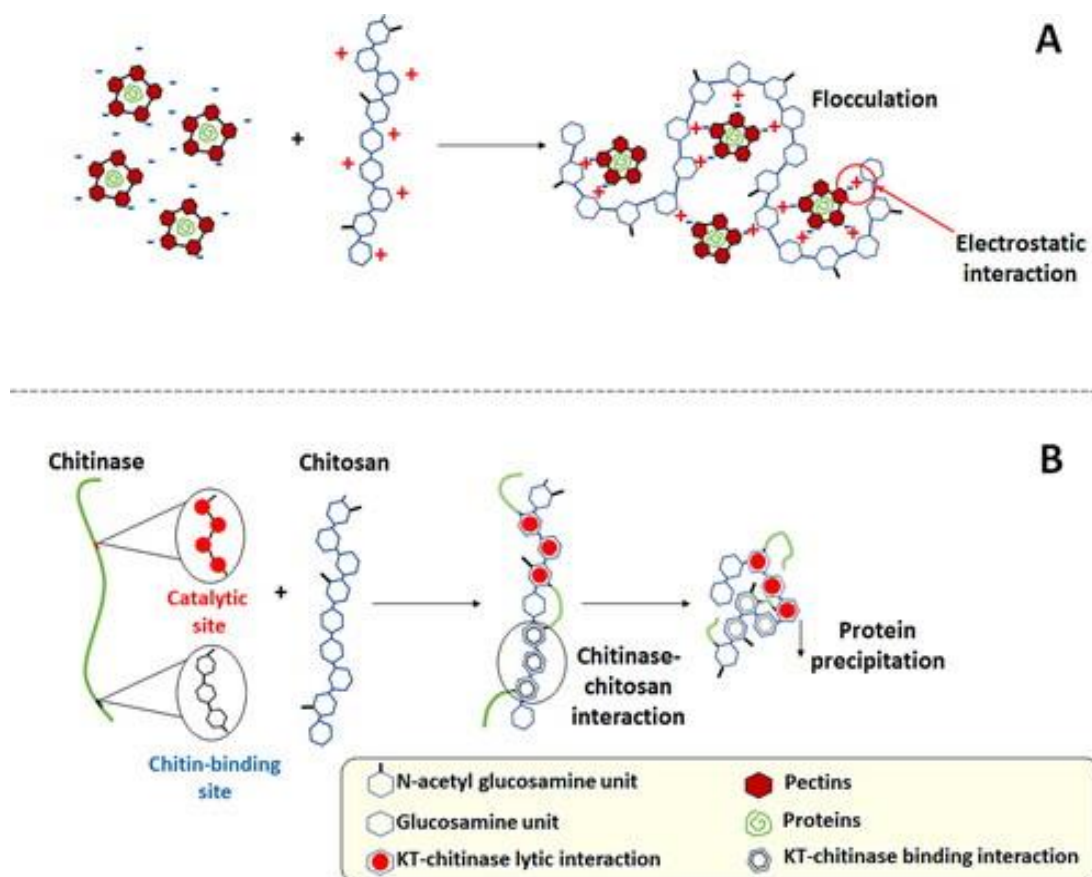
μορφές, όπως μεμβράνες, πηκτώματα, χάντρες, νανο/μικροσωματίδια, και αυτή η δυνατότητα, μαζί με τη βιοαποικοδομησιμότητα, τη βιοσυμβατότητα και τη χαμηλή τοξικότητά της την καθιστά μια ευέλικτη ένωση με τεράστια δυνατότητα εφαρμογής σε πολλούς τομείς, συμπεριλαμβανομένων των τροφίμων, της ιατρικής, των καλλυντικών και των φαρμακευτικών επιστημών ([Castro Marín et al., 2020](#)).

Η χιτοζάνη είναι δομικά γραμμική, θετικά φορτισμένη κάτω από pH 6,5. Σε αντίθεση με τη χιτίνη, που είναι εξαιρετικά υδρόφοβη, η χιτοζάνη είναι διαλυτή σε όξινα διαλύματα ανάλογα με το βαθμό αποακετυλίωσης της και παρουσιάζει ιδιότητες υψηλού ενδιαφέροντος στη βιομηχανία τροφίμων, π.χ. αντιοξειδωτική και ριζική δράση σάρωσης και αντιμικροβιακή δράση. Η μυκητοειδής χιτοζάνη από το *Aspergillus niger* είναι ο μόνος τύπος χιτοζάνης που είναι αποδεκτός στην οινοποίηση (Κανονισμός της Επιτροπής (ΕΕ) 53/2011) και η προσθήκη στους οίνους στοχεύει μέχρι τώρα στον έλεγχο του πληθυσμού *Brettanomyces spp* και στην απομάκρυνση της ωχρατοξίνης Α, του σιδήρου, του μολύβδου, του καδμίου και του χαλκού. Το όριο προσθήκης χιτοζάνης κυμαίνεται από 10 g/hl έως 500 g/hl σύμφωνα με τον στόχο (κανονισμός της Επιτροπής (ΕΕ) 53/2011). για λόγους πρόστιμου το όριο αυτό ορίζεται στα 100 g/hL ([Colangelo et al., 2018](#)).

Από το 2003, η ΚΤ περιλαμβάνεται στον Codex Alimentarius ως πηκτικός παράγοντας για χυμούς φρούτων. Η προσθήκη μυκητιασικού ΚΤ σε γλεύκη και κρασιά για σκοπούς εκχύλισης έχει εγκριθεί διαδοχικά από τον OIV (OIV, [Citation2009a](#)· OIV, [Citation2009b](#)) για τη μείωση της θολότητας με την καθίζηση σωματιδίων σε εναιώρημα ή περίσσεια πρωτεϊνικής ύλης.

Ως προς τη δράση της ΚΤ ως μέσο κολλαρίσματος, η ίδια βρέθηκε ότι εξαλείφει σχεδόν πλήρως τις χιτινάσες του κρασιού, ενώ η αποκλειστική χρήση αυτής μειώνει ελαφρώς την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες TL. Παρόμοια αποτελέσματα λήφθηκαν προηγουμένως με τη χιτίνη που επέτρεπε μειώσεις της θολότητας του κρασιού έως και 80% μετά από τεστ θερμότητας διαυγασμένων δειγμάτων και την αφαίρεση του 29% των πρωτεϊνών του οίνου (Vincenzi, Polesani and Curioni [Citation2005](#)). Σχετικές έρευνες έδειξαν ότι η χιτίνη είχε υψηλότερη απόδοση διαύγασης (αναλογία μεταξύ ποσοστιαίας μείωσης της θολότητας και ποσοστού αφαίρεσης πρωτεϊνών) σε σύγκριση με αυτή του μπεντονίτη. Ειδικότερα, διευκρινίστηκε ότι η χιτίνη μπορούσε να αλληλεπιδράσει επιλεκτικά με τις χιτινάσες κατηγορίας IV, οι οποίες είναι κυρίως υπεύθυνες για την αστάθεια του λευκού οίνου. Και στις δύο μελέτες, ο εγγενής μηχανισμός αλληλεπίδρασης υποτίθεται ότι βασίζεται (i) στην παρουσία μιας πλούσιας σε κυστεΐνη περιοχής δέσμευσης χιτίνης σε χιτινάσες κατηγορίας IV, ικανού να δεσμεύει χιτίνη και ΚΤ και υποτίθεται ότι

αφαιρείται μαζί με αυτούς τους αδιάλυτους πολυσακχαρίτες και (ii) σε μικρότερο βαθμό, στη μείωση των φαινολικών ενώσεων, που είναι διαθέσιμες για συμμετοχή στα φαινόμενα σχηματισμού θολότητας, λόγω της προσρόφησής τους στη ΚΤ. Αξίζει να αναφερθεί ότι με βάση τον προηγούμενο μηχανισμό, η ΚΤ έχει προταθεί ως ειδικός σύνδεσμος για την κατακρήμνιση συγγένειας και την ανάκτηση φυτικών χιτινασών (Castro Marín et al., 2020).



Εικόνα 25. Μηχανισμοί διαύγασης με χιτοζάνη (ΚΤ) σε χυμούς και κρασιά. Α: Ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση πρωτεϊνών με πηκτίνες. Β: Ενεργή δέσμευση θέσης με χιτινάση (Castro Marín et al., 2020)

Από μελέτες των Colangelo et al., 2018 φάνηκε ότι η χιτοζάνη δεν άσκησε αρνητικό αντίκτυπο στην αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών ουσιών του κρασιού ούτε αφαιρέσε σημαντικές ποσότητες μη αναγωγικών πολυφαινολών. Επίσης, η επίδραση στο χρώμα του οίνου ήταν ελαφριά και δεν ήταν ορατή με γυμνό μάτι, ενώ η διαύγεια δεν επηρεάστηκε. Ένα ακόμη πλεονέκτημα της προσθήκης χιτοζάνης είναι ότι θα μπορούσε να προστατεύσει τις κατεχίνες από την οξείδωση και έτσι μπορεί να θεωρηθεί μια ενδιαφέρουσα εναλλακτική λύση στη χρήση μπεντονίτη. Επιπλέον, εκτός από την

πρωτεϊνική σταθεροποίηση συμβάλλει στην πρόληψη και αντιμετώπιση του browning (καφετιάσματος) του οίνου (Colangelo et al., 2018).

Στον πίνακα που ακολουθεί γίνεται μία σύνοψη των μεθόδων που χρησιμοποιούνται για την σταθεροποίηση των πρωτεϊνών και συγκρίνονται ως προς το κόστος, την φιλικότητα στο περιβάλλον, την βιομηχανική εφαρμογή, την επίδραση στην ποιότητα του οίνου, καθώς και στον χρόνο στην αγορά.

Πίνακας 7. Τεχνολογίες σταθεροποίησης πρωτεϊνών: Κόστος, φιλικότητα προς το περιβάλλον, βιομηχανική εφαρμογή, ποιότητα οίνου και χρόνος διάθεσης στην αγορά (Silva-Barbieri et al., 2022)

Μέθοδος σταθεροποίησης	Αποτελ. κόστους	Οικολογικά	Υλοποίηση στην βιομηχανία	Ποιότητα οίνου	ΤΤΜ
Μπεντονίτης	●●●○○	●○○○○	●●●●●	●○○○○	●●●●●
Υπερηχογράφημα υψηλής ισχύος	●●●○○	●●●○○	●○○○○	●●○○○	●●●○○
Θέρμανση + ένζυμα	●●○○○	●●○○○	●○○○○	●●○○○	●●●○○
Υπερδιήθηση	●●●○○	●●○○○	●●●○○	●○○○○	●●●○○
Ακίνητοποιημένα ένζυμα στηριζόμενα σε χιτοζάνη	●●○○○	●●○○○	●●○○○	●●○○○	●●○○○
Μαγνητικά νανοσωματίδια επικαλυμμένα με ακρυλικό οξύ	●●●○○	●●○○○	●○○○○	●●●○○	●●○○○
Ζεόλιθοι	●●○○○	●●●○○	●●○○○	●●○○○	●●●○○
Καβουρδισμένοι σπόροι σταφυλιών σε σκόνη	●●○○○	●●○○○	●●●○○	●●●○○	●●●○○

Ζιρκόνιο	●●●○○	●●●●○	●●●○○	●●●○○	●●●○○
Μέθοδοι προσθήκης					
Μαννοπρωτεΐνες	●●●○○	●●●○○	●●●●○	●●●●○	●●●●○
Καρραγενάνη	●●●○○	●●●○○	●●●●○	●●●○○	●●●○○
Χιτοζάνη	●●●○○	●●●○○	●●●●○	●●●●○	●●●●○

7. Συμπεράσματα - Συζήτηση

Συνοψίζοντας, οι πρωτεΐνες στον οίνο, αν και λίγες σε αριθμό, παρουσιάζουν ιδιότητες με μεγάλο ενδιαφέρον στον τύπο του οίνου, όπως στους αφρώδεις οίνους, καθώς και στη φυσιολογία του φυτού και στην ταυτοποίηση της ποικιλίας του σταφυλιού. Όπως αναλύθηκε ενδελεχώς στην παρούσα εργασία, η αστάθεια αυτή που προκαλούν οι πρωτεΐνες στους οίνους επηρεάζεται τόσο από εξωτερικούς όσο και από εγγενείς παράγοντες και είναι μια πολύπλευρη πρόκληση για την οινοποίηση εφόσον επιδρά αρνητικά στην διαύγεια και την ποιότητα του οίνου. Οι χιτινάσες και οι TLPs είναι οι πιο σημαντικές πρωτεΐνες που εμπλέκονται στο σχηματισμό θολότητας του οίνου, και άλλα συστατικά του όπως τα θειικά άλατα και οι πολυφαινόλες, καθώς και το pH, μπορούν να επηρεάσουν τη συσσώρευση των πρωτεϊνών.

8. Βιβλιογραφία

Επιστημονικά Άρθρα

- [Abernathy Daniel. G., Spedding Gary. and Starcher Barry.](#), Analysis of Protein and Total Usable Nitrogen in Beer and Wine Using a Microwell Ninhydrin Assay/ Journal of the Institute of Brewing, 2012, Volume 115, Issue 2/ p. 122-127
- [Alberts B., Johnson A., Lewis J. et al.](#), The Shape and Structure of Proteins/ Molecular Biology of the Cell. 4th edition, New York: Garland Science; 2002. The Shape and Structure of Proteins.
- [Albuquerque Wendell, Seidel Leif, Zorn Holger, Will Frank and Gand Martin.](#) Haze Formation and the Challenges for Peptidases in Wine Protein Fining/ Journal of Agricultural and Food Chemistry 2021, Volume 69, Issue 48, Pages 14402-14414/ Copyright © 2021 The Authors. Published by American Chemical Society.
- [Bakardzhiyski Ivan.](#) Protein change in Chardonnay wine from Bulgaria after treatment with different types of bentonites/ Food Science and Applied Biotechnology, 2022, 5(2), 140-150
- [Batista Luís, Monteiro Sara, Loureiro Virgílio B., Teixeira Artur R., Ferreira Ricardo B.](#), Protein haze formation in wines revisited. The stabilising effect of organic acids/ Food Chemistry, 15 October 2010, Volume 122, Issue 4, Pages 1067-1075
- [Batista Luis, Monteiro Sara, Loureiro Virgilio B., Teixeira Artur R. and Ferreira Ricardo B.](#), The complexity of protein haze formation in wines/ Food Chemistry, 2009, Volume 112, Issue 1, Pages 169 – 177
- [Bayly & Berg.](#) Grape and Wine Proteins of White Wine Varietals/ American Journal of Enology and Viticulture, 1967, 18: 18-32
- [Benucci I., Lombardelli C., Cacciotti I., Liburdi K., Nanni F., Esti M.](#), Chitosan beads from microbial and animal sources as enzyme supports for wine application. Food Hydrocoll. 2016;61:191–200. doi: 10.1016/j.foodhyd.2016.05.016
- [Benucci Ilaria, Lombardelli Claudio, Liburdi Katia, Acciaro Giuseppe, Zappino Matteo and Esti Marco.](#) Immobilised native plant cysteine proteases: packed-bed reactor for white wine protein stabilisation/ Journal of Food Science and Technology, 2016, Volume 53, pages 1130-1139

- [Brissonnet F. and Maujean A.](#), Characterization of Foaming Proteins in a Champagne Base Wine/American Journal of Enology and Viticulture (AJEV), 1993, 44:297-301/ DOI: 10.5344/ajev.1993.44.3.297
- [Carlsson Nils, Borde Annika, Wolfel Sebastian, Akerman Bjorn and Larsson Anette](#), Quantification of protein concentration by the Bradford method in the presence of pharmaceutical polymers/ Analytical Biochemistry, Volume 411, Issue 1, 1 April 2011, Pages 116-121, Department of Chemical and Biological Engineering, Chalmers University of Technology, SE-412 96 Gothenburg, Sweden.
- [Castro Antonio Marín, Donato Colangelo, Milena Lambri, Claudio Riponi & Fabio Chinnici.](#), Relevance and perspectives of the use of chitosan in winemaking: a review/ Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2021, Volume 61, Issue 20, Pages 3450-3464
- Celotti E., Barahona M.S.O., Bellantuono E., Cardona J., Roman T., Nicolini G., Natolino A., High-power ultrasound on the protein stability of white wines: Preliminary study of amplitude and sonication time. *LWT*. 2021;147:111602. doi: 10.1016/j.lwt.2021.111602.
- [Chromý Vratislav Bara Vinklarkova, Ludek Sprongl, Mirosova Bittova.](#) The Kjeldahl Method as a Primary Reference Procedure for Total Protein in Certified Reference Materials Used in Clinical Chemistry. I. A Review of Kjeldahl Methods Adopted by Laboratory Medicine/ Critical Reviews in Analytical Chemistry 2015, Volume 45, Issue 2, Pages 106-111
- [Colangelo Donato, Torchio Fabrizio, De Faveri Dante Marco and Lambri Milena](#), The use of chitosan as alternative to bentonite for wine fining: Effects on heat-stability, proteins, organic acids, colour, and volatile compounds in an aromatic white wine/ Food Chemistry, 2018, Volume 264, 30 October 2018, Pages 301-309
- [Comuzzo Piergiorgio, Voce Sabrina, Fabris Jacopo, Cavallaro Angelo, Zanella Gianmaria, Karpusas Michael, Kallithraka Stamatina.](#) Effect of the combined application of heat treatment and proteases on protein stability and volatile composition of Greek white wines/ Vol. 54 No. 1 (2020): OENO One
- [Conde Bruna C., Bouchard Eloise, Culbert Julie A, Wilkinson Kerry L., Fuentes Sigfredo and Howell Kate S.](#) Soluble Protein and Amino Acid Content Affects the Foam Quality of Sparkling Wine/ Journal of Agricultural and Food Chemistry, September 2017, Volume 65, Issue 41, Pages 9110-9119

- [Cosme Fernanda, Conceição Fernandes, Tânia Ribeiro, Luís Filipe-Ribeiro and Fernando M. Nunes](#), White Wine Protein Instability: Mechanism, Quality Control and Technological Alternatives for Wine Stabilisation – An Overview/ Beverages 2020, Volume 6, Issue 1
- [de Jesús-Pires C, Ferreira-Neto JRC, Pacifico Bezerra-Neto J, Kido EA, de Oliveira Silva RL, Pandolfi V, Wanderley-Nogueira AC, Binneck E, da Costa AF, Pio-Ribeiro G, Pereira-Andrade G, Sittolin IM, Freire-Filho F, Benko-Iseppon AM.](#) Plant Thaumatin-like Proteins: Function, Evolution and Biotechnological Applications/ Current Protein & Peptide Science, Volume 21, Number 1, 2020, pp. 36-51
- [Deepti Jain and Jitendra Paul Khurana](#). Role of Pathogenesis-Related (PR) Proteins in Plant Defense Mechanism/ Molecular Aspects of Plant-Pathogen Interaction, pp 265-281, 2018
- [Dias Moreira Luiza de Paula, Porcellato Davide, Marangon Matteo, Nadai Chiara, Duarte Vinicius, Gulbrandsen Devold Tove, Giacomini Alessio, Corich Viviana](#), Interactions between *Starmerella bacillaris* and *Saccharomyces cerevisiae* during sequential fermentations influence the release of yeast mannoproteins and impact the protein stability of an unstable wine/ Food Chemistry, Volume 440, 15 May 2024
- [Dufrechou Marie, Poncet-Legrand Celine, Sauvage Francois-Xavier, Vernhet Aude](#), Stability of White Wine Proteins: Combined Effect of pH, Ionic Strength, and Temperature on Their Aggregation/ Journal of Agricultural and Food Chemistry, Feb 2012, Volume 60, Issue 5, Pages 1308-1319
- [Eguizabal Elba Bonilla](#), Estudio sobre las características de la formación de turbidez proteica en vinos y nuevas alternativas para su estabilización, 2020-2021/ Ciencia y Tecnología de Alimentos Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (ICVV)/ Universidad de la Rioja/ (ICVV) Tesis.
- [Falconer Robert J., Marangon Matteo, Van Sluyter Steven C., Neilson Karlie A., Chan and Waters Elizabeth J.](#), Thermal Stability of Thaumatin-Like Protein, Chitinase, and Invertase Isolated from Sauvignon blanc and Semillon Juice and Their Role in Haze Formation in Wine/ Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, Volume 58, Issue 2, Pages 975-980
- [Ferreira Ricardo B. Sara S Monteiro, M Antonieta Piçarra-Pereira, Artur R Teixeira](#), Engineering grapevine for increased resistance to fungal pathogens without compromising wine stability/ Trends in Biotechnology, 2004, Volume 22, Issue 4, p. 168-173
- [García Martín Alba](#), Proteínas de la uva y el vino. Funcionalidad tecnológica y biológica/ Universidad de Sevilla, Trabajo Fin de grado, 2018/ Facultad de Farmacia

- [Ghanem Chantal, Patricia Taillandier, M. Rizk, Ziad Rizk, Nancy Nehme, Jean-Pierre Souchard, Youssef El Rayess](#), Analysis of the impact of fining agents types, oenological tannins and mannoproteins and their concentrations on the phenolic composition of red wine/ *LWT - Food Science and Technology*, 2017, Volume 83, 15 September 2017, Pages 101-109
- [Hong-Yue Zhai, Si-Yu Li, Xu Zhao, Yi-Bin Lan, Xin-Ke Zhang, Ying Shi, Chang-Qing Duan](#), The compositional characteristics, influencing factors, effects on wine quality and relevant analytical methods of wine polysaccharides: A review/ *Food Chemistry*, Volume 403, March 2023, 134467
- [Hortolomeu Andreea, Nistor Ileana - Denisa](#). White wine protein instability: a review/ *Journal of Engineering Sciences and Innovation*, 2021, Volume 6, Issue 4 / 2021, pp. 381-398/ *C. Chemical Engineering, Materials Science and Engineering/ Technical Sciences Academy of Romania*
- [Horvat I., Radeka S., Plavša T., Lukić I.](#), Bentonite fining during fermentation reduces the dosage required and exhibits significant side-effects on phenols, free and bound aromas, and sensory quality of white wine. *Food Chem.* 2019;285:305–315. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.01.172
- [Huang Z. and Ough C. S.](#), Effect of Vineyard Locations, Varieties, and Rootstocks on the Juice Amino Acid Composition of Several Cultivars/ *American Society for Enology and Viticulture/ 1989/ DOI: 10.5344/ajev.1989.40.2.135*
- [Jaeckels N., Tenzer S., Meier M., Will F., Dietrich H., Decker H., Fronk P.](#), Influence of bentonite fining on protein composition in wine. *LWT Food Sci. Technol.* 2017;75:335–343. doi: 10.1016/j.lwt.2016.08.062
- [Jegou Sandrine, Conreux Alexandra, Villaume Sandra, Hovasse Agnes, Schaeffer, Cilindre Clara, Van Dorsselaer Alain, Jeandet Philippe](#). One step purification of the grape vacuolar invertase/ *Analytica Chimica Acta*, Volume 638, Issue 1, 6 April 2009, Pages 75-78
- [Johannes de Bruijn, Ana Valdebenito, Cristina Loyola, Ignacio Serra, Fernando Salazar, and Francisco López](#). Continuous Stabilization of Chardonnay with Ion-Exchange Resin: Influence on Protein and Phenolic Profile of Wine/ *Chilean journal of agricultural research – On-line version ISSN 0718-5839*, 2009, 69(1): Pages 54-59, January-March 2009
- [Jones-Moore Hayden R., Jelley Rebecca E., Marangon Matteo, Fedrizzi Bruno](#). The interactions of wine polysaccharides with aroma compounds, tannins, and proteins, and their importance to winemaking/ *Food Hydrocolloids*, Volume 123, February 2022, 107150

- [Karimi Fatemeh Yasamin Hamidian, Fatemeh Behrouzifar, Reza Mostafazadeh, Azade Ghorbani-HasanSaraei, Marzieh Alizadeh, Seyed-Morteza Mortazavi, Mobina Janbazi, Padideh Naderi Asrami](#), An applicable method for extraction of whole seeds protein and its determination through Bradford's method/ Food and Chemical Toxicology, June 2022, Volume 164
- [Liu Jun-Jun, Sturrock Rona and Ekramoddoullah Abul K.M.](#), The superfamily of thaumatin-like proteins: its origin, evolution, and expression towards biological function/ Plant Cell Reports, March 2010, Volume 29, pages 419-436,
- [Liu Pin-He, Céline Vrigneau, Thomas Salmon, Duc An Hoang, Jean-Claude Boulet, Sandrine Jégou and Richard Marchal, 2018](#)/ Influence of Grape Berry Maturity on Juice and Base Wine Composition and Foaming Properties of Sparkling Wines from the Champagne Region
- [Liu Q., Xiangyu Sui, Ying Wang, Ming Zhu, Yijun Zhou, Fei Gao, 2023](#)/ Genome-Wide Analyses of Thaumatin-like Protein Family Genes Reveal the Involvement in the Response to Low-Temperature Stress in Ammopiptanthus nanus/ Int. J. Mol. Sci. 2023, 24(3), 2209
- [Liu Zhaolong, Xu Le, Wang Ju, Duan Changqing, Sun Yanfeng, Kong Qingsen and He Fei](#), Research progress of protein haze in white wines/ Food Science and Human Wellness, Volume 12, Issue 5, September 2023, Pages 1427-1438
- [Loulakakis K.A., 1997](#)/ Genomic organization and expression of an osmotin-like gene in Vitis vinifera L./ September 1997. Vitis -Geilweilerhof- 36(3):157-158
- [Lucchetta Marco, Pocock Kenneth F., Waters Elizabeth J. and Marangon Matteo](#), Use of Zirconium Dioxide during Fermentation as an Alternative to Protein Fining with Bentonite for White Wines/ American Journal of Enology and Viticulture, 2013, Volume 64, Issue 3
- [Lukić and Horvat](#), Moment of Bentonite Addition, Co-Addition of Tannins, and Bentonite Type Affect the Differential Affinity of Pathogenesis-Related Grape Proteins towards Bentonite during Fermentation/ Published in Foods 25 October 2020, Volume 9, Issue 11
- [Majewski P. \(School of Advanced Manufacturing and Mechanical Engineering, Mawson Institute, University of South Australia\) ; Barbalet A. \(School of Advanced Manufacturing and Mechanical Engineering, Mawson Institute, University of South Australia\) ; Waters E. J. \(The Australian Wine Research Institute\) 2011](#) \$1 billion hidden cost of bentonite fining, Australian and New Zealand grapegrower and winemaker/ vol. 569, pp. 58-62

- [Marangon M., Lucchetta M. and Waters E.J.](#), Protein stabilisation of white wines using zirconium dioxide enclosed in a metallic cage/ Australian Journal of Grape and Wine Research, 2010, Volume 17, Issue 1/ p. 28-35
- [Marangon Matteo, Steven C Van Sluyter, Ella M C Robinson, Richard A Muhlack, Helen E Holt, Paul A Haynes, Peter W Godden, Paul A Smith, Elizabeth J Waters.](#) Degradation of white wine haze proteins by Aspergillopepsin I and II during juice flash pasteurization/ Food Chemistry, 2012, Volume 135, Issue 3, 1 December 2012, Pages 1157-1165
- [Marangon Matteo, Vanessa J. Stockdale, Peter Munro, Timra Trethewey, Alex Schulkin, Helen E. Holt, and Paul A. Smith.](#) Addition of Carrageenan at Different Stages of Winemaking for White Wine Protein Stabilization/ Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, Volume 61, Issue 26, Pages 6516-6524, Copyright © 2013 American Chemical Society
- [Martinez-Lapuente Leticia, Ayestarán Belén, Guadalupe Zenaida.](#) Effect of egg albumin fining, progressive clarification and cross-flow microfiltration on the polysaccharide and proanthocyanidin composition of red varietal wines/ Food Research International, June 2017, Volume 96, Pages 235-243
- [Martinez-Lapuente Leticia, Ayestaran Belen and Guadalupe Zenaida,](#) Influence of Wine Chemical Compounds on the Foaming Properties of Sparkling Wines/ Grapes and Wines- Advances in Production, Processing, Analysis and Valorization, December 2017
- [Maury Chantal, Sarni-Manchado Pascale, Cheynier Veronique.](#) Highlighting protein fining residues in a model red wine/ Food Chemistry, 2019, p. 272-278
- [McRae J. M., Barricklow V., Pocock K.F., Smith P.A.](#), Predicting protein haze formation in white wines/ Australian Journal of Grape and Wine Research/ Volume 24, Issue 4/ p. 504-511, 27 June 2018
- [Mercurio M., Mercurio V., De Gennaro B., De Gennaro M., Grifa C., Langella A. and Morra V.](#), Natural zeolites and white wines from Campania region (Southern Italy): A new contribution for solving some oenological problems. Period. Mineral. 2010;79:95–112. doi: 10.2451/2010PM0005.
- [Mesquita Patricia R., Piçarra-Pereira, Monteiro Sara, Loureiro Virgilio, Teixeira Arthur R., Ferreira Ricardo,](#) Effect of Wine Composition on Protein Stability/ Am J Enol Vitic. 2001 52:324-330
- [Mierczynska-Vasilev Agnieszka, Mierczynski Pawel, Maniukiewicz Waldemar, Visalakshan Rahul M., Vasilev Krasimir, Smith Paul A.](#), Magnetic separation technology:

Functional group efficiency in the removal of haze-forming proteins from wines/ Food Chemistry, Volume 275, 1 March 2019, Pages 154-160

- [Mierczynska-Vasilev A., Qi G., Smith P., Bindon K., Vasilev K.](#), Regeneration of Magnetic Nanoparticles Used in the Removal of Pathogenesis-Related Proteins from White Wines, Foods, 2020;9:1. doi: 10.3390/foods9010001.
- [Mihaljev Željko A. Sandra M. Jakšićl , Nadežda B. Prica , Željko N. Čupić, Milica M. Živkov-Baloš.](#) Comparison of the Kjeldahl method, Dumas method and NIR method for total nitrogen determination in meat and meat products/ Journal of Agroalimentary Processes and Technologies 2015, 21(4), Pages 365-370
- [Mostert Talitha T. and Divol Benoit](#), Investigating the proteins released by yeasts in synthetic wine fermentations/ International Journal of Food Microbiology, Volume 171, 3 February 2014, Pages 108-118
- Mulkey P., Jerumanis J./ Effect of molecular weight and the hydroxy groups in proanthocyanidins on the colloidal stability of beer/ - CereVisia (1976–1990), 1983
- [Murray J.E., Laurieri N., Delgoda R., Proteins](#), Chapter 24/ Pharmacognosy – Fundamentals, Applications and Strategies/ Pages 477-494
- [O'Brien Edward P. Brooks Bernard R., Thirumalai D.](#), Effects of pH on Proteins: Predictions for Ensemble and Single-Molecule Pulling Experiments/ Journal of the American Chemistry Society, 2011, Volume 134, Issue 2, pages 979-987
- [Okuda Tohru, Fukui Masakazu, Takayanagi Tsutomu Yokotsuka Koki](#), Characterization of Major Stable Proteins in Chardonnay Wine/ Food Science and Technology Research, 2006, Volume 12 Issue 2, Pages 131-136
- [Pashova Vesselina, Guell, Carme, Pueyo Encarnacion, Lopez-Barajas Magdalena, Polo Carmen M. and Lopez Francisco](#), White Wine Protein Stabilization by a Continuous Process Using a Packed Column/ American Journal of Enology and Viticulture, 2004, Volume 55, Issue 2
- [Pocock K. F. Adams K.S., Kwiatkowski M.J., Waters E. J.](#), Combined heat and proteolytic enzyme treatment of white wines reduces haze forming protein content without detrimental effect/ Australian Journal of Grape and Wine Research, 2008, Volume 9, Issue 1/ p. 56-63
- Poux C., and Ournac A."/ FREE AND POLYPEPTIDIC AMINO-ACIDS IN WINE." *ANNALES DE TECHNOLOGIE AGRICOLE*. Vol. 19. No. 3. 147 RUE DE L UNIVERSITE, 75338 PARIS CEDEX 07, FRANCE: INST NATL RECHERCHE AGRONOMIQUE, 1970.

- [Puig-Deu, Lopez-Tamames, Buxaderas and Torre-Boronat M.C.](#), Quality of base and sparkling wines as influenced by the type of fining agent added pre-fermentation/ Food Chemistry, Volume 66, Issue 1, July 1999, Pages 35-42
- [Ratnayake, Stockdale V., Grafton S., Munro P., Robinson A.L., Pearson W, McRae J.M., Bacic A.](#), Carrageenans as heat stabilisers of white wine/ Australian Journal of Grape and Wine Research, 2019, Volume 25, Issue 4/ p. 439-450
- [Ribeiro Luís Filipe, Cosme Fernanda and Nunes Fernando M.](#), White Wine Protein Instability: Origin, Preventive and Removal Strategies/ Grapes and Wine, June 2022
- [Ribereau-Gayon P., Glories Y., Maujean A. and Dubourdieu D.](#), The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments 2nd Edition/ Handbook of Enology, 2006, Volume 2
- [Romanini Elia, McRae J. M., Bilogrevic Eleanor, Colangelo Donato, Gabrielli Mario and Lambri Milena.](#) Use of grape seeds to reduce haze formation in white wines/ Food Chemistry, March 2021, Volume 341, Part 1
- [Romanini E., McRae J.M., Colangelo D. and Lambri M.](#), First trials to assess the feasibility of grape seed powder (GSP) as a novel and sustainable bentonite alternative. Food Chem. 2020;305:125484. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.125484
- [Salazar F.N., Achaerandio I., Labb M.A., Gell A.C. and Lpez F.](#), Comparative Study of Protein Stabilization in White Wine Using Zirconia and Bentonite: Physicochemical and Wine Sensory Analysis. J. Agric. Food Chem. 2006;54:9955–9958. doi: 10.1021/jf062632w.
- [Sarmiento M.R., Oliveira J.C., Slatner M., Boulton R.B., Influence of intrinsic factors on conventional wine protein stability tests/](#) Food Control, Volume 11, Issue 6, December 2000, Pages 423-432
- [Sels Jan, Mathys Janick, M.A. De Coninck Barbara, Cammue Bruno P.A. and F.C. de Bolle Miguel.](#) Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides/ Plant Physiology and Biochemistry, Volume 46, November 2008, Pages 941-950
- [Sharma Alok, Sharma Himanshu, Pajput Ruchika, Pandey Ashutosh, Upadhyay Santosh Kumar.](#) Molecular Characterization Revealed the Role of Thaumatin-Like Proteins of Bread Wheat in Stress Response/ Front. Plant Sci., 11 January 2022, Volume 12 – 2021
- [Silva-Barbieri D, Salazar Fernando N., Lopez Francisco Brossard Natalia, Escalona Nestor, Perez-Correa Jose R.](#), Advances in White Wine Protein Stabilization Technologies, Molecules, 27 (4):1251, February 2022

- [Soufleros E. H., Bouloumpasi E., Tsarchopoulos C., Biliaderis C.G.](#), Primary amino acid profiles of Greek white wines and their use in classification according to variety, origin and vintage/ *Food Chemistry*, Volume 80, Issue 2, February 2003, Pages 261-273
- [Sui Y., McRae J.M., Wollan D., Muhlack R.A., Godden P., Wilkinson K.L.](#), Use of ultrafiltration and proteolytic enzymes as alternative approaches for protein stabilisation of white wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* 2020;27:234–245. doi: 10.1111/ajgw.12475.
- [Talley K. and Alexov E.](#), On the pH-optimum of activity and stability of proteins, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, Volume 78, Issue 12 p. 2699-2706
- [Van Sluyter Steven C., McRae Jacqui M., Falconer Robert J., Smith Paul A., Bacic Antony and Waters Elizabeth J.](#), Wine Protein Haze: Mechanisms of Formation and Advances in Prevention/ *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, April 7 2015, Volume 63, Issue 16, Pages 4020-4030
- [Vasilev A., Wahono K., Smith Paul A. and Bindon K.](#), Using Zeolites to Protein Stabilize White Wines/ *ACS Sustainable Chemistry Engineering*, 2019, Volume 7, Issue 14, Pages 12240-12247
- [Vincenzi Simone, Bierma Jan, Wickramasekara Samantha I., Curioni Andrea, Gazzola Diana and Bakalinsky Alan T.](#), Characterization of a Grape Class IV Chitinase/ *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62, Pages 5660-5668
- [Vidigal Susana S.M.P., Toth Ildiko V., Rangel Antonio O.S.S.](#), Determination of total protein content in white wines by solid phase spectrometry in a SI–LOV system/ *Talanta*, 15 July 2012, Volume 96, Pages 102-106
- [Waters E.J., Alexander G., Muhlack R., Pocock K.F., Colby C., O’Neil B.K., and Jones P.](#), Preventing protein haze in bottled white wine/ *Australian Journal of Grape and Wine Research*/ Volume 11, Issue 2 Jul 2005/ Pages 83-240
- [Wigand Petra, Tenzer Stefan, Schild Hansjoerg and Decker Heinz.](#) Analysis of Protein Composition of Red Wine in Comparison with Rosé and White Wines by Electrophoresis and High-Pressure Liquid Chromatography–Mass Spectrometry (HPLC-MS)/ *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, Volume 57, Issue 10, Pages 4328-4333/ Copyright © 2009 American Chemical Society
- [Yokotsuka Koki and Singleton Vernon L.](#), Interactive Precipitation Between Phenolic Fractions and Peptides in Wine-Like Model Solutions: Turbidity, Particle Size, and Residual Content as Influenced by pH, Temperature and Peptide Concentration/ *American Journal of Enology and Viticulture*, 1995 46:329-338 ; DOI: 10.5344/ajev.1995.46.3.329

- Καραμπούλη Ε.Φ., Παραλαβή πρωτεϊνικών υπερσυμπυκνωμάτων από υπολείμματα ζυθοποιίας, Διπλωματική Εργασία/ Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Τμήμα Χημικών Μηχανικών, Τομέας σύνθεσης και ανάπτυξης βιομηχανικών διαδικασιών/ Εργαστήριο Τεχνολογίας Τροφίμων , 1996

Διαδικτυακές πηγές

- The Editors of Encyclopaedia Britannica, Zeolite., Encyclopedia Britannica, 21 Dec. 2023, <https://www.britannica.com/science/zeolite>
- Wine Protein Stabilization is an Essential Process to Limit Haze Formation and to Maintain Product Integrity https://www.pall.com/en/food-beverage/wine/wine-haze.html?_gl=1*_1yxuoem*_ga*NzEyODE3MzgxLjE3MDQ2MzU0NzA.*_gid*ODY3NDc4OTgwLjE3MDQ2MzU0NzA.*_fplc*WFNLWjFBSFhBeURwdEtnZEg5aWVHMVJwMTF3bTZ3QkJDa0V6NDhZYVN0WCUyRjF6RHpubVVkTjh5TUpmJTJGWms3U0xGeUIzYnBDRUtNbDVxUFZ3dnpOUURtWjl3THY4VWVqcmdzUXIIMkJxbUUIMkIxNnpMMWxQUXhNWXJwdHZmaEl1ZUElM0QlM0Q
- Πρωτεΐνες των οίνων, <https://www.infowine.gr/el/winepedia/enology/Aging/?nid=536>

Επιστημονικά Βιβλία

- [Jackson R. PhD](#), 8 - Postfermentation Treatments and Related Topics/ Wine Science (Third Edition) Principles and Applications/ Food Science and Technology 2008, Pages 418-519
- Mulkay P., Jerumanis J., Cerevisia, 8 (1983)
- Τσακίρης Αργύρης, Οινολογία από το σταφύλι στο Κρασί, 2017, 4η έκδοση