



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΟΙΝΟΥ, ΑΜΠΕΛΟΥ ΚΑΙ ΠΟΤΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Τίτλος Εργασίας

**Χρήση του καολίνη ως υποκατάστατο του μεντονίτη στην απόκτηση
πρωτεϊνικής σταθερότητας σε λευκούς οίνους**

Όνοματεπώνυμο

Παγγίδης Αναστάσιος

ΑΜ: 16205

Επιβλέπων/-ουσα

Όνοματεπώνυμο: Δέσποινα Κεχαγιά

ΑΘΗΝΑ, Οκτώβριος 2023



**UNIVERSITY OF WEST ATTICA
SCHOOL OF FOOD SCIENCE**

DEPARTMENT OF WINE, VINE AND BEVERAGE SCIENCES

BACHELOR THESIS

Title

Use of kaolin as a substitute for bentonite in obtaining protein stability in white wines

Student name and surname

Pangidis Anastasios

Registration Number: 16205

Supervisor name and surname: Despoina Kexagia

ATHENS, October 2023



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:**

**«Χρήση του καολίνη ως υποκατάστατο του μπεντονίτη στην απόκτηση
πρωτεϊνικής σταθερότητας σε λευκούς οίνους
και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.»**

| | |
|---|--|
| Ψηφιακή Υπογραφή Επιβλέποντα Καθηγητή Κεχαγιά Δέσποινα | |
| Ψηφιακή Υπογραφή Καθηγητή Σεχάντε Αντνάν | |
| Ψηφιακή Υπογραφή Καθηγητή Ευαγγέλου Αλεξάνδρα | |

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

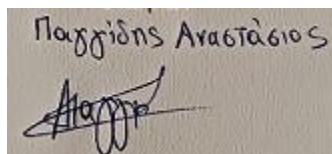
Ο κάτωθι υπογράφων Παγγίδης Αναστάσιος του Κωνσταντίνου, με αριθμό μητρώου 16205 φοιτητής του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμων Οίνου και Αμπέλου, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«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».

Επιθυμώ την απαγόρευση πρόσβασης στο πλήρες κείμενο της εργασίας μου μέχρι και έπειτα από αίτηση μου στη Βιβλιοθήκη και έγκριση του επιβλέποντα καθηγητή*

Ο Δηλών



Παγγίδης Αναστάσιος

***Ονοματεπώνυμο Επιβλέποντα Καθηγητή**

Ψηφιακή Υπογραφή

** Σε εξαιρετικές περιπτώσεις και μετά από αιτιολόγηση και έγκριση του επιβλέποντα, προβλέπεται χρονικός περιορισμός πρόσβασης (embargo) 6-12 μήνες. Στην περίπτωση αυτή θα πρέπει να υπογράψει ψηφιακά ο/η επιβλέπων/ουσα καθηγητής/τρια, για να γνωστοποιεί ότι είναι ενημερωμένος/η και συναινεί. Οι λόγοι χρονικού αποκλεισμού πρόσβασης περιγράφονται αναλυτικά στις πολιτικές του Ι.Α. (σελ. 6)*

Περίληψη

Η πρωτεϊνική σταθερότητα αναφέρεται στην ικανότητα των πρωτεϊνών στον οίνο να παραμένουν σταθερές και να μην προκαλούν αλλεργικές αντιδράσεις ή άλλες ανεπιθύμητες επιπτώσεις στον καταναλωτή. Στους λευκούς οίνους, η πρωτεϊνική σταθερότητα μπορεί να επηρεαστεί από διάφορους παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, η χρήση βακτηριοκτόνων, η επαφή με οξυγόνο και άλλους παράγοντες που επηρεάζουν την σύνθεση του οίνου. Για να διατηρηθεί η πρωτεϊνική σταθερότητα στους λευκούς οίνους, συνιστάται η χρήση κατάλληλων τεχνικών και μεθόδων κατά την παραγωγή και την αποθήκευση του οίνου. Συγκεκριμένα, η πρωτεϊνική σταθερότητα μπορεί να διαταραχθεί από την παρουσία των φαινολικών ενώσεων, των ταννινών και των μετάλλων στον οίνο. Η χρήση κατάλληλων βακτηριοκτόνων και η προσεκτική διαχείριση του οξυγόνου μπορούν επίσης να βοηθήσουν στη διατήρηση της πρωτεϊνικής σταθερότητας στους λευκούς οίνους. Επιπλέον, η κατάλληλη θερμοκρασία αποθήκευσης και η αποφυγή απότομων αλλαγών στη θερμοκρασία μπορούν να συμβάλλουν στη διατήρηση της πρωτεϊνικής σταθερότητας στους λευκούς οίνους. Η παρούσα πτυχιακή εργασία αφορά ένα πείραμα που διεξήχθη με σκοπό να διαπιστωθεί εάν ο καολίνης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υποκατάστατο του μπεντονίτη ή και σε συνεργασία με τον αυτόν και σε ποιο βαθμό επιτυχίας ώστε να επιτευχθεί η πρωτεϊνική σταθεροποίηση λευκών και ροζέ οίνων. Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν 2 διαφορετικές μέθοδοι, το test θέρμανσης (bentotest) και το test προσθήκης ταννινών (Proteotest της εταιρίας Vason). Στην εφαρμογή του πειράματος σε Ασύρτικο, η εφαρμογή του καολίνης έδειξε να έχει μια μικρή θετική επίδραση απέναντι στην πρωτεϊνική αστάθεια. Στη Μαλαγουζιά, η εφαρμογή του καολίνης έδειξε να έχει μια μικρή θετική επίδραση απέναντι στην πρωτεϊνική αστάθεια, ενώ στο Ξινόμαυρο η εφαρμογή του καολίνης έδειξε να έχει θετική επίδραση απέναντι στην πρωτεϊνική αστάθεια, όχι όμως στα επίπεδα του μπεντονίτη. Στο TEST Θέρμανσης, η εφαρμογή του καολίνης έδειξε να έχει σημαντική θετική επίδραση απέναντι στην πρωτεϊνική αστάθεια, οριακά συγκρίσιμη με αυτή του μπεντονίτη, με τη σημείωση ότι ο οίνος ήταν πρωτεϊνικά σταθεροποιημένος από τον μάρτυρα.

Λέξεις κλειδιά: πρωτεϊνική σταθερότητα, λευκοί οίνοι, μπεντονίτης, καολίνης

Abstract

Protein stability refers to the ability of the proteins in wine to remain stable and not cause allergic reactions or other unwanted effects in the consumer. In white wines, protein stability can be affected by several factors, including temperature, the use of bactericides, contact with oxygen and other factors that affect the composition of the wine. To maintain protein stability in white wines, it is recommended to use appropriate techniques and methods during wine production and storage. In particular, protein stability can be disturbed by the presence of phenolic compounds, tannins and metals in wine. The use of appropriate bactericides and careful oxygen management can also help maintain protein stability in white wines. In addition, proper storage temperature and avoiding sudden changes in temperature can help maintain protein stability in white wines. This thesis concerns an experiment carried out in order to establish whether kaolin can be used as a substitute for bentonite or in collaboration with it and to what degree of success to achieve the protein stabilization of white and rosé wines. In the experiment, 2 different methods were used, the heating test (bentotest) and the tannin addition test. In the application of the experiment in Assyrtiko, the application of kaolin was shown to have a small positive effect against protein instability. In Malagouzia, the application of kaolin was shown to have a small positive effect on protein instability, while in Xinomavro, the application of kaolin was shown to have a positive effect on protein instability, but not on bentonite levels. In the HEATING TEST, the application of kaolin was shown to have a significant positive effect against protein instability, marginally comparable to that of bentonite, noting that the wine was protein stabilized by the control.

Key words: *protein stability, white wines, bentonite, kaolin*

Περιεχόμενα

| | |
|--|----|
| Α΄ ΜΕΡΟΣ | 8 |
| Εισαγωγή | 9 |
| Βιβλιογραφική Ανασκόπηση..... | 11 |
| Κεφάλαιο 1..... | 11 |
| 1.1 Περιγραφή προβλήματος πρωτεϊνικής αστάθειας..... | 11 |
| 1.1.1 Παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν τη σταθερότητα της πρωτεΐνης του λευκού κρασιού..... | 13 |
| 1.2 Διαθέσιμα εργαλεία (test) για πιστοποίηση πρωτεϊνικής αστάθειας..... | 16 |
| <i>Δοκιμή θερμότητας</i> | 17 |
| <i>Δοκιμή τριχλωροξικού οξέος (TCA)</i> | 19 |
| <i>Δοκιμή κατακρήμνισης τανίνης</i> | 19 |
| <i>Bentotest</i> | 19 |
| <i>Δοκιμή αιθανόλης</i> | 20 |
| <i>Φασματοσκοπικές τεχνικές</i> | 20 |
| 1.3 Τρόποι αντιμετώπισης προβλήματος..... | 21 |
| 1.4 Οινοποιητικές πρακτικές για την πρόληψη ή τη μείωση της αστάθειας των πρωτεϊνών του κρασιού..... | 21 |
| Κεφάλαιο 2..... | 34 |
| 2.1 Τι είναι ο καολίνης και πώς χρησιμοποιείται στην αμπελοργία..... | 34 |
| Κεφάλαιο 3..... | 37 |
| 3.1 Τι είναι ο μπεντονίτης και πώς χρησιμοποιείται στην οινοποιία..... | 37 |
| ΜΕΡΟΣ Β΄..... | 39 |
| ΈΡΕΥΝΑ..... | 39 |
| Κεφάλαιο 4..... | 39 |
| Σκοπός της εργασίας..... | 39 |
| Κεφάλαιο 5..... | 39 |
| Μέθοδος – Πειραματικός σχεδιασμός..... | 39 |
| Υλικά..... | 40 |
| Κεφάλαιο 6..... | 41 |
| Αποτελέσματα..... | 41 |
| Κεφάλαιο 7..... | 46 |
| 7.1 Συζήτηση – Συμπεράσματα..... | 46 |
| Βιβλιογραφικές Αναφορές..... | 50 |

Κατάλογος πινάκων

| | |
|--|----|
| Πίνακας 1. PROTEOTEST Ασύρτικου-Μαλαγουζιάς..... | 42 |
| Πίνακας 2. Test θέρμανσης Ασύρτικου..... | 43 |
| Πίνακας 3. PROTEOTEST Μαλαγουζιά..... | 43 |
| Πίνακας 4. TEST Θέρμανσης Μαλαγουζιά..... | 44 |
| Πίνακας 5. PROTEOTEST Ξινόμαυρου..... | 44 |
| Πίνακας 6. TEST θέρμανσης Ξινόμαυρου..... | 45 |

Α΄ ΜΕΡΟΣ

Εισαγωγή

Παρά το γεγονός ότι ο οίνος περιλαμβάνει μόνο μια μικρή ποσότητα πρωτεϊνών και γλυκοπρωτεϊνών —συνήθως μεταξύ 15 και 230 mg/L— οι πρωτεΐνες διαδραματίζουν κρίσιμη λειτουργία από τεχνική άποψη (Ferreira et al., 2002). Επιπλέον, οι πρωτεΐνες έχουν σημαντικό αντίκτυπο στην ποιότητα του οίνου επηρεάζοντας τη γεύση και τις ιδιότητες του αφρού (Dambrouck et al., 2005; Salazar et al., 2010). Ο σχηματισμός θολώματος του λευκού οίνου μετά την εμφιάλωση προκαλείται κυρίως από ορισμένες πρωτεΐνες κρασιού οι οποίες μπορεί προοδευτικά να μετουσιωθούν και να συσσωματωθούν κατά την αποθήκευση του οίνου και να δημιουργήσουν ένα θόλωμα που διαχέει το φως (Ferreira et al., 2002). Αν και είναι απίθανο η παραγωγή πρωτεϊνικού θολώματος να έχει οποιαδήποτε επίδραση στις οσφρητικές ή γευστικές ιδιότητες του οίνου, οι καταναλωτές συχνά απορρίπτουν τα θολά κρασιά, γεγονός που οδηγεί σε σημαντικές οικονομικές απώλειες για τη βιομηχανία οίνου και την εικόνα της μάρκας (Marangon et al., 2013; Muhlack et al., 2016).

Η πλειονότητα των πρωτεϊνών του οίνου προέρχονται από τα σταφύλια, αλλά μπορεί επίσης να παράγονται από τη μαγιά και τα βακτήρια γαλακτικού οξέος που χρησιμοποιούνται στη διαδικασία οινοποίησης. Κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης του οίνου και των επακόλουθων διεργασιών εκχύλισης, η πλειονότητα αυτών των πρωτεϊνών εξαφανίζεται. Ωστόσο, λόγω της αντοχής τους στην πρωτεόλυση και του χαμηλού pH, οι λεγόμενες πρωτεΐνες που σχετίζονται με παθογόνα (PR) (-γλυκανάσες, χιτινάσες και πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη θαυματίνη) ενδέχεται να παραμείνουν στο τελικό προϊόν (Tabilo-Munizaga et al., 2016). Αυτές οι πρωτεΐνες παράγονται από το αμπέλι ως απόκριση στο αβιοτικό στρες και ως άμυνα έναντι βακτηριακών ή μυκητιακών λοιμώξεων (Selitrennikoff, 2001). Λόγω των συμπαγών αρχιτεκτονικών τους, είναι ανθεκτικές στη θερμότητα, τις συνθήκες οξέος του οίνου και την πρωτεόλυση (Van Sluyter et al., 2015). Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι τα επίπεδα ολικής πρωτεΐνης του οίνου δεν μπορούν να προβλέψουν την αστάθεια των πρωτεϊνών του οίνου επειδή ο σχηματισμός θολότητας προκαλείται από συγκεκριμένα κλάσματα πρωτεΐνης που συντίθενται στα σταφύλια (Paetzold, Dulau, Dubourdieu, 1990 ; Waters, Shirley, Williams, 1996). Επιπλέον, παράγοντες στη χημική σύνθεση του οίνου, όπως τα μεταλλικά ιόντα, η ιοντική ισχύς, το pH, η περιεκτικότητα σε

αλκοόλη, οι πολυσακχαρίτες και η συγκέντρωση φαινολών μπορεί να έχουν σημαντικό αντίκτυπο στον τρόπο με τον οποίο αναπτύσσεται η πρωτεϊνική θολότητα (Toledo, Salazar, Aquino, 2017). Επιπλέον, οι Pasquieretal. (2021) σημείωσαν ότι η πιθανότητα αστάθειας της πρωτεΐνης του οίνου αυξάνεται ως αποτέλεσμα περιβαλλοντικών αλλαγών, συμπεριλαμβανομένης της αύξησης της θερμοκρασίας και της μείωσης της βροχόπτωσης κατά την περίοδο ωρίμανσης του σταφυλιού. Προκειμένου να αποφευχθεί αυτή η αστάθεια, πριν από την εμφιάλωση του οίνου, οι ασταθείς πρωτεΐνες συχνά απομακρύνονται με τη χρήση διόγκωσης μπεντονίτη. Αυτός ο εκχυλιστικός παράγοντας, ωστόσο, είναι γενικής φύσης και αφαιρεί άλλα συστατικά του οίνου εκτός από τις ασταθείς πρωτεΐνες, που μπορεί να επηρεάσουν τα αισθητήρια χαρακτηριστικά του οίνου (Cosmeetal., 2020). Για το λόγο αυτό, έχουν διερευνηθεί στο παρελθόν μια σειρά από εναλλακτικές λύσεις για τη διόγκωση του μπεντονίτη (Arenasetal., 2021).

Στην παρούσα εργασία διεξήχθη ένα πείραμα με σκοπό να διαπιστωθεί εάν ο καολίνης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υποκατάστατο του μπεντονίτη ή και σε συνεργασία με τον αυτόν και σε ποιο βαθμό επιτυχίας ώστε να επιτευχθεί η πρωτεϊνική σταθεροποίηση λευκών και ροζέ οίνων. Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν 2 διαφορετικές μέθοδοι, το test θέρμανσης (bentotest) και το test προσθήκης ταννινών (Proteotest της εταιρίας Vason).

Το πρώτο μέρος της εργασίας αποτελεί μια βιβλιογραφική ανασκόπηση στην οποία περιγράφεται το πρόβλημα της πρωτεϊνικής αστάθειας. Στο πρώτο κεφάλαιο, καταγράφονται οι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν τη σταθερότητα της πρωτεΐνης του λευκού οίνου, τα διαθέσιμα εργαλεία (test) για πιστοποίηση πρωτεϊνικής αστάθειας και οι τρόποι αντιμετώπισης του προβλήματος. Ακολούθως, καταγράφονται οι οινοποιητικές πρακτικές για την πρόληψη ή τη μείωση της αστάθειας των πρωτεϊνών του οίνου. Στο δεύτερο κεφάλαιο, περιγράφονται οι ιδιότητες του καολίνη και η χρήση του στην αμπελουργία. Στο τρίτο κεφάλαιο, περιγράφονται οι ιδιότητες του μπεντονίτη και η χρήση του στην οινοποιία.

Στο δεύτερο μέρος της εργασίας, το ερευνητικό, περιγράφεται ο σκοπός του πειράματος, η μέθοδος κι ο πειραματικός σχεδιασμός, τα και τα υλικά. Τέλος, καταγράφονται τα αποτελέσματα και ακολουθούν η συζήτηση και τα συμπεράσματα του πειράματος.

Βιβλιογραφική Ανασκόπηση

Κεφάλαιο 1

1.1 Περιγραφή προβλήματος πρωτεϊνικής αστάθειας

Έχουν διεξαχθεί πολλές έρευνες σχετικά με την αστάθεια της πρωτεΐνης σταφυλιού. Χρησιμοποιώντας ηλεκτροφόρηση, οι Koch και Sajak(1959) επιβεβαίωσαν ότι οι εναποθέσεις που δημιουργούνται από τη θερμότητα περιελάμβαναν δύο διαφορετικά είδη πρωτεϊνικών κλασμάτων με διαφορετική ευαισθησία στη θερμότητα. Με την κλασματοποίηση και την ανάλυση των πρωτεϊνών του οίνου, οι Moretti και Berg(1965) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η αστάθεια των πρωτεϊνών του οίνου προκλήθηκε από κλάσματα πρωτεΐνης με χαμηλά ισοηλεκτρικά σημεία και χαμηλά μοριακά βάρη, τα οποία ήταν πιο ευαίσθητα στη θερμική επεξεργασία.

Η αστάθεια της πρωτεΐνης του λευκού οίνου προκαλείται κυρίως από πρωτεΐνες με χαμηλό μοριακό βάρος (12,6-30 kDa) και ισοηλεκτρικά σημεία (4,1-5,8) που περιλαμβάνουν γλυκοπρωτεΐνες. Χρησιμοποιώντας ένα συνδυασμό αλατίσματος με θειικό αμμώνιο και υπερδιήθηση, οι Watersetal. (1991) διαχώρισαν και κλασματοποίησαν πρωτεΐνες οίνου, αποδεικνύοντας ότι τα πρωτεϊνικά κλάσματα με αυτά τα χαρακτηριστικά (24 και 32 kDa) ήταν πιο ευαίσθητα στις υψηλές θερμοκρασίες και συνέβαλαν περισσότερο στην αστάθεια της πρωτεΐνης του λευκού οίνου. Η θολότητα του λευκού οίνου φαίνεται να προκαλείται κυρίως από κλάσματα πρωτεΐνης χαμηλότερου μοριακού βάρους, καθώς τα κλάσματα πρωτεΐνης με 24 kDa δημιούργησαν περίπου 50% περισσότερη θολότητα από τα κλάσματα πρωτεΐνης με 32 kDa στην ίδια συγκέντρωση.

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι οι πρωτεΐνες που σχετίζονται με την παθογένεια (PR) ευθύνονται κυρίως για την αστάθεια των πρωτεϊνών του οίνου (Falconeretal., 2010). Οι πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην παθογένεση είναι ζωτικής σημασίας για την άμυνα των φυτών και συνδέονται με την αντοχή στις ασθένειες, την ανάπτυξη και την προσαρμογή στο περιβάλλον (Edreva, 2005).

Το πιο κοινό σταφύλι για την παραγωγή οίνου είναι το *Vitisvinifera*, αν και είναι πολύ εύλωτο σε ασθένειες, ιδιαίτερα σε μύκητες και ωομύκητες όπως ο *Botrytis cinerea* και το *Plasmopara viticola*, αντίστοιχα (Ferreiraetal., 2004). Όταν ένα παθογόνο μολύνει το φυτό, παράγει πρωτεΐνες που σχετίζονται με την παθογένεση (PR) για να περιορίσει τη ζημιά που προκαλείται στην αμπέλια (Ođjakova, Hadjiivanova, 2001). Οι δύο κύριες πρωτεΐνες που σχετίζονται με την παθογένεση (PR) που απομονώνονται

από τον οίνο σε τύπους σταφυλιού *V. vinifera* είναι οι χιτινάσες (τύπος PR-3, κλάσμα πρωτεΐνης 28 kDa) και η θαυματίνη (τύπος PR-5, κλάσμα πρωτεΐνης 24 kDa). Και οι δύο πρωτεΐνες έχουν σφαιρικές δομές και είναι θετικά φορτισμένες στο pH του οίνου (Watersetal., 1998). Οι οσμοτίνες, οι 1,3-γλυκανάσες, οι ινβερτάσες και οι πρωτεΐνες μεταφοράς λιπιδίων είναι άλλα παραδείγματα πρωτεϊνών PR που υπάρχουν στον οίνο σε μικρότερες ποσότητες (Monteiroetal., 2010).

Ωστόσο, πολυάριθμες ισομορφές πρωτεϊνών και χιτινασών που μοιάζουν με θαυματίνη έχουν εντοπιστεί σε γλεύκος σταφυλιών διαφόρων ποικιλιών σταφυλιών *V. vinifera*, με μοριακά βάρη μεταξύ 20 και 30 kDa και ισοηλεκτρικό σημείο μεταξύ 3,0 και 5,0 (Cilindreetal., 2008). Είναι οι κύριες διαλυτές πρωτεΐνες που βρίσκονται στο *V. Vinifera*(Pococketal., 2001) και προκαλούν το σχηματισμό θολώματος στα μπουκάλια λευκού οίνου κατά την αποθήκευση και την αποστολή (Muhlacketal., 2007). Μεγαλύτερες ποσότητες αυτών των πρωτεϊνών παράγονται κατά την ωρίμανση, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα ώριμα σταφύλια είναι πιο ευαίσθητα στην αστάθεια των πρωτεϊνών (Sarmiento, 2001). Αυτές οι πρωτεΐνες συντίθενται σε όλη την ανάπτυξη του σταφυλιού ανάλογα με την ποικιλία του, την περιοχή και το έτος (Ferreiraetal., 2004). Οι χιτινάσες και οι πρωτεΐνες που μοιάζουν με θαυματίνη περιλαμβάνουν μεγάλο αριθμό δισουλφιδικών δεσμών, οι οποίοι συμβάλλουν στη χημική τους σταθερότητα, κάποια αντίσταση στην πρωτεόλυση και κάποια αντίσταση κατά τη διαδικασία οινοποίησης (μερική αντίσταση στο χαμηλό pH (3,0-3,8) του χυμού σταφυλιού). Οι χιτινάσες, μια κατηγορία πρωτεϊνών χαμηλού μοριακού βάρους, είναι ευάλωτες στις διακυμάνσεις της θερμοκρασίας και στο pH του οίνου (Falconeretal., 2010). Οι πρωτεΐνες που μοιάζουν με θαυματίνη είναι πιο θερμοσταθερές και ανθεκτικές στις αλλαγές στο pH του οίνου, χωρίς να παρουσιάζουν αξιόλογες δομικές αλλαγές ή συσσωμάτωση. Οι χιτινάσες και οι πρωτεΐνες που μοιάζουν με θαυματίνη φαίνεται να έχουν ξεχωριστές ευαισθησίες, με τις χιτινάσες να έχουν μια ελλειπτική δευτερογενή δομή και τις πρωτεΐνες που μοιάζουν με θαυματίνη να έχουν μια σφαιρική δευτερογενή δομή (Dufrechouetal., 2013; Tattersalletal., 2001). Με χιτινάσες/πρωτεΐνες που μοιάζουν με θαυματίνη, οι πρωτεΐνες που σχετίζονται με την παθογένεση βρίσκονται σε ποικίλες ποσότητες στο χυμό σταφυλιών των διαφόρων τύπων σταφυλιών της Sultana, του Sauvignon Blanc, του Pinot Noir, του Muscat της Αλεξάνδρειας και του Shiraz(Pococketal., 2000). Επίσης, οι παραπάνω ερευνητές επιβεβαίωσαν ότι η μηχανική συγκομιδή σταφυλιών που σχετίζεται με τη μεταφορά σε

μεγάλες αποστάσεις μπορεί να προάγει τη σύνθεση πρωτεϊνών που σχετίζονται με την παθογένεση από το αμυντικό σύστημα του σταφυλιού πριν από το πάτημά του (Pococketal., 1998). Στην πραγματικότητα, φαίνεται ότι η πρωτεϊνική σύνθεση μπορεί να επηρεάσει το σχηματισμό θολότητας στους οίνους λόγω των χιτινασών, των πρωτεϊνών που μοιάζουν με θαυματίνη και των παραλλαγών τους στη θερμική σταθερότητα (Marangon, Lucchetta, Waters, 2011).

Σε σύγκριση με την χιτινάση (κλάσμα 32 kDa), η πρωτεΐνη που μοιάζει με θαλλατίνη (κλάσμα 24 kDa) είναι η κύρια αιτία σχηματισμού θολότητας (Esteruelasetal., 2009). Τα επίπεδα χιτινασών του οίνου και το θόλωμα του οίνου αποδείχθηκε ότι έχουν ισχυρή συσχέτιση, υποδεικνύοντας ότι οι χιτινάσες είναι πολύ ευαίσθητες στη βροχόπτωση (Marangon, Lucchetta, Waters, 2011). Οι χιτινάσες έχουν χρόνο ημιζωής μετουσίωσης 6 λεπτά στους 55°C, με παρέκταση σε χρόνο ημιζωής μετουσίωσης 3 ημερών στους 35°C ή 2 ετών στους 25°C, ενώ οι πρωτεΐνες που μοιάζουν με θαυματίνη έχουν θερμοκρασία τήξης 62°C και υπολογισμένο χρόνο ημιζωής μετουσίωσης 300 ετών στους 25°C. Το Vacuolarinvertase (GIN1) από σταφύλια και - (1-3)-γλυκανάσες (32 k κλάσμα Da) έχει αποδειχθεί ότι έχει πρόσθετες επιδράσεις στην ανάπτυξη θολότητας. Στην πραγματικότητα, το φυσικό θόλωμα πρωτεΐνης των λευκών οίνων έχει συνδεθεί με την παρουσία πρωτεϊνικών ζωνών πρωτεΐνης που μοιάζουν με *V. vinifera*, -(1,3)-γλυκανάσας και προδρόμου Grip22 που σχετίζεται με την ωρίμανση (27,4 kDa) (D'Amatoetal., 2011). Στην πραγματικότητα, δεν υπάρχει σχέση μεταξύ της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης και της σταθερότητας της πρωτεΐνης του οίνου (Esteruelas et al., 2009).

1.1.1 Παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν τη σταθερότητα της πρωτεΐνης του λευκού οίνου

Ορισμένες πρωτεΐνες λευκού οίνου μπορεί να συσσωματωθούν, να κροκιδωθούν και μερικές φορές να σχηματίσουν εναποθέσεις (Waters etal., 2005). Ο σχηματισμός θολότητας πρωτεΐνης οίνου μπορεί επίσης να επηρεαστεί από άλλα μη πρωτεϊνικά συστατικά του οίνου. Περιέργως, οι οίνοι με το ίδιο ποσοστό πρωτεΐνης μπορεί να παρουσιάζουν διακριτές τάσεις θολώματος (Lambri etal., 2012) και η περιεκτικότητα σε αιθανόλη του οίνου να μην έχει καμία επίδραση στη σταθερότητα της πρωτεΐνης του οίνου (Sarmiento etal., 2003).

Ο κύριος διερευνημένος μηχανισμός που σχετίζεται με την αστάθεια της πρωτεΐνης του λευκού οίνου είναι η αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-πολυφαινόλης (Catharino etal., 2006).

Μόνο η παρουσία πρωτεϊνών οίνου εμπόδισε την ανάπτυξη της θολότητας του οίνου, αποδεικνύοντας ότι οι προκυανιδίνες είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη της θολότητας του οίνου (Marangon et al., 2010). Έχει αποδειχθεί ότι η αναλογία μεταξύ των συγκεντρώσεων πρωτεΐνης και πολυφαινόλης έχει σημαντικό αντίκτυπο στην ποσότητα της ομίχλης που σχηματίζεται καθώς και στην αλληλεπίδραση μεταξύ της δραστικής στην ομίχλη πολυφαινόλης και της πρωτεΐνης που ενεργεί στην ομίχλη (Siebert, Troukhanova, Lynn, 1996).

Όταν το pH ενός συμπλόκου πρωτεΐνης-πολυφαινόλης αυξήθηκε από 2,5 σε 3,7 (σε ένα πρότυπο διάλυμα οίνου με 10% αιθανόλη), η θολότητα του διαλύματος αυξήθηκε (Yokotsuka, Singleton, 1995). Σύμφωνα με ορισμένους συγγραφείς, η δημιουργία πρωτεϊνικής ομίχλης είναι μια διαδικασία ισοηλεκτρικής καθίζησης (Batista et al., 2009). Σύμφωνα με άλλους ερευνητές, οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών και ταννινών που λαμβάνουν χώρα στις υδρόφοβες περιοχές δέσμευσης ταννινών πρωτεϊνών που μπορεί να εκτεθούν με θέρμανση και αναγωγή είναι η αιτία της θολότητας στους λευκούς οίνους (Marangon, Lucchetta, Waters, 2011). Αρκετές φαινολικές ουσίες, συμπεριλαμβανομένης της (+)-κατεχίνης, του εστέρα του αιθυλικού κουμαρικού οξέος, του trans-p-κουμαρικού, του βανιλικού, του trans-καφεϊκού, του πρωτοκατεχικού, του γαλλικού, του συρίγγου, του φερουλικού και του σικιμικού οξέος, καθώς και η κερκετίνη και η κυανιδίνη, βρέθηκαν σε πρωτεϊνική ομίχλη μετά από όξινη υδρόλυση (Esteruelas et al., 2009). Διασυνδέοντας μετουσιωμένες πρωτεΐνες και προκαλώντας ανάπτυξη συσσωμάτωσης, οι φαινολικές χημικές ουσίες μπορεί να προάγουν το σχηματισμό θολότητας. Στην πραγματικότητα, η αφαίρεση των φαινολικών συστατικών από τους οίνους μείωσε την ανάπτυξη θολότητας (Pocock et al., 2007). Οι παράμετροι X περιλαμβάνουν συνθήκες οίνου όπως pH, ιοντική ισχύς, περιεκτικότητα σε οργανικό οξύ (Batista et al., 2009), πολυσακχαρίτες (Pellerin et al., 1994), ιόντα μετάλλων (Besse, Clark, Scollary, 2000) πολυφαινόλες/φαινολικές ενώσεις (Waters et al., 2005) και θειικά ανιόντα. Αυτοί οι παράγοντες είναι κρίσιμοι για τη θολότητα των πρωτεϊνών. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, το pH του οίνου παίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό πρωτεϊνικού θολώματος, με τα μοντέλα οίνων σε pH 4,0 να προκαλούν περισσότερη συσώρευση πρωτεϊνών και θολότητα μετά τη θέρμανση από τους οίνους μοντέλου σε χαμηλότερο pH (pH 3,0) (Dufrechou et al., 2012). Η πιθανότητα σχηματισμού θολότητας μετά τη θέρμανση αυξάνεται με την προσθήκη κατιόντων νατρίου ή θειικών ανιόντων, τα οποία

βελτιώνουν την ηλεκτρική αγωγιμότητα και την ιοντική ισχύ του οίνου μειώνοντας την ηλεκτροστατική απόθεση των πρωτεϊνών (Marangonet al., 2011).

Έχει αποδειχθεί ότι άλλα ιόντα, όπως το τρυγικό, το χλωρίδιο, το $Fe^{2+}/3+$ και το $Cu^{+}/2+$, δεν έχουν καμία επίδραση στην παραγωγή θολότητας σε οίνους μοντέλου (Pococket al., 2000). Ωστόσο, ο λευκός οίνος με χαμηλά επίπεδα σιδήρου (0,3 και 0,9 mg/L) και τη σταθερότητα των πρωτεϊνών φαίνεται να αυξάνεται, επομένως υπάρχει αρνητική συσχέτιση μεταξύ της θολότητας του οίνου και των επιπέδων σιδήρου (de Bruijnet al., 2014). Η υψηλότερη ηλεκτρική αγωγιμότητα (0,134 και 0,163 S/m) και τα επίπεδα πρωτεΐνης (9 και 25 mg/L) προκαλούν μεγαλύτερη αισθητή θολότητα. Έχει αποδειχθεί ότι οι πολυσακχαρίτες δημιουργούν μια ασπίδα γύρω από τις ξεδιπλωμένες πρωτεΐνες, η οποία μπορεί να μειώσει την αστάθεια των πρωτεϊνών του οίνου. Προκειμένου να αποτραπεί η επαφή τους με πρωτεΐνες, τα οργανικά οξέα μπορεί να αλληλεπιδράσουν με φαινολικά οξέα, ελεύθερα αμινοξέα, τανίνες, πηκτικές ενώσεις και θειικά ιόντα (Batistaetal., 2010). Χρησιμοποιώντας ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις που βασίζονται στις τιμές pKa των οργανικών οξέων, στις τιμές ισοηλεκτρικού σημείου πρωτεΐνης και στο μέσο pH, οι ίδιοι επιστήμονες επιβεβαίωσαν ότι τα οργανικά οξέα μπορεί να επηρεάσουν την αστάθεια της πρωτεΐνης του οίνου. Άλλες δημοσιεύσεις προτείνουν έναν μηχανισμό τριών σταδίων για την ανάπτυξη της πρωτεϊνικής ομίχλης, δίνοντας έμφαση στους ρόλους του ξεδιπλώματος πρωτεΐνης, της αυτοσυσσωμάτωσης πρωτεϊνών και της διασύνδεσης των συσσωματωμάτων. Οι επιδράσεις του διοξειδίου του θείου, το οποίο υπάρχει στον οίνο, στα φαινόμενα μη αναστρέψιμης μετουσίωσης και συσσωμάτωσης πρωτεϊνών που μοιάζουν με θαυματίνη και οι επιδράσεις τους στην αστάθεια της πρωτεΐνης του οίνου ή στην ανάπτυξη θολότητας επιβεβαιώθηκαν από τους Chagaset al.(2016). Οι δισουλφιδικοί δεσμοί των πρωτεϊνών που μοιάζουν με θαυματίνη διασπώνται παρουσία διθειώδους ιόντος (HSO_3^-), δημιουργώντας ελεύθερες ομάδες θειόλης και S-θειοσουλφανικά που βοηθούν στο ξεδίπλωμα των πρωτεϊνών που προκαλείται από τη θερμοκρασία. Σε πρωτεΐνες που μοιάζουν με θαυματίνη, οι υδρόφοβες επιφάνειες και η διαθεσιμότητα ελεύθερων ομάδων θειόλης προκαλούν το σχηματισμό δεσμών δισουλφιδίου μεταξύ των πρωτεϊνών σε έναν κινητικό τρόπο πυρήνωσης-ανάπτυξης.

1.2 Διαθέσιμα εργαλεία (test) για πιστοποίηση πρωτεϊνικής αστάθειας

Διάφορες δοκιμές σταθερότητας πρωτεϊνών έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιούνται επί του παρόντος στην οينوποιία για τη μείωση του κινδύνου θολότητας ή/και σχηματισμού οργανικών εναποθέσεων στον λευκό οίνο που προκαλείται από τη θερμοευαίσθητη πρωτεΐνη οίνου ή από κολλοειδή εναιωρήματα που καθιζάνουν πάνω από τον οίνο πριν από την εμφιάλωση (Esteruelas,etal., 2009). Αυτές οι δοκιμές πραγματοποιούνται επίσης για τον προσδιορισμό της ποσότητας του λεπτού παράγοντα που απαιτείται στις επεξεργασίες εκχύλισης για τη σταθεροποίηση του οίνου σε σχέση με την παραγωγή πρωτεϊνικής θολότητας (Pocock, Waters, 2006). Γενικά, οι μελέτες σταθερότητας πρωτεϊνών περιλαμβάνουν τον υπολογισμό της ποσότητας πρωτεΐνης σε μια δεδομένη ποσότητα οίνου ή τη χρήση χημικών ή θερμότητας για να γίνουν λιγότερο διαλυτές οι πρωτεΐνες του οίνου.

Το τριχλωροξικό οξύ (Berg& Akiyoshi,1961), το φωσφομολυβδικό οξύ, κοινώς γνωστό ως bentotest(Rankine, Pocock, 1971), και η αύξηση της συγκέντρωσης αιθανόλης (Batista, 2009) ή ταννίνης (Mesrob, Gorinova, Tsakov, 1983) έχουν αναφερθεί ως χημικά ιζήματα πρωτεϊνών. Σύμφωνα με τους Esteruelasetal. (2009), αυτά τα πειράματα αποδίδουν διαφορετικά ιζήματα και διαφέρουν από το ίζημα που παράγεται φυσικά σε πρωτεϊνικά ασταθής οίνου, επομένως δεν μιμούνται με ακρίβεια τα φυσικά φαινόμενα. Σε σύγκριση με τα ιζήματα που λαμβάνονται αυθόρμητα, αυτά που παράγονται με εξαναγκασμένη καθίζηση περιλαμβάνουν υψηλότερα επίπεδα πρωτεΐνης, πολυσακχαριτών και πολυφαινολών και περιέχουν πρωτεΐνες που κανονικά δε θα υπήρχαν στο φυσικό ίζημα. Ούτε η δοκιμή αιθανόλης ούτε η δοκιμή θερμότητας που χρησιμοποιεί χαμηλότερες θερμοκρασίες (60⁰C για τέσσερις ημέρες ακολουθούμενες από έξι ώρες στους 4⁰C) καθιζάνουν πρωτεΐνες που μοιάζουν με θαυματίνη, καθιστώντας τις αναποτελεσματικές. Η μεγαλύτερη θερμοκρασία (90⁰C/1 ώρα ακολουθούμενη από 6 ώρες στους 4⁰C), όπως φαίνεται από τους Esteruelasetal. (2009). Η καταλληλότερη δοκιμή σταθερότητας φαίνεται να είναι η δοκιμή θερμότητας, δεδομένου ότι είναι περισσότερο παρόμοια από χημική άποψη με τη φυσική κατακρήμνιση. Επίσης, διαφορετικές δοκιμές παρέχουν διάφορους δείκτες αστάθειας και για να επιτευχθεί σταθερότητα σύμφωνα με τα ευρήματά τους, απαιτούνται διάφορες δόσεις λεπτών παραγόντων. Δεδομένου ότι διαφορετικά κλάσματα πρωτεΐνης συμπεριφέρονται διαφορετικά, οι δοκιμές σταθερότητας

πρωτεΐνης δεν συσχετίζονται καλά με τη συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης του οίνου (Esteruelas et al.,2009).

Ως αποτέλεσμα, οι αναλύσεις ολικής πρωτεΐνης έχουν περιορισμούς όσον αφορά την πρόβλεψη της σταθερότητας των πρωτεϊνών του οίνου και δε λαμβάνουν υπόψη το ρόλο που παίζουν άλλα συστατικά κρασιού στην αστάθεια της πρωτεΐνης (Pocock et al., 2007).

Δοκιμή θερμότητας

Η δοκιμή θερμότητας είναι αναμφισβήτητα ο πιο ακριβής τρόπος για την πρόβλεψη της ανάπτυξης θολότητας ή λάσπης στη φιάλη κατά την αποθήκευση. Είναι επίσης η τεχνική που χρησιμοποιείται συχνότερα στη βιομηχανία για την εκτίμηση της δυνατότητας σχηματισμού θολότητας οίνου και τον προσδιορισμό της σχετικής αστάθειας πρωτεΐνης. Δεν υπάρχει καθορισμένη τεχνική για τη διεξαγωγή της δοκιμής θερμότητας, καθώς διαφορετικές περίοδοι θέρμανσης και θερμοκρασίες χρησιμοποιούνται από διάφορες μελέτες και την οινοποιία (Gonzalez-Ramos, et al., 2009). Αυτή η δοκιμή εξαρτάται από τη θερμική μετουσίωση της πρωτεΐνης για να προκαλέσει καθίζηση, καθώς τα δείγματα οίνου θερμαίνονται σε υψηλή θερμοκρασία για μεγάλο χρονικό διάστημα. Δεδομένου ότι επηρεάζεται λιγότερο από άλλα συστατικά και συνθήκες οίνου, όπως κατιόντα μετάλλων και pH, αυτή η δοκιμή χρησιμοποιείται για τη μίμηση της παραγωγής θολότητας πρωτεΐνης και θεωρείται ιδανική για τον προσδιορισμό των αποδεκτών δόσεων λεπτού παράγοντα που απαιτούνται για την εξάλειψη των ασταθών στη θερμότητα πρωτεΐνες (Sarmiento et al., 2009).

Η πιο κοινή δοκιμή είναι αυτή που αναφέρουν οι Pocock και Rankine (1973) στην οποία ο οίνος θερμαίνεται στους 80°C για 6 ώρες. Οι πρωτεΐνες του οίνου έχουν ποικίλες ευαισθησίες στη θερμότητα για τη δημιουργία ίζημάτων. Σύμφωνα με τους Ribéreau-Gayonet al. (2006) ο οίνος πρέπει να ζυμωθεί στους 80°C για 10 λεπτά. Σε αντίθεση με τις προηγούμενες μελέτες, οι Esteruelas et al. (2009) διαπίστωσαν ότι η θέρμανση του οίνου στους 90°C για 1 ώρα έχει ως αποτέλεσμα ένα ίζημα με δομή που μοιάζει περισσότερο με το φυσικό ίζημα. Η αύξηση της οξειδωσης και της συμπύκνωσης της φαινολικής ένωσης με πρωτεΐνες σε υψηλές θερμοκρασίες (Sarmiento et al., 2009) είναι ένα από τα αναγνωρισμένα μειονεκτήματα αυτών των δοκιμών. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε κατακρήμνιση πρωτεΐνης και να παραβιάσει τα ευρήματα της δοκιμής. Η

θερμική δοκιμή, σύμφωνα με τους Sauvageetal. (2010), μπορεί να καταβυθίσει σχεδόν όλες τις πρωτεΐνες του οίνου, γεγονός που προκαλεί την υπερεκτίμηση των δόσεων των λεπτών παραγόντων που απαιτούνται για τη σταθεροποίηση. Το ισοηλεκτρικό σημείο της πρωτεΐνης και το pH του διαλύματος μπορεί να επηρεάσουν τον τρόπο με τον οποίο οι διαδικασίες συσσωμάτωσης πρωτεϊνών αλλάζουν μεταξύ της μακροχρόνιας αποθήκευσης σε χαμηλότερες θερμοκρασίες και της θέρμανσης. Το χαμηλό pH προάγει τη συσσώρευση πρωτεϊνών σε χαμηλότερη θερμοκρασία (25 °C) (pH 2,5). Η δομή της πρωτεΐνης αλλάζει με την πάροδο του χρόνου, ίσως εκθέτοντας υδρόφοβες ομάδες και προκαλώντας συσσωμάτωση. Σε υψηλότερες θερμοκρασίες (70 °C) και υψηλότερο pH (pH 4,0), οι πρωτεΐνες ξεδιπλώνονται πλήρως και είναι πιο επιρρεπείς στη συσσωμάτωση (Dufrechou, Poncet-Legrand, Sauvage, 2012).

Τα μοντέλα οίνων μπορεί να δουν μια αύξηση στη δημιουργία θολότητας και στη συσσώρευση πρωτεϊνών καθώς ψύχονται, με μεγαλύτερη θολότητα να αναπτύσσεται μετά από παρατεταμένες διάρκειες ψύξης (Dufrechou, Poncet-Legrand, Sauvage, 2012). Ως εκ τούτου, ο χρόνος ψύξης μπορεί να είναι κρίσιμος για τα αποτελέσματα της δοκιμής θερμότητας. Κατά συνέπεια, η ακρίβεια και η αναπαραγωγιμότητα των ευρημάτων είναι πιθανό να διακυβεύονται από τις διακυμάνσεις των περιστάσεων της δοκιμής θερμότητας. Σύμφωνα με τους McRaeetal. (2019), οι εκτεταμένες περιόδους θέρμανσης, οι παρατεταμένοι χρόνοι ψύξης και η χαμηλότερη θερμοκρασία ψύξης ενισχύονται την ποσότητα θολότητας που αναπτύχθηκε στη δοκιμή θερμότητας για λευκούς οίνους που θερμάνθηκαν στους 80 °C για 0,5 έως 6,0 ώρες και στη συνέχεια ψύχθηκαν για 0,5-18 ώρες στους 0 °C ή στους 20 °C. Για παράδειγμα, σε σύγκριση με τη θέρμανση για 2 ώρες, η θέρμανση για 6 ώρες και η ψύξη για 18 ώρες στους 4⁰ C (δοκιμή 24 ωρών) συχνά οδήγησαν σε αυξημένη προβλεπόμενη δόση μπεντονίτη έως και 0,3 g/L. Οι McRaeetal. (2019) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι οίνοι που θερμάνθηκαν για 2 ώρες στους 80 βαθμούς Κελσίου και στη συνέχεια ψύχονταν για 3 ώρες στους 20 βαθμούς Κελσίου (δοκιμή θερμότητας 5 ωρών) παρήγαγαν σταθερή θολότητα και απαιτούσαν μια δόση φινιρίσματος μπεντονίτη για να σταθεροποιηθεί ο οίνος. Οι θερμικές επεξεργασίες που εκθέτουν περισσότερες πρωτεϊνοδραστικές θέσεις για δέσμευση πολυφαινόλης με ενεργή ομίχλη σε αυτά τα πειράματα είναι υπεύθυνες για τη δημιουργία θολώματος πρωτεΐνης οίνου (Siebert, Troukhanova, Lynn, 1996) και η διαδικασία ψύξης μπορεί να μειώσει τη διαλυτότητα των συμπλεγμάτων πρωτεΐνης-

πολυφαινόλης (Yokotsuka, Singleton, 1996). Παρά το γεγονός ότι είναι ένα από τα πιο δημοφιλή τεστ, το μεγαλύτερο μειονέκτημα είναι ο χρόνος που απαιτείται για να γίνει.

Δοκιμή τριχλωροξικού οξέος (TCA)

Η δοκιμή τριχλωροξικού οξέος (TCA) βασίζεται στην ικανότητα του οξέος να κατακρημνίζει όλες τις πρωτεΐνες που βρίσκονται στον οίνο και παράγει ευρήματα που είναι συγκρίσιμα με αυτά που λαμβάνονται με τον υπολογισμό της συνολικής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη του οίνου (Boulton, 1980). Η δοκιμή TCA περιλαμβάνει την προσθήκη 1 mL διαλύματος TCA σε 55% (v/v) σε 10 mL οίνου, θέρμανση του μείγματος για 5 λεπτά στους 100 C σε υδατόλουτρο και στη συνέχεια κρύνει και παραμένει για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη μέτρηση της παραγωγής θολότητας (Hsu et al., 1987). Αυτή η δοκιμή μπορεί να συνδεθεί με τη σταθερότητα των πρωτεϊνών, σύμφωνα με τους Berg και Akiyoshi (1961), αλλά σε βιομηχανική κλίμακα, δεν παρέχει επαρκή ευρήματα, καθώς υπερεκτιμά την ποσότητα του λεπτού παράγοντα που απαιτείται για τη σταθεροποίηση του οίνου.

Δοκιμή κατακρήμνισης τανίνης

Η δοκιμή κατακρήμνισης τανίνης έχει σχεδιαστεί για να προσδιορίζει πόση πρωτεΐνη οίνου μπορεί να κατακρημνιστεί από τις τανίνες. Βασίζεται στην ιδέα ότι οι πρωτεΐνες του οίνου μπορεί να καθιζάνουν κατά την αποθήκευση του οίνου με τη σύντηξη με φαινολικές χημικές ουσίες. Μια προηγούμενη μελέτη από τους Yokotsuka et al. (1983) έδειξε ότι ο βαθμός πολυμερισμού των φαινολικών χημικών ουσιών επηρέασε το πόσο καλά συνδέονται με τις πρωτεΐνες. Αυτή η δοκιμή δεν αποτελεί αξιόπιστο δείκτη της ποσότητας του λεπτού παράγοντα που απαιτείται για τη σταθεροποίηση των οίνων, καθώς επηρεάζεται από μια σειρά εγγενών χαρακτηριστικών του οίνου, όπως το pH, η συνολική περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη, η συγκέντρωση σιδήρου, η περιεκτικότητα σε χαλκό και κάλιο (Esteruelas et al., 2009).

Bentotest

Το bentotest χρησιμοποιεί ένα φωσφομολυβδικό οξύ σε διάλυμα HCl που, εξουδετερώνοντας το πρωτεϊνικό φορτίο και κατακρημνίζοντας την πρωτεΐνη σταφυλιού, προκαλεί συσσωμάτωση με το ιόν μολυβδαινίου (Chambery et al., 2009). Όλες οι πρωτεΐνες στο δείγμα οίνου μπορεί να καθιζάνουν χρησιμοποιώντας αυτή τη μέθοδο, η οποία χρησιμοποιείται κυρίως για τον υπολογισμό της δοσολογίας του

μπεντονίτη. Το μειονέκτημα αυτής της δοκιμής, ωστόσο, είναι ότι υπερεκτιμά τον εκχυλιστικό παράγοντα που χρησιμοποιήθηκε για τη σταθεροποίηση του οίνου (Carr et al., 2004).

Δοκιμή αιθανόλης

Η δοκιμή αιθανόλης βασίζεται σε μείωση της διηλεκτρικής σταθεράς του μέσου, η οποία προκαλεί μείωση της διαλυτότητας της πρωτεΐνης (Versari et al., 2011) και προκαλεί την καθίζηση των λιγότερο διαλυτών πρωτεϊνικών κλασμάτων στο pH του οίνου. Η συνολική συγκέντρωση πρωτεΐνης, το pH, η περιεκτικότητα σε πηκτίνη, τρυγικό οξύ και ασβέστιο έχουν όλα σημαντικό αντίκτυπο σε αυτή τη δοκιμή, η οποία μπορεί να προκαλέσει διακυμάνσεις στον τρόπο με τον οποίο σχηματίζεται η θολότητα του οίνου (Tabilo-Munizaga et al., 2014). Επιπλέον, οι Esteruelas et al. (2009) απέδειξαν ότι οι πολυσακχαρίτες, οι πρωτεΐνες και οι πολυφαινόλες είναι τα κύρια συστατικά που καθιζάνουν με την προσθήκη αιθανόλης στους οίνους. Σύμφωνα με τη δοκιμή αιθανόλης, θα χρησιμοποιηθεί υπερβολική ποσότητα του παράγοντα διήθησης για τη σταθεροποίηση της πρωτεΐνης του οίνου`.

Φασματοσκοπικές τεχνικές

Οι παραδοσιακές δοκιμές σταθερότητας που αναφέρθηκαν είναι αρκετά χρονοβόρες. Κατά συνέπεια, φαίνεται πολλά υποσχόμενη η εφαρμογή φασματοσκοπίας εγγύς υπέρυθρης ακτινοβολίας (NIR) για την πρόβλεψη της αστάθειας της πρωτεΐνης του οίνου. Οι Versari et al. (2011) διερεύνησαν για πρώτη φορά τη βιωσιμότητα της χρήσης φασματοσκοπίας υπέρυθρης ακτινοβολίας για τη μέτρηση του σχηματισμού θολώματος αστάθειας πρωτεΐνης σε λευκούς οίνους που προκύπτουν από δοκιμές θερμότητας και κολλοειδούς σταθερότητας. Οι φασματικές περιοχές του εγγύς και του μέσου υπέρυθρου χρησιμοποιήθηκαν από τους συγγραφείς για την ανάλυση 111 λευκών οίνων και οι ίδιοι οίνοι υποβλήθηκαν επίσης σε δοκιμές σταθερότητας θερμότητας και προσθήκη αιθανόλης ταυτόχρονα. Τα φάσματα που αποκτήθηκαν από τη θολότητα χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία μοντέλων πρόβλεψης χρησιμοποιώντας ανάλυση παλινδρόμησης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS). Αυτοί οι ερευνητές απέδειξαν ότι τα φάσματα NIR μικρού μήκους κύματος μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πρόβλεψη της θολότητας που προέκυψε από την προσθήκη αιθανόλης στον οίνο.

1.3 Τρόποι αντιμετώπισης προβλήματος

Η διαδικασία σταθεροποίησης της πρωτεΐνης του οίνου περιλαμβάνει την αφαίρεση ασταθών πρωτεϊνών. Τυπικά, η διόγκωση μπεντονίτη χρησιμοποιείται για την επίτευξη αυτής της διαδικασίας σταθεροποίησης (Waters et al., 2005). Ωστόσο, η διεργασία διήθησης του μπεντονίτη έχει σημαντικά μειονεκτήματα που μειώνουν την οικονομική του αξία (Marangon et al., 2013). Η οινοποιία ενδιαφέρεται πολύ για τη μείωση της χρήσης μπεντονίτη ή/και την εύρεση υποκατάστατων τεχνολογιών ή προϊόντων, όπως η χρήση μαννοπρωτεϊνών μαγιάς (Gonzalez-Ramos, Quiro, Gonzalez, 2009) αναγεννημένων προσροφητικών, καραγενάνης, χιτίνης, χιτοζάνης, υπερδιήθησης και παστερίωσης ή πρωτεολυτικά ένζυμα (Ratnayake et al., 2019).

1.4 Οινοποιητικές πρακτικές για την πρόληψη ή τη μείωση της αστάθειας των πρωτεϊνών του κρασιού

Λόγω της αυξημένης συγκέντρωσης πρωτεϊνών και φαινολικών ενώσεων στο χυμό σταφυλιού, η έντονη ωρίμανση σταφυλιών σε ποικιλίες λευκού σταφυλιού πρέπει να αποφεύγεται (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Η ποσότητα των πρωτεϊνών στον χυμό σταφυλιού μπορεί να μειωθεί με τη χρήση πηκτολυτικών ενζύμων μολυσμένων με πρωτεολυτική δράση. Οι υψηλές ποσότητες πρωτεϊνών και φαινολικών ενώσεων που μπορούν να εκχυλιστούν κατά τη διαδικασία διαβροχής πριν από τη ζύμωση με ενζυμική εκχύλιση πρέπει να αποφεύγονται σε τύπους σταφυλιών με υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη, καθώς αυτό θα αύξανε την πρωτεϊνική αστάθεια του οίνου. Στην περιοχή του Μπορντό, η επαφή με τη φλούδα του σταφυλιού μπορεί να αυξήσει την ποσότητα των ασταθών πρωτεϊνών έως και περισσότερο από 50% σε ποικιλίες όπως το Sauvignon Blanc και το Semillon. Σε τύπους σταφυλιών που έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, τα επίπεδα SO₂ πρέπει να διατηρούνται στο ελάχιστο και η οξειδωτική προστασία πρέπει να πραγματοποιείται με χρήση αδρανών αερίων, όπως το CO₂ (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

Η οξειδωτική προστασία των σταφυλιών με χρήση SO₂ μπορεί να ενισχύσει την ποσότητα των πρωτεϊνών. Καθώς τα σταφύλια συμπιέζονται, οι τανίνες από τους μίσχους των σταφυλιών έχουν μια μοναδική τάση να αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες του χυμού σταφυλιού (Versari, Laghi, Thorngate, Boulton, 2011). Ως εκ τούτου, ένα στοιχείο που συμβάλλει στην αστάθεια των πρωτεϊνών των οίνων που παρασκευάζονται από ορισμένες ποικιλίες σταφυλιών μπορεί να είναι οι μηχανικοί τρυγητές σταφυλιών που αφαιρούν τα στελέχη (Jaeckels et al., 2017).

Η χρήση μπεντονίτη στη διαύγαση του χυμού ή κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του χυμού σταφυλιού μπορεί να είναι χρήσιμη για τη μείωση της ποσότητας πρωτεϊνών σε ποικιλίες λευκού σταφυλιού, όπως το Moscatel, που έχουν τακτικά υψηλές ποσότητες ασταθών πρωτεϊνών (Mesquita et al., 2001). Ο μπεντονίτης χρησιμοποιείται εδώ και πολύ καιρό για να ενισχύσει τη σταθερότητα και τη διαύγεια του οίνου και εξακολουθεί να είναι η πιο δημοφιλής τεχνική για τη σταθεροποίηση της πρωτεΐνης του οίνου. Είναι επίσης μια από τις πιο αποτελεσματικές πρακτικές που εφαρμόζεται συχνά σε βιομηχανική κλίμακα για να σταματήσει το σχηματισμό θολότητας μετά την εμφιάλωση και την αποθήκευση (Gazzola et al., 2012). Ο μοντμοριλονίτης αποτελεί τουλάχιστον το 75% των μπεντονιτών, οι οποίοι είναι σύνθετα ένυδρα πυριτικά αλουμίνια. Τα υδροπυριτικά άλατα αλουμινίου συνθέτουν την πολυστρωματική δομή του μοντμοριλλονίτη. Ο τύπος μπεντονίτη (Lambri et al., 2010), ο οποίος περιλαμβάνει μπεντονίτες νατρίου, ασβεστίου και μαγνησίου, προσδιορίζεται από τα ανταλλάξιμα κατιόντα, τα οποία μπορεί να είναι Na^+ , Ca^{2+} και Mg^{2+} . Τα K^+ και Fe^{2+} είναι μεταξύ των άλλων κατιόντων που υπάρχουν, ωστόσο είναι λίγα (Segad et al., 2010). Στην περιοχή του ενδιάμεσου στρώματος, όπου τα διάφορα κατιόντα είναι συμπλεγμένα, η απόσταση μεταξύ των στρωμάτων μπορεί να επηρεαστεί από την απόδοση διόγκωσης και προσρόφησης. Και οι δύο μπεντονίτες ασβεστίου και νατρίου είναι κοινοί τύποι, αλλά οι μπεντονίτες νατρίου εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται συχνότερα επειδή διογκώνονται περισσότερο από τους μπεντονίτες ασβεστίου (Catarinoetal., 2008) και η διόγκωση μπορεί να ενισχύσει την επιφάνεια στην οποία μπορεί να δεσμευτεί η πρωτεΐνη του κρασιού (Lira et al., 2015).

Ο μπεντονίτης ασβεστίου παράγει πιο συμπαγές ίζημα από το νάτριο μπεντονίτη, ενώ ο μπεντονίτης νατρίου απαιτεί μικρότερο χρόνο επεξεργασίας και παράγει περισσότερα ιζήματα συνολικά. Οι μπεντονίτες ασβεστίου ενεργοποιούνται με ανθρακικό νάτριο (Na_2CO_3) στους $80\text{ }^\circ\text{C}$ προκειμένου να βελτιωθούν οι ικανότητες προσρόφησης τους (Dordoni et al., 2015), παράγοντας μπεντονίτες ενεργοποιημένους από ασβέστιο με συγκρίσιμες ή ανώτερες ικανότητες προσρόφησης από τους μπεντονίτες νατρίου (Catarino et al., 2008). Το προσροφητικό διασπείρεται, οι διαλυμένες ουσίες προσροφούνται και το σύμπλοκο που σχηματίζεται μεταξύ του προσροφητικού και του προσροφητικού υλικού καθιζάνει κατά τη διαδικασία διόγκωσης του οίνου μπεντονίτη (Varkietal., 2015). Με τη δημιουργία συμπλοκών μέσω ηλεκτροστατικής επαφής με πρωτεΐνες, ο μπεντονίτης εξαλείφει τις πρωτεΐνες

που μπορούν στη συνέχεια να φιλτραριστούν. Οι πρωτεΐνες που έχουν pH μεγαλύτερο από το pH του κρασιού έχουν καθαρό θετικό φορτίο και μπορούν να προσροφηθούν από τον μπεντονίτη μέσω ανταλλαγής ιόντων νατρίου, ασβεστίου και μαγνησίου (Guadalupe et al., 2007).

Η αποτελεσματικότητα της θεραπείας με μπεντονίτη κατά συνέπεια επηρεάζεται από τον τύπο και τη δοσολογία του μπεντονίτη, τη θερμοκρασία, το pH και τη σύνθεση του οίνου. Η ικανότητα του μπεντονίτη να αφαιρεί τις πρωτεΐνες του οίνου επηρεάζεται σημαντικά από τον τρόπο παρασκευής του (Filipe-Ribeiro et al., 2018). Στο pH του οίνου, ο ενυδατωμένος μπεντονίτης μπορεί να διογκωθεί, αυξάνοντας την επιφάνειά του και δημιουργώντας ένα πηκτωμα με σημαντικό αρνητικό φορτίο. Αυτό το πηκτωμα αλληλεπιδρά ηλεκτροστατικά με θετικά φορτισμένα κολλοειδή οίνου και πρωτεΐνες, προκαλώντας κροκίδωση. Ωστόσο, οι υπερβολικές δόσεις μπεντονίτη οδηγούν σε οινολάσπη που μπορεί να περιλαμβάνει το 5% έως 20% του όγκου του οίνου, προκαλώντας απώλειες οίνου (Benucciet al., 2015). Δεδομένου ότι ο χρησιμοποιημένος μπεντονίτης δεν μπορεί να ανακυκλωθεί, δημιουργείται μια σημαντική αρνητική επίδραση στο περιβάλλον (Esti et al., 2013).

Δεδομένου ότι τα ιόντα υδρογόνου ανταγωνίζονται μεταξύ τους για την προσρόφηση, οι Lambri et al. (2010) διαπίστωσαν ότι η αποτελεσματικότητα της προσρόφησης μπεντονίτη ποικίλλει ανάλογα με τις διάφορες τιμές του pH, με περισσότερες πρωτεΐνες να αφαιρούνται σε pH 3,60 παρά σε pH 3,30. Η απομάκρυνση των διαφόρων συστατικών πρωτεΐνης οίνου με προσθήκη μπεντονίτη δεν συνέβη σε ίση κατανομή, σύμφωνα με τους Bayly και Berg (1967). Οι πρωτεΐνες υψηλού pI (5,8-8,0) και ενδιάμεσων MW είναι οι πρώτες που εξαλείφονται από τον μπεντονίτη (32–45 kDa). Παρόλα αυτά, οι Hsu et al. (1987) διαπίστωσαν χρησιμοποιώντας το 2D-GE ότι είναι ζωτικής σημασίας να αφαιρεθούν πρωτεΐνες με χαμηλότερο pI (4,1–5,8) και χαμηλότερο MW (12,6 και 20–30 kDa), συμπεριλαμβανομένων των γλυκοπρωτεϊνών, οι οποίες αποτελούν σημαντικό μέρος των πρωτεϊνών, προκειμένου να σταθεροποιήσει τον οίνο.

Οι αναλύσεις του Jaeckels et al. (2017) για την επίδραση ενός μπεντονίτη συνδυασμένου με NaCa στην περιεκτικότητα και τη σύνθεση πρωτεΐνης αρκετών οίνων, αποκάλυψαν μερική επιλεκτικότητα στην προσρόφηση πρωτεΐνης. Είναι σημαντικό ότι ο μπεντονίτης δεν αφαιρέσε σημαντικά τις γλυκοζυλιωμένες πρωτεΐνες

από το σώμα. Αυτοί οι ερευνητές απέδειξαν χρησιμοποιώντας φασματομετρία μάζας ότι ο συνδυασμένος με NaCa μπεντονίτης προσρόφησε το 96% της χιτινάσης κατηγορίας IV, ενώ διάφορες ισομορφές πρωτεΐνης που μοιάζουν με θαυματίνη εμφάνισαν ποικίλες συμπεριφορές προσρόφησης, που κυμαίνονται από μη απομάκρυνση έως αποβολή 98%. Αυτές οι αποκλίσεις στη συμπεριφορά μπορεί να εξηγηθούν από τις υδρόφοβες επιφάνειες των πρωτεϊνών.

Σύμφωνα με τους Dawes et al. (1994), ο μπεντονίτης δεν ήταν εκλεκτικός ως προς την πρωτεΐνη pI, επομένως η διόγκωση του μπεντονίτη μπορεί να αφαιρέσει όλα τα πρωτεϊνικά κλάσματα. Σύμφωνα με τους Ferreira et al. (2002) και Lambri et al. (2010), ο μπεντονίτης δεν είναι μόνο αποτελεσματικός στην αφαίρεση πρωτεϊνών. Μπορεί επίσης να απαλλαγεί από άλλα φορτισμένα είδη και αδρανή. Ο μπεντονίτης μπορεί να αλληλεπιδράσει με τις αρωματικές ενώσεις του κρασιού (Moio et al., 2004), γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια του αρώματος και της γεύσης του κρασιού. Αντίθετα, ορισμένα κολλοειδή κρασιού είναι ευεργετικά επειδή παρέχουν τη δομή και τον όγκο του κρασιού και βοηθούν στη διατήρηση των αρωματικών συστατικών. Επιπλέον, μόνο ένας μικρός αριθμός μορίων ενεργών για την οσμή απομακρύνεται άμεσα με την προσρόφηση, ενώ η πλειονότητα εξαλείφεται έμμεσα μέσω της αποπρωτεϊνοποίησης (Lambri et al., 2010).

Η επεξεργασία με μπεντονίτη έχει ισχυρότερη επιβλαβή επίδραση στο άρωμα του κρασιού σε κρασιά με πιο υδρόφιλα συστατικά αρώματος και ισχυρές συγγένειες πρωτεΐνης. Έτσι, η προσθήκη πολύ μπεντονίτη μπορεί να έχει αρνητικό αντίκτυπο στις αισθητηριακές ιδιότητες του κρασιού. Από την άλλη πλευρά, έχει προταθεί ότι ο λεπτός χυμός σταφυλιού με μπεντονίτη μπορεί να μειώσει τη συνολική δόση μπεντονίτη που απαιτείται για τη σταθεροποίηση του κρασιού σε σύγκριση με το φινίρισμα κρασιού (Lambri et al., 2012). Το φινίρισμα του μούστου έχει αρνητικό αντίκτυπο στην ποιότητα του κρασιού, στα αρώματα της ποικιλίας και στη ζύμωση, καθώς και στην ποσότητα αζώτου που είναι προσβάσιμη. Μια άλλη στρατηγική είναι η χρήση του μπεντονίτη κατά τη ζύμωση του κρασιού, η οποία εισήχθη για πρώτη φορά από τους Ewart et al. (1980) και έκτοτε έχει επεκταθεί από άλλους ερευνητές (Lira et al., 2015). Αυτή η μέθοδος έχει τη δυνατότητα να μειώσει την ποσότητα του μπεντονίτη που απαιτείται για τη σταθεροποίηση του οίνου και, ως αποτέλεσμα, να βελτιώσει την ποιότητα του οίνου. Ο μπεντονίτης έχει δράση ανταλλαγής κατιόντων και μπορεί να αυξήσει τα επίπεδα κατιόντων του οίνου, ιδιαίτερα τα ιόντα νατρίου, πάνω από τα επιτρεπόμενα

όρια, επιπλέον των αρνητικών συνεπειών που αναφέρθηκαν ήδη όταν χρησιμοποιείται για το τελείωμα του οίνου (Dordoni et al., 2015). Οι εναλλακτικές λύσεις σταθεροποίησης πρωτεΐνης οίνου έχουν ερευνηθεί και εξετάζονται επί του παρόντος, καθώς η χρήση μπεντονίτη έχει επιζήμια επίδραση στην ποιότητα του οίνου και προκαλεί απώλειες όγκου στον οίνο. `

Έχει ερευνηθεί πόσο καλά λειτουργούν άλλα προσροφητικά, συμπεριλαμβανομένου του μπεντονίτη, για να σταθεροποιήσουν τον οίνο μειώνοντας την αστάθεια των πρωτεϊνών. Ένα υλικό με χαμηλή θερμική αγωγιμότητα, χαμηλό δυναμικό διάβρωσης, σκληρότητα και ισχυρή θερμική και μηχανική αντίσταση είναι το διοξείδιο του ζirkονίου, συχνά γνωστό ως ζirkόνιο (Liu, Nyavor, Ankumah, 2005). Οι ασταθείς πρωτεΐνες του οίνου μπορεί να είναι προσροφήσιμες από το οξείδιο του ζirkονίου, το οποίο σταθεροποιεί το κρασί και εξαλείφει επιλεκτικά τα κλάσματα πρωτεΐνης του οίνου μεταξύ 20 και 30 kDa (Pashova, Guell, López, 2004). Οι φυσικοχημικές και αισθητηριακές ιδιότητες του οίνου επηρεάστηκαν μόνο ελαφρώς από αυτό το προσροφητικό κατά τη διάρκεια της διαδικασίας συνεχούς σταθεροποίησης (Salazar et al., 2006).

Οι λευκοί οίνοι σταθεροποιούνται αφαιρώντας ασταθείς πρωτεΐνες μέσω προσρόφησης χρησιμοποιώντας σφαιρίδια οξειδίου του ζirkονίου που περικλείονται σε μεταλλικούς κλωβούς βυθισμένους σε οίνο σε συγκέντρωση 25 g/L για 72 ώρες, όπως αποδεικνύεται από τους Marangon et al. (2011), αλλά οι ερευνητές παρατήρησαν μια ελαφρά μείωση στην ένταση του αρώματος και της γεύσης των φρούτων. Η αναγέννηση αυτού του υλικού μπορεί να είναι μάλλον εύκολη, όπως έδειξε αυτό το πείραμα. Φυσικοί ζεόλιθοι προτάθηκαν επίσης από τους Mercurio et al. (2010) και Mierczynska-Vasilev et al. (2019) ως υποκατάστατα προσροφητικά για τη σταθεροποίηση της πρωτεΐνης του οίνου. Οι υψηλές αναλογίες ζεόλιθου/οίνου επέτρεψαν τη σταθεροποίηση της πρωτεΐνης του οίνου και η επεξεργασία με σκόνη πλούσια σε ζεόλιθο μείωσε σημαντικά τη συγκέντρωση ιόντων καλίου, βελτιώνοντας την τρυγική σταθερότητα (Mierczynska-Vasilev et al., 2019). Οι φυσικοί ζεόλιθοι έχουν μια εξαιρετικά αρνητικά φορτισμένη εξωτερική επιφάνεια που επιτρέπει τις αλληλεπιδράσεις τους με άλλα κατιόντα ή πολικά μόρια. Ανακαλύφθηκε ότι η χρήση 4 ή 6 g/L για τον οίνο από Semillion και Sauvignon Blanc ή Chardonnay, αντίστοιχα, και μεγέθη σωματιδίων ζεόλιθου στην περιοχή από 20 έως 50 m και επεξεργασία για 3 ώρες ήταν επαρκής για να επιτευχθεί πλήρης θερμική σταθερότητα. Επίσης, δεν είχε

καμία αισθητή επίδραση στην ποσότητα των πιο τυπικών φαινολικών χημικών ουσιών που συνδέονται με τη γεύση ή την ποιότητα του αρώματος του οίνου μετά την επεξεργασία (Wyss, Cuénot, 2005). Οι ζεόλιθοι μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν ως βελτιωτικά του εδάφους στη γεωργία, σε αντίθεση με τον μπεντονίτη, ο οποίος προκάλεσε σημαντικές απώλειες όγκου οίνου (Mierczynska-Vasilev et al., 2019).

Προκειμένου να σταθεροποιηθεί ο οίνος σε σχέση με τις ασταθείς πρωτεΐνες του κρασιού, έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί φαινολικές ενώσεις (παράγωγα ταννικού οξέος), ακινητοποιημένες σε ρητίνες χρωματογραφίας αραρόζης. Ενώ τα παράγωγα ταννικού οξέος έδειξαν τη δυνατότητα να αφαιρούν τις πρωτεΐνες του οίνου, φάνηκε ότι χάνουν την ικανότητά τους να δεσμεύουν πρωτεΐνες μετά από περιορισμένο αριθμό κύκλων αναγέννησης (Rodrigues et al., 2019). Οι Sarmiento et al. (2000) ερευνήσαν την ικανότητα αρκετών ουσιών να αφαιρούν τις πρωτεΐνες του οίνου, συμπεριλαμβανομένου του αργίλου χαμηλής διόγκωσης, των ρητινών ανταλλαγής ιόντων, της αλουμίνας, του υδροξυαπατίτη και της γέλης πυριτίου. Τα ευρήματα καταδεικνύουν ότι οι σφιχτά συσκευασμένες στήλες που περιέχουν ρητίνες ανταλλαγής ιόντων είχαν ισχυρή ικανότητα να προσροφούν πρωτεΐνες, αλλά το χρώμα και το άρωμα των οίνων επηρεάστηκαν αρνητικά.

Σύμφωνα με τους Gonçaves et al. (2002), οι μαννοπρωτεΐνες αποτελούν το 32,2% όλων των πολυσακχαριτών που βρίσκονται στον λευκό οίνο. Καθώς αποτελούν το 35-40% του κυτταρικού τοιχώματος, προέρχονται από το εξωτερικό στρώμα του κυτταρικού τοιχώματος του ζυμομύκητα, ειδικά από το *Saccharomyces cerevisiae*. Αυτοί οι πολυσακχαρίτες είναι εξαιρετικά γλυκοσυλιωμένες γλυκοπρωτεΐνες που συνδέονται ομοιοπολικά σε μια άμορφη μήτρα -1,3-γλυκάνης (Klis et al., 2002). Περιλαμβάνουν 10-20% πρωτεΐνη και 80% d-μαννόζη, με χαμηλότερες συγκεντρώσεις d-γλυκόζης και N-ακετυλογλυκοζαμίνης (Rodrigues et al., 2012). N- και O-συνδεδεμένοι υδατάνθρακες ενώνονται με υπολείμματα ασπαραγίνης, σερίνης ή θρεονίνης, αντίστοιχα, στις μαννοπρωτεΐνες. Μικρές αλυσίδες μαννόζης που ενώνονται με το υδροξύλιο ομάδες των πλευρικών αλυσίδων υπολειμμάτων σερίνης ή θρεονίνης μέσω -γλυκοσιδικών συνδέσεων συνθέτουν τους O-γλυκοζυλιωμένους υδατάνθρακες στις μαννοπρωτεΐνες. Τα υπολείμματα μαννόζης συχνά σχηματίζουν αυτές τις κοντές αλυσίδες, με τις εσωτερικές πρώτες δύο να είναι συνδεδεμένες με 1,2 και τα εξωτερικά υπολείμματα μαννόζης να έχουν δεσμούς 1,3-d (Varki et al., 2015). Μια εξωτερική αλυσίδα 50 ή περισσότερων 1,6-συνδεδεμένων υπολειμμάτων Man που

συχνά αντικαθίστανται με σύντομους πλευρικούς κλάδους 1,2-Man που καταλήγουν σε 1,3-συνδεδεμένα υπολείμματα μαννόζης μπορεί να προστεθεί για να επιμηκύνει τις N-συνδεδεμένες γλυκάνες. Τα 1,2-συνδεδεμένα υπολείμματα μπορούν ενδεχομένως να ενωθούν με υπολείμματα μαννόζης συνδεδεμένα με φωσφοδιεστέρα. Οι μαννοπρωτεΐνες που βρίσκονται στον οίνο είναι ποικίλες και κυμαίνονται σε μοριακό βάρος από 5 έως 400 kDa. Ωστόσο, οι Waters et al. (1994) ανακάλυψαν μια μαννοπρωτεΐνη με μοριακό βάρος 420 kDa με σύνθεση 98% μαννάνη και 30% πολυπεπτίδιο. Ωστόσο, συχνά πιστεύεται ότι η ποσότητα των μαννοπρωτεϊνών που παράγεται κατά την οινοποίηση είναι ανεπαρκής για να σταθεροποιήσει αποτελεσματικά τις πρωτεΐνες (Dupin et al., 2000). Έχει προταθεί ότι η χρήση μπεντονίτη και άλλων θεραπειών για τη σταθεροποίηση της πρωτεΐνης του οίνου μπορεί να μειωθεί ή ίσως να αντικατασταθεί πλήρως από τη χρήση μαννοπρωτεϊνών στην οινολογία. Ο Διεθνής Οργανισμός Αμπέλου και Οίνου (OIV) ενέκρινε τη χρήση μαννοπρωτεϊνών ζύμης για τη θεραπεία οίνων το 2005 με το ψήφισμα Oeno 4/01. 15/05 (OIV, 2009).

Η εμπορική παραγωγή μαννοπρωτεΐνης έχει αυξηθεί χάρη στη χρήση βιοτεχνολογικών διαδικασιών, όπως τα τροποποιημένα στελέχη ζύμης (*S. cerevisiae*) για την ενίσχυση των επιπέδων μαννοπρωτεΐνης (Gonzalez-Ramos et al., 2009). Οι μαννοπρωτεΐνες επιλέγονται συχνά λόγω της ευεργετικής τους συμπεριφοράς στη σταθεροποίηση των πρωτεϊνών και τη μείωση της θολότητας στους λευκούς οίνους. Επιπλέον, μπορεί να έχουν καλό αντίκτυπο στην ποιότητα του κρασιού οίνου (Guadalupe et al., 2007). Όταν ο οίνος υποβάλλεται σε υψηλές θερμοκρασίες, οι Waters et al. (1993) έχουν δείξει ότι οι μαννοπρωτεΐνες του οίνου προστατεύουν τις ασταθείς πρωτεΐνες, μειώνοντας τη θολότητα του οίνου. Ωστόσο, οι ίδιοι ερευνητές απέδειξαν επίσης ότι αυτή η δράση δεν εμποδίζει την καθίζηση των πρωτεϊνών. Αντίθετα, είδαν μια μείωση στο μέγεθος των σωματιδίων, κάτι που βοήθησε να εξηγηθεί γιατί ο οίνος φαινόταν να έχει σταθεροποιηθεί όταν αξιολογήθηκε με θολότητα. Άλλες γλυκοπρωτεΐνες, όπως ένα θραύσμα ινβερτάσης ζύμης (32 kDa), πρωτεΐνες αραβινογαλακτάνης οίνου με 210 kDa, αραβικό κόμμι και πρωτεΐνες αραβινογαλακτάνης μήλου, έχουν επιδείξει προστατευτική δράση, αποτρέποντας το σχηματισμό θολότητας και σταθερότητα πρωτεΐνης οίνου (Besse, Clark, Scollary, 2000).

Το άγαρ, η καραγενάνη και το αλγινικό οξύ είναι παραδείγματα πολυσακχαριτών που προέρχονται από φύκια, των οποίων το αρνητικό φορτίο σε χαμηλό pH τους επιτρέπει

να κροκιδώνουν ηλεκτροστατικά και να καθιζάνουν θετικά φορτισμένες πρωτεΐνες, καθιστώντας τες κατάλληλο υποκατάστατο για τη σταθεροποίηση της πρωτεΐνης του οίνου (Cabello-Pasini et al., 2005). Μια ομάδα γραμμικών, θειωμένων γαλακτανών γνωστών ως καραγενάνες λαμβάνονται από τα κόκκινα φύκια γνωστά ως καρραγενόφυτα, όπου είναι το πιο διαδεδομένο συστατικό των κυτταρικών τοιχωμάτων. Οι καραγενάνες αποτελούνται από μονάδες -(14)-3,6-άνυδρο-d-γαλακτόζης και -(13)-d-γαλακτόζης. Οι μονάδες γαλακτόζης της καραγενάνης και 3,6-άνυδρο-d-γαλακτόζης μπορούν να θειωθούν με μέση σχετική μοριακή μάζα πολύ μεγαλύτερη από 100 kDa και σύνθεση 15–40% θεικού εστέρα. Η ποσότητα και η τοποθέτηση των ομάδων θεικού εστέρα στις επαναλαμβανόμενες μονάδες γαλακτόζης ποικίλλει μεταξύ των διαφορετικών ισομερών της καραγενάνης (Campo et al., 2009). Η ποσότητα και η θέση των ομάδων θεικού εστέρα στις επαναλαμβανόμενες μονάδες γαλακτόζης είναι οι κύριες παραλλαγές που επηρεάζουν τα χαρακτηριστικά της κάπα, της γιώτα και της λάμδα καραγενάνης. Τα υπολείμματα 3-συνδεδεμένης D-γαλακτόζης και 4-συνδεδεμένης 3,6-άνυδρο-γαλακτόζης που συνθέτουν τη δομή της καραγενάνης εναλλάσσονται μεταξύ τους, με την περιεκτικότητα σε θεικούς εστέρες της τελευταίας να κυμαίνεται μεταξύ 25-30% και το τελευταίο είναι της τάξης του 28–35%. Μια δεύτερη θεική ομάδα υπάρχει στο C-2 του υπολείμματος 3,6-4-συνδεδεμένης ανυδρο-γαλακτόζης σε γιώτακαραγενάνη, δίνοντάς του δύο θεικά άλατα ανά επαναλαμβανόμενη μονάδα δισακχαρίτη. Περιέχει μεταξύ 25 και 30 τοις εκατό 3,6-άνυδρο-γαλακτόζη και μεταξύ 28 και 30 τοις εκατό θεικού εστέρα. Κάθε μονάδα δισακχαρίτη στη λάμδα καραγενάνη περιλαμβάνει τρεις θεικές ομάδες, η τρίτη από τις οποίες συνδέεται στη θέση C-6 του 4-συνδεδεμένου υπολείμματος. Δεν υπάρχει 3,6-άνυδρο-γαλακτόζη και η συγκέντρωση θεικού εστέρα κυμαίνεται από 32 έως 39 τοις εκατό (Guangling et al., 2011).

Παρόμοια με την καραγενάνη, το άγαρ αποτελείται από ετερογενείς πληθυσμούς μορίων με διαφορετικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά. Αποτελείται κυρίως από δύο διαφορετικούς τύπους πολυσακχαριτών, όπως η αγαρόζη, η οποία είναι μια γραμμική αλυσίδα υπολειμμάτων 3,6-άνυδρο-1-γαλακτοπυρανοσυλίου που συνδέονται με δεσμούς. Ο άλλος πολυσακχαρίτης άγαρ είναι η αγκαροπηκτίνη, η οποία είναι ένας διακλαδιζόμενος πολυσακχαρίτης. Η αγαρόζη μπορεί να περιλαμβάνει ίχνη ομάδων θεικού εστέρα και πυροσταφυλικό 3,6-κυκλική ακετάλη. Έχει, επίσης, αναφερθεί ότι υπάρχει αγαροβιόζη που περιέχει 1-γαλακτόζη. Ανάλογα με το φύλο και το είδος, που

εξαρτώνται από τα γενετικά τους χαρακτηριστικά, διάφορα αγαρόφυτα μπορούν να δημιουργήσουν αυτές τις αγκαρόβιες σε μια ποικιλία διαφορετικών μορφών. Η παραγωγή αγαροβιόζης μπορεί να επηρεαστεί από διάφορες μεταβλητές, συμπεριλαμβανομένου του τύπου υποστρώματος, της διαθεσιμότητας θρεπτικών ουσιών και των υδροδυναμικών συνθηκών (Guangling et al., 2011).

Καθώς τα φυτά αναπτύσσονται το καλοκαίρι, ο χρόνος συγκομιδής είναι κρίσιμος παράγοντας. Υπάρχουν επίσης σημαντικά επίπεδα ομάδων μεθυλαιθέρα. Το άγαρ είναι το λιγότερο υδρόφιλο και υδατοδιαλυτό από τους πολυσακχαρίτες των ερυθρών φυκιών λόγω της δομικής του σύνθεσης. Συνήθως διαλύεται στο νερό σε θερμοκρασίες 100 °C ή υψηλότερες, ενώ διατίθενται παρασκευάσματα που ενυδατώνονται και διαλύονται στους 80 °C περίπου. Τα κλάσματα άγαρ που είναι γνωστά ως αγαρόζες είναι βασικά πολυσακχαρίτες που σχηματίζουν γέλη με υψηλά μοριακά βάρη άνω των 100.000 Daltons και συνήθως άνω των 150.000 Daltons και χαμηλή περιεκτικότητα σε θειικά άλατα που είναι συνήθως κάτω από 0,15% (Mierczynska-Vasilev et al., 2019). Τα υπόλοιπα κλάσματα άγαρα αποτελούνται από αγαροπηκτίνη με χαμηλότερο μοριακό βάρος, συνήθως κάτω από 20.000 Daltons, συχνά 14.000 Daltons, και μεγαλύτερες ποσότητες θειικών ομάδων, που μερικές φορές μπορεί να φτάσουν το 5% έως 8%. Με μπλοκ που περιλαμβάνουν υπολείμματα (1,4)-συνδεδεμένο-d-mannuronate (M) και (1,4)-l-guluronate (G) και να είναι αρνητικά φορτισμένα σε χαμηλό pH, το αλγινικό είναι μια άλλη φυσικά απαντώμενη οικογένεια υδρόφιλων γραμμικών πολυσακχαριτών φυκών που βρέθηκε στα κυτταρικά τοιχώματα των φυκιών. Προέρχεται συνήθως από καφέ φύκια (Jaekelsetal., 2017). Τα μπλοκ αποτελούνται από εναλλασσόμενα υπολείμματα M και G (GMGMGM), ακολουθούμενα από διαδοχικά υπολείμματα G (GGGGGG) και στη συνέχεια διαδοχικά υπολείμματα M (MMMMM). Το μήκος κάθε μπλοκ και τα επίπεδα M και G των αλγινικών που ανακτώνται από διάφορες πηγές ποικίλλουν, ενώ τα αλγινικά με υψηλή περιεκτικότητα σε G είναι πιο σημαντικά βιομηχανικά (Mierczynska-Vasilev et al., 2019). Τα αλγινικά άλατα νατρίου που πωλούνται έχουν μοριακά βάρη που ποικίλλουν από 32.000 έως 400.000 g/mol. Όταν το pH ενός αλγινικού διαλύματος μειώνεται, οι καρβοξυλικές ομάδες στον αλγινικό σκελετό πρωτονιώνονται και σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου, αυξάνοντας το ιξώδες του διαλύματος σε μέγιστο pH περίπου 3-3,5. Οι μαννοπρωτεΐνες για οινολογικές εφαρμογές εξάγονται από το καθαρό κυτταρικό τοίχωμα ζυμομύκητα είτε μέσω ενζυματικής εκχύλισης με χρήση εξω- (13)-

γλυκοσιδάσης (EC 3.2.1.58) για υδρόλυση γλυκάνης είτε μέσω φυσικοχημικών διεργασιών. Η εμπορική παραγωγή μαννοπρωτεΐνης έχει αυξηθεί χάρη στη χρήση βιοτεχνολογικών τεχνολογιών, όπως τροποποιημένα στελέχη ζύμης (*S. cerevisiae*) για την ενίσχυση των επιπέδων μαννοπρωτεΐνης (Estietal., 2013). Οι μαννοπρωτεΐνες επιλέγονται συχνά υπό το φως της χρησιμότητάς τους στη σταθεροποίηση πρωτεϊνών. Ορισμένες δομικές πληροφορίες μαννάνης *Saccharomyces cerevisiae* λαμβάνονται από τους Hernández et al. (1989). Η ονοματολογία συμβόλων για τη γραφική αναπαράσταση των γλυκανών (Varki et al., 2015), χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία της δομής. Έχει προταθεί ότι η χρήση μπεντονίτη και άλλων θεραπειών για τη σταθεροποίηση της πρωτεΐνης του κρασιού μπορεί να μειωθεί ή ίσως να αντικατασταθεί πλήρως από τη χρήση μαννοπρωτεϊνών στην οινολογία. Ο Διεθνής Οργανισμός Αμπέλου και Οίνου (OIV) ενέκρινε τη χρήση μαννοπρωτεϊνών ζύμης για τη θεραπεία οίνων το 2005 με το ψήφισμα Oeno 4/01. 15/05 (OIV, 2009).

Η караγενάνη και το αλγινικό οξύ έχουν μεγαλύτερες ιδιότητες κροκίδωσης από το άγαρ λόγω της μεγαλύτερης συγκέντρωσης ελεύθερων αρνητικών φορτίων (Cabello-Pasini et al., 2005). Η μελέτη της χρήσης της караγενάνης σε διάφορα στάδια της οينوποίησης αποκάλυψε ότι ο χρόνος της εφαρμογής ήταν καθοριστικός για την αποτελεσματικότητά της. Πριν ή κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, η συμπερίληψη της караγενάνης παρήγαγε σταθερούς οίνους που ήταν ίσοι με τους οίνους με εκλεκτό μπεντονίτη (Marangonet al., 2012). Ωστόσο, ακόμη και αν χρειάζεται λιγότερη караγενάνη όταν προστίθεται μετά τη ζύμωση, υπάρχει πιθανότητα ο οίνος να αποτύχει στη δοκιμή θερμότητας, καθώς η караγενάνη εξακολουθεί να υπάρχει, προκαλώντας την ανάπτυξη θολώματος κατά τη διάρκεια της δοκιμής θερμότητας και μειώνοντας τη δυνατότητα φιλτραρίσματος του οίνου. Παρατηρήθηκε ότι η караγενάνη αφαιρεί τα ίδια πρωτεϊνικά κλάσματα που προσρόφησε ο μπεντονίτης (Cabello-Pasini et al., 2005), υποδεικνύοντας ότι αυτοί οι πολυσακχαρίτες θα μπορούσαν να έχουν ισχυρότερη ικανότητα σταθεροποίησης του οίνου σε σύγκριση με τον μπεντονίτη (Salazar et al., 2013). Οι караγενάνες μπόρεσαν να αφαιρέσουν πρωτεΐνες σε συγκεντρώσεις πάνω από 400 mg/L, ενώ η δραστηριότητα απομάκρυνσης του αλγινικού οξέος κορυφώθηκε σε ποσότητες κάτω των 50 mg/L πρωτεΐνης (Cabello-Pasini et al., 2005). Η караγενάνη δεν έχει επιζήμια αισθητηριακά αποτελέσματα σε σύγκριση με οίνους που έχουν υποστεί επεξεργασία με μπεντονίτη, όπως φαίνεται από τους Marangon et al. (2014).

Προκειμένου να προσδιοριστεί η αποτελεσματικότητα της απομάκρυνσης πρωτεΐνης και η επιρροή της στις αισθητηριακές ιδιότητες του οίνου, οι Ratnayake et al. (2019) δοκίμασαν τις εμπορικά διαθέσιμες καραγενάνες σε διάφορα στάδια οινοποίησης στο χυμό σταφυλιού, κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και στον οίνο. Η καραγενάνη δεν έχει επιζήμια αισθητηριακά αποτελέσματα σε σύγκριση με οίνους που έχουν υποστεί επεξεργασία με μπεντονίτη, όπως φαίνεται από τους Marangon et al. (2014). Χωρίς να έχουν επιζήμια επίδραση στις αισθητηριακές ιδιότητες του οίνου, τα - και -/- carrageenans ήταν επιτυχή στη σταθεροποίηση των οίνων όσον αφορά την ανάπτυξη θολότητας, όπως αξιολογήθηκε από τη δοκιμή θερμότητας (80 °C/2 h, 20 °C/3 h). Ανάλογα με το στάδιο της προσθήκης καραγενάνης στη διαδικασία οινοποίησης καθώς και με τη δομή της καραγενάνης, η ικανότητα φιλτραρίσματος του οίνου και η συγκέντρωση ιόντων μετάλλου διέφεραν (Salazar et al., 2010).

Μετά την κυτταρίνη, η χιτίνη είναι ο πιο διαδεδομένος πολυσακχαρίτης στη φύση. Η χιτίνη βρίσκεται συχνά ως διατεταγμένα κρυσταλλικά μικροϊνίδια στα κύτταρα των μυκήτων και των μικροβίων, καθώς και στα δομικά στοιχεία των καρκινοειδών και των εντόμων. Ένας γραμμικός πολυσακχαρίτης που ονομάζεται χιτίνη αποτελείται από υπολείμματα N-ακετυλ-d-γλυκοζαμίνης που ενώνονται μεταξύ τους με συνδέσμους. Η εμπορική παραγωγή χιτοζάνης περιλαμβάνει την αποακετυλίωση της χιτίνης. Είναι επίσης ένας γραμμικός πολυσακχαρίτης με αποακετυλιωμένα -(1,4)-συνδεδεμένα υπολείμματα d-γλυκοζαμίνης και υπολείμματα N-ακετυλ-d-γλυκοζαμίνης διεσπαρμένα τυχαία (ακετυλιωμένα). Οι χιτοζάνες του εμπορίου έχουν ένα επίπεδο αποακετυλίωσης μεταξύ 60 και 100%. Η αμινομάδα της χιτοζάνης έχει τιμή pKa περίπου 6,5. Η χιτοζάνη είναι έτσι θετικά φορτισμένη, διαλυτή σε όξινα έως ουδέτερα διαλύματα και έχει πυκνότητα φορτίου που εξαρτάται από το pH και το βαθμό αποακετυλίωσης. Λόγω των υψηλών επιπέδων ενδο- και διαμοριακών δεσμών υδρογόνου, η χιτίνη είναι αδιάλυτη στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες, συμπεριλαμβανομένου του νερού και των αραιωμένων οξέων. Η χιτοζάνη είναι διαλυτή σε ασθενή οξέα με pH 6,0 ή μικρότερο, συμπεριλαμβανομένων των οξικών, μυρμηκικών και γαλακτικών οξέων. Σε ουδέτερο νερό, η χιτίνη και η χιτοζάνη είναι αδιάλυτες. Η ποσότητα της αποακετυλίωσης και το μοριακό βάρος καθορίζουν πόσο διαλυτή είναι η χιτοζάνη. Για εφαρμογές οίνου, επιτρέπονται μόνο η χιτίνη (Oeno 367-2009 Chitin-Glucan) και η χιτοζάνη (Oeno 368-2009 Chitosan) που λαμβάνονται από τα κυτταρικά τοιχώματα του *Aspergillus niger* (European Union, 2011) με το ίδιο

μέγιστο όριο των 500 g/hL. Αυτό συμβαίνει παρά το γεγονός ότι η πλειονότητα της χιτίνης και της χιτοζάνης παράγονται εμπορικά από απόβλητα οστρακοειδών μέσω χημικής επεξεργασίας. Η πλειονότητα της μυκητιακής χιτίνης βρίσκεται σε κυτταρικά τοιχώματα που συνδέονται με 1,3- και 1,6-γλυκάνες, ενώ έχει ορισμένες δομικές ομοιότητες με τις χιτίνες των καρκινοειδών (Arroyo et al., 2016).

Σύμφωνα με έρευνα των Vincenzi et al. (2005), οι χιτινάσες κατηγορίας IV σταφυλιού είναι ένα είδος πρωτεΐνης κρασιού που η χιτίνη μπορεί να αφαιρέσει. Το θόλωμα που προκλήθηκε από τη δοκιμή θερμότητας μειώθηκε κατά 50% με την προσθήκη 1 g/L χιτίνης στον οίνο και κατά περίπου 80% με την προσθήκη 20 g/L χιτίνης. Η εξάλειψη των χιτινασών σταφυλιών κατηγορίας IV ήταν άμεσα υπεύθυνη για τη μείωση της θολότητας. Η επίδραση της επεξεργασίας χιτίνης στην αισθητική ποιότητα του οίνου, ωστόσο, δεν διερευνήθηκε. Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι οι Ndlovu et al. (2018) έχουν δείξει την ικανότητα των στελεχών ζυμομύκητα με υψηλά επίπεδα χιτίνης στο κυτταρικό τοίχωμα να δεσμεύουν τις χιτινάσες, παρέχοντας μια πιθανή μέθοδο για τη μείωση της παραγωγής θολώματος πρωτεΐνης κρασιού. Η θερμική σταθερότητα των οίνων που υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με 100 g/hL μυκητιακής χιτοζάνης-γλυκάνης (Filipe-Ribeiro, Cosme, Nunes, 2018) αυξήθηκε στην περιοχή 55–62 °C, σύμφωνα με τους Colangelo et al. (2009), και αυτό ήταν επίσης αποτέλεσμα της ιδιαίτερης εξάλειψης των χιτινασών.

Η σταθερότητα του οίνου μπορεί να βελτιωθεί με υπερδιήθηση χρησιμοποιώντας μεμβράνες με διάφορα όρια μοριακού βάρους (Ferreira et al., 2002). Αυτή η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα των μεμβρανών να διαχωρίζουν μόρια ανάλογα με το μοριακό τους βάρος, έχοντας μια αποκοπή MW που κυμαίνεται μεταξύ 1-100 kDa. Ωστόσο, η χρήση υπερδιήθησης για τη μείωση της θολότητας του λευκού οίνου έχει περιοριστεί κάπως καθώς είναι άγνωστο σε ποιο βαθμό αυτή η τεχνική μπορεί να αφαιρέσει άλλα μόρια υψηλού MW, όπως πολυσακχαρίτες που μπορεί να σχετίζονται με την ποιότητα του οίνου (Gonçalves, Fernandes, Pinho, 2001).

Η επίδραση της υπερδιήθησης στη σταθερότητα της πρωτεΐνης του οίνου έχει μελετηθεί από τους Hsu et al. (1987) χρησιμοποιώντας μεμβράνες με διάφορες αποκοπές MW, που κυμαίνονται από 10 έως 50 kDa. Η απομάκρυνση του 99% των πρωτεϊνών του οίνου απαιτούσε τη χρήση μεμβράνης με τιμές αποκοπής MW μεταξύ 10 και 30 kDa. Η μεμβράνη μπορεί να διεισδύσει από πρωτεΐνες με MW μεταξύ 12,3

και 30,0 kDa, αλλά μερικοί ερευνητές έχουν επίσης δείξει ότι η υπερδιήθηση του λευκού οίνου οδηγεί σε σημαντική μείωση της ποσότητας των συνολικών φαινολών, των αρωματικών ενώσεων και του κίτρινου χρώματος (A420), το οποίο αλλάζει τον αρωματικό χαρακτήρα του οίνου. Επιπλέον, σημειώθηκε ότι η εξάλειψη των κολλοειδών είχε ως αποτέλεσμα απώλεια στο «σώμα» και την «αίσθηση στο στόμα» (Benucci,Esti, Liburdi, 2014).

Όσον αφορά την ποιότητα του οίνου, οι Gonçaves et al. (2001) έδειξαν ότι η χρήση μιας μεμβράνης υπερδιήθησης με αποκοπή MW 100 kDa μπορεί να είναι μια επιλογή για διαύγαση οίνου. Ωστόσο, το περιεχόμενο του οίνου επηρεάζει το πόσο αποτελεσματική είναι η υπερδιήθηση. Η τεχνική υπερδιήθησης μεμβράνης είναι επίσης ανεπιθύμητη για την οινοποιία ως υποκατάστατο για την εξάλειψη του ασταθούς πρωτεϊνίου λόγω του υψηλού κόστους εξοπλισμού και λειτουργίας και, τέλος, των απωλειών αρωμάτων που συνδέονται με αυτή την παρέμβαση.

Η χρήση πρωτεασών για την υδρόλυση πρωτεϊνών οίνου (Benucci et al., 2015) μπορεί να είναι ένα ενδιαφέρον υποκατάστατο για τις τεχνικές σταθεροποίησης που αναφέρθηκαν προηγουμένως, συμπεριλαμβανομένης της χρήσης μπεντονίτη, καθώς αναμένεται ότι, σε σύγκριση, έχει τη δυνατότητα να μειώσει την απώλεια όγκου οίνου και την αφαίρεση του αρώματος που παρατηρείται στις άλλες θεραπείες. Ενώ ορισμένες πρωτεάσες, όπως η βρωμελίνη από τον ανανά (Benucci et al., 2014) και η παπαΐνη από την παπάγια (Esti et al., 2013), έχουν χρησιμοποιηθεί στον τομέα των ποτών, έχουν δοκιμαστεί για το πόσο καλά αποδοθούν τις ασταθείς στη θερμότητα πρωτεΐνες στον λευκό οίνο. Εάν η βρωμελίνη ακινητοποιήθηκε σε σφαιρίδια χιτοζάνης και χρησιμοποιήθηκε σε έναν αναδευόμενο αντιδραστήρα εργαστηριακής κλίμακας, έδειξε αποτελεσματικότητα στη διάσπαση των πρωτεϊνών σταφυλιού (περίπου 70%) τόσο στο πρότυπο διάλυμα όσο και στον οίνο (Benucci et al., 2016).

Ως αποτέλεσμα, η ακινητοποιημένη βρωμελίνη σε σφαιρίδια χιτοζάνης φαίνεται να είναι μια ενδιαφέρουσα θεραπευτική επιλογή για τον μπεντονίτη για τη σταθεροποίηση της θολότητας του λευκού οίνου. Αντίθετα, με τη βελτιστοποίηση της θερμοκρασίας και του χρόνου που απαιτείται για τη σταθεροποίηση της πρωτεΐνης του οίνου, ένας συνδυασμός θερμικής επεξεργασίας (90 C για 1 λεπτό) και εμπορικών πρωτεασών έδειξε πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα στη μείωση της συχνότητας σχηματισμού θολότητας (Marangonet al. 2014). Αυτό έγινε σε μια προσπάθεια να ελαχιστοποιηθεί

η επιζήμια επίδραση στην ποιότητα του οίνου. Σε βιομηχανική κλίμακα, η εφαρμογή πρωτεάσης με φλας παστερίωση έχει αποδειχθεί επιτυχής.

Μια άλλη μέθοδος είναι η χρήση μαγνητικών νανοσωματιδίων επικαλυμμένα με ακρυλικό οξύ. Λόγω της παρουσίας ομάδων καρβοξυλικού οξέος στην τροποποιημένη επιφάνεια, παρήχθησαν μαγνητικά νανοσωματίδια επικαλυμμένα με ακρυλικό οξύ για την επιλεκτική απομάκρυνση πρωτεϊνών που σχετίζονται με την παθογένεια από οίνους (Mierczynska-Vasilev et al., 2020). Οι πρωτεΐνες συνδέονται με την επιφανειακή επικάλυψη και μπορούν να αφαιρεθούν με μαγνήτη μόλις προστεθούν τα επικαλυμμένα μαγνητικά νανοσωματίδια σε θερμικά ασταθής οίνους. Αυτά τα σωματίδια απαιτούνταν να χορηγούνται σε συγκέντρωση 1,66% (v/v), ή 13,3 g/L, προκειμένου να είναι αποτελεσματικά στην εξάλειψη της πλειονότητας των πρωτεϊνών που είναι διαλυτές στον οίνο στα κρασιά. Το pKa της καρβοξυλικής ομάδας που υπάρχει στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων, το οποίο μπορεί να είναι εξαιρετικά κοντά στο pH του οίνου και να επηρεάζει την ικανότητα ανταλλαγής κατιόντων του, μπορεί να συνδέεται με αυτό.

Πρόσφατα, οι Mierczynska-Vasilev et al. (2020) διερεύνησαν τη δυνατότητα χρήσης αυτών των νανοσωματιδίων ξανά για αναγέννηση και διόγκωση. Όταν 10% διάλυμα SDS και νερό χρησιμοποιήθηκαν για την αναγέννηση της επιφάνειας, οι επιστήμονες επιβεβαίωσαν ότι τα επικαλυμμένα με πλάσμα μαγνητικά νανοσωματίδια διατηρούσαν σχεδόν την αρχική ικανότητα να εξαλείφουν τις πρωτεΐνες θολώματος από τους οίνους μετά από δέκα διαδοχικούς κύκλους προσρόφησης-εκρόφησης.

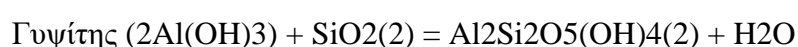
Κεφάλαιο 2

2.1 Τι είναι ο καολίνης και πώς χρησιμοποιείται στην αμπελοργία

Ο καολίνης πήρε το όνομά του από το κινεζικό βουνό Kao-ling στην επαρχία Jiangxi, της Κίνας. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε εκεί τον τρίτο αιώνα. Επιπλέον, μια ανακάλυψη στη λεκάνη του ποταμού Jarí της Βραζιλίας το 1867 οδήγησε στην πρώτη περιγραφή του ως ορυκτού είδους. Είναι ένα υποπροϊόν των καιρικών συνθηκών πολλών ορυκτών, κυρίως άστριων και μαρμαρυγιών, και υπάρχει σε μια ευρεία ποικιλία πετρωμάτων, ιζημάτων και εδαφών. Συμβαίνει σε όλες τις καιρικές συνθήκες, είτε μέσω υδροθερμικών καιρικών συνθηκών, όπως αυτή του ρυόλιθου, είτε μέσω της ίδιας της διάβρωσης. Επιπλέον, μπορεί να βρεθεί σε ιζηματογενή πετρώματα, αλλά όχι σε στρώματα που έχουν υποστεί σημαντική διαγένεση. Πρωτογενή και δευτερογενή κοιτάσματα καολίνης είναι οι δύο μεγάλες ομάδες (Χριστίδης, 2012). Οι πιο

συνηθισμένες, που έχουν περιεκτικότητα σε καολινίτη από 10% έως 60%, είναι οι εξής (Χριστίδης, 2012):

- Κοιτάσματα που προκύπτουν από χημική αποσύνθεση κυρίως πυριγενών πετρωμάτων, όπως υπολειμματικά κοιτάσματα ή εναποθέσεις από χημική αποσύνθεση. Καθώς παράγεται σε όξινο περιβάλλον και απαιτεί την απομάκρυνση των αλκαλικών μετάλλων και των αλκαλικών γαιών, η παραγωγή του καολίνη εξαρτάται από το pH της γύρω περιοχής. Επιπλέον, αποθέσεις αυτού του είδους μπορούν να παραχθούν με συνδυασμό πυριτίου με βωξίτες χρησιμοποιώντας την εξίσωση που ακολουθεί (Firew, Diriba, Delelegn, 2016).



Τα εναπομείναντα κοιτάσματα σχηματίζονται άτυπα και σπάνια είναι σημαντικά οικονομικά.

- Κοιτάσματα υδροθερμικά που περιορίζονται σε μια μικρή περιοχή και συχνά σχηματίζουν σωληνοειδείς μάζες βάθους αρκετών εκατοντάδων μέτρων. Αυτά τα κοιτάσματα συχνά περιλαμβάνουν καολινίτη που είναι κρυσταλλικός (Amany, Sameera, Abdulmoneam, 2016).

- Κοιτάσματα που βρίσκονται γύρω από θειούχες θερμές πηγές, που βρίσκονται σε περιοχές με πρόσφατη ηφαιστειακή δραστηριότητα και σχηματίζονται από υγρά πλούσια σε θείο, συχνά με τη μορφή υδρόθειου. Αυτά τα κοιτάσματα τυπικά περιλαμβάνουν θειικά ορυκτά της ομάδας αλουνίτη, οπάλιο και αποτελούν την πλειοψηφία των ελληνικών κοιτασμάτων. Τα ιζηματογενή κοιτάσματα καολίνη, τα οποία δημιουργούνται είτε με μεταφορά και εναπόθεση ως καολίνες, με τη διάβρωση των μεταφερόμενων πετρωμάτων, είτε από ένα μείγμα και των δύο, είναι παραδείγματα δευτερογενών κοιτασμάτων. Η άμμος συχνά συνοδεύει τους ιζηματογενείς καολίνες, οι οποίοι σχηματίζουν στρώσεις ή φακοειδείς αποθέσεις και βρίσκονται σε αλληλουχίες ιζηματογενών πετρωμάτων. Με χαλαζία, άστριο και μαρμαρυγία, ο καολινίτης συνυπάρχει και συχνά παίρνει τη μορφή αδρανών που μοιάζουν με σκουλήκια (Amany, Sameera, Abdulmoneam, 2016).

- Κοιτάσματα άμμου καολινίτη, που σχηματίζονται όταν ο καολινίτης μεταφέρεται και εναποτίθεται με άμμο σε ιζηματογενείς λεκάνες (Amany, Sameera, Abdulmoneam, 2016).

- Αποθέσεις σφαιρών καολινίτη αργίλου, που εμφανίζονται σε χειρσαίες λεκάνες όπως πλημμυρικές πεδιάδες ποταμών όταν μειώνονται δραστικά οι ταχύτητες του ρεύματος μεταφοράς. Προκειμένου τα πετρώματα να μετατραπούν σε καολινίτη, δημιουργούνται κάτω από κλιματικές συνθήκες με ζεστό, υγρό περιβάλλον και εποχιακές διακυμάνσεις. Μπορούν να βρεθούν σε ιζηματογενείς αλληλουχίες που περιλαμβάνουν άργιλους, λάσπες, λιγνίτες, άμμους και χαλίκια. Συνδέονται με λιγνιτικούς ορίζοντες. Αποτελούνται από καολινίτη, χαλαζία, ιλίτη και μικρές ποσότητες οργανικής ύλης που δεν κρυσταλλώνονται ελάχιστα. Πρόκειται για πολυμερείς πηλούς και όταν καίγονται υπό οξειδωτικές συνθήκες αποκτούν λευκή ή υπόλευκη απόχρωση (Amany, Sameera, Abdulmoneam, 2016).

- Πυρίμαχες αποθέσεις αργίλου, οι οποίες αποτελούνται από άργιλους, λάσπες και άμμους που τελικά μετατρέπονται σε πρακτικά καθαρή χαλαζιακή άμμο. Συνδέονται με στρώματα ανθρακούχου άνθρακα (κάρβουνα). Οι πυρίμαχοι πηλοί αποτελούνται από ασθενώς κρυσταλλοποιημένο καολινίτη, μαρμαρυγία, χαλαζία και μείγματα οξειδίων ιωνίτη και ασβεστίτη και πιστεύεται ότι αναπτύχθηκαν από τη διαγένεση αργίλων τύπου μπάλας, που ανακαλύφθηκαν σε βαθύτερα περιβάλλοντα (Amany, Sameera, Abdulmoneam, 2016).

- Κοιτάσματα αργίλου τύπου πυριτόλιθου, που είτε δημιουργούνται με επεξεργασία κοιτασμάτων καολίνη είτε από καολινιτικές αργίλους που περνούν από μέτρια μεταμόρφωση. Πρόκειται για συμπαγή, σκληρά πετρώματα που αποτελούνται κυρίως από καολινίτη και περιέχουν πολύ τριοξείδιο του αργιλίου (Al_2O_3). Μπορούν να χωριστούν σε πλαστικούς καολίνες και λεπτές καολίνες με βάση τη χημική τους σύνθεση από διοξείδιο του πυριτίου, τριοξείδιο του σιδήρου και αλκάλια. Ταξινομούνται ως πλαστικές εάν περιλαμβάνουν λιγότερο από 50% διοξείδιο του πυριτίου και λιγότερο από 1% τριοξείδιο του σιδήρου και αλκάλια, και ως λεπτές μεμβράνες εάν ισχύει το αντίστροφο (Κωστάκης, 2003).

Έχει αποδειχθεί ότι το φιλμ σωματιδίων καολίνη (KPF), μια υδατική σύνθεση χημικά αδρανών ορυκτών σωματιδίων από αργιλοπυριτικό ορυκτό ($Al_4Si_4O_{10}(OH)_8$), μπορεί να μειώσει τη ζημιά από έντομα και παθογόνα φυτών, να ανακουφίσει το καλοκαιρινό στρες (Dinisetal., 2020), να βελτιώσει τη φωτοσύνθεση (Dinisetal., 2016b) και να αυξήσει τις αποδόσεις των καλλιεργειών (GlennandPuterka, 2010). Έρευνες έχουν δείξει ότι το εναιώρημα καολίνη βελτιώνει τη φωτοσύνθεση μειώνοντας τη

θερμοκρασία και τη διαπνοή των φύλλων ενώ αυξάνει το δυναμικό νερού των φύλλων (ShellieandKing, 2013a; Dinisetal., 2018).

Επίσης, η χρήση μεμβρανών σωματιδίων Καολίνη διεγείρει τον κύριο και δευτερογενή μεταβολισμό των αμπέλων και ενισχύει την ποιότητα του καρπού (Condeetal., 2016, 2018; Dinisetal., 2016a). Ακόμη και υπό υγρές κλιματικές συνθήκες, ο καολίνης μπορεί να εφαρμοστεί στα σταφύλια για να αυξήσει τις ποσότητες δευτερογενών μεταβολιτών, σύμφωνα με παλαιότερη μελέτη (Wangetal., 2020).

Μετά τον ψεκασμό, η επιφάνεια του φυτού έχει συχνά ένα μουντό λευκό κάλυμμα που εμποδίζει το νερό και τα παθογόνα να έρθουν σε άμεση επαφή με την επιφάνεια του φύλλου (Walters, 2006). Λόγω της απουσίας χημικά δραστικών συστατικών, η εφαρμογή καολίνης είναι μοναδική στο ότι είναι οικολογικά ασφαλής και μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης ανθεκτικότητας ασθενειών και εντόμων (Sharmaetal., 2015).

Ο καολίνης μπορεί επομένως να χρησιμοποιηθεί ως μακροπρόθεσμη προσέγγιση θεραπείας ασθενειών. Ωστόσο, δεν έχει γίνει καμία έρευνα σχετικά με την εφαρμογή του ως βιώσιμης στρατηγικής ελέγχου για τον περονόσπορο αμπέλου, με εξαίρεση μόνο μία μελέτη για τον έλεγχο του περονόσπορου αγγουριού (Haggag, 2002).

Κεφάλαιο 3

3.1 Τι είναι ο μπεντονίτης και πώς χρησιμοποιείται στην οινοποιία

Η οινοποιία χρησιμοποιεί συχνά διόγκωση μπεντονίτη, μια μέθοδο διαύγασης, για να απαλλαγεί από πρωτεΐνες που μπορεί να είναι η αιτία της θολότητας του οίνου (Ferreiraetal. 2002; Ribéreau-Gayonet al. 2000). Λόγω του καθαρού αρνητικού φορτίου του στο pH του οίνου, ο μπεντονίτης αλληλεπιδρά ηλεκτροστατικά με θετικά φορτισμένες πρωτεΐνες οίνου και προκαλεί κροκίδωση (HsuandHeatherbell 1987). Η κύρια αιτία των ικανοτήτων προσρόφησης του μπεντονίτη στον οίνο είναι η δραστηριότητα ανταλλαγής κατιόντων. Ορισμένα ιόντα Al^{3+} σε οκταεδρικές θέσεις εκτοπίζονται από τα Mg^{2+} , Fe^{2+} και Fe^{3+} στη δομή του μοντοριλλονίτη (ο μπεντονίτης αποτελείται κυρίως από αυτόν τον διοκταεδρικό σμηκτίτη), με αποτέλεσμα ανισορροπίες φορτίου (Brindley, 1984). Τα ανταλλάξιμα κατιόντα που βρίσκονται στον ενδιάμεσο χώρο ή στο εξωτερικό των σωματιδίων αργίλου βοηθούν να εξουδετερωθεί εν μέρει αυτό το αρνητικό φορτίο. Τα Ca^{2+} , Na^{+} και Mg^{2+} αποτελούν την πλειονότητα αυτών των κατιόντων, ωστόσο επιπλέον κατιόντα μπορεί να βρεθούν σε ίχνη. Η ενεργοποίηση, η οποία χρησιμοποιείται συχνά σε φυσικούς μπεντονίτες Ca (υψηλή αναλογία Ca^{2+}/Na^{+}), μπορεί να αλλάξει τη χημεία του

μπεντονίτη. Η διαδικασία ενεργοποίησης θερμαίνει υγρή λάσπη με στερεό Na_2CO_3 στους 80 βαθμούς Κελσίου για να μιμηθεί τα χαρακτηριστικά των φυσικών μπεντονιτών Na (υψηλή αναλογία $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$), που έχουν ισχυρότερη συγγένεια με την πρωτεΐνη (Bladeand Boulton 1988). Ο ρόλος των ανταλλάξιμων κατιόντων στους μπεντονίτες καθορίζει την ταξινόμησή τους (μπεντονίτης Na, μπεντονίτης Ca). Αυτά τα εναλλάξιμα κατιόντα επηρεάζουν την απόσταση μεταξύ των στρωμάτων του μπεντονίτη και τα χαρακτηριστικά διόγκωσής του, η οποία ρυθμίζει την παρεμβολή του νερού στα εσωτερικά στρώματα (Catarinoetal., 2008).

Ο μπεντονίτης εξαλείφει επιπλέον φορτισμένα είδη ή συσσωματώματα εκτός από τις πρωτεΐνες. Εξαιτίας αυτού, η προσθήκη πολλών μπεντονίτη στους οίνους μπορεί να μειώσει τις αισθητηριακές τους ιδιότητες παραλείποντας τα βασικά συστατικά του αρώματος και της γεύσης (Ribéreau-Gayonet al., 2000 ;Voilleyetal., 1990). Πιστεύεται ότι υπάρχουν περισσότερα από 800 πτητικά μόρια αρώματος στον οίνο. Αυτές οι ενώσεις μπορούν να προέρχονται άμεσα ή έμμεσα από χημικές ουσίες στα αρχικά σταφύλια με χημικούς, ενζυμικούς ή θερμικούς μηχανισμούς. Άλλα προκύπτουν από το μεταβολισμό της ζύμης ή δημιουργούνται μέσω των περίπλοκων διαδικασιών οξείδωσης/αναγωγής που συμβαίνουν με την ηλικία. Οι ενώσεις που έχουν ποικιλία πολικότητας, διαλυτότητας και πτητικότητας περιλαμβάνονται στην κατηγορία των πτητικών οίνων. Αποτελούνται από φαινολικές και θειούχες χημικές ουσίες, καθώς και από αλκοόλες, εστέρες, αλδεΐδες, κετόνες και μονοτερπένια (Ribéreau-Gayonet al., 2000).

Σύμφωνα με τους Guichard (2006) και τους Langourieux και Crouzet (1997), οι αρωματικές ενώσεις αλληλεπιδρούν με μια ποικιλία μακρομορίων, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών και των πολυσακχαριτών. Ως αποτέλεσμα, οι παράγοντες διόγκωσης μπορεί να στερεώσουν υλικά που χρησιμεύουν ως στηρίγματα αρωματικών συστατικών (Lubbersetal., 1993). Αν και η σχέση μεταξύ του μπεντονίτη και των πρωτεϊνών του οίνου έχει ερευνηθεί εκτενώς (Achaerandioetal., 2001; deBruijnet al., 2009; Martinez-RodriguezandPolo, 2003; Salazar, 2006); και ορισμένες αλληλεπιδράσεις μεταξύ αρωματικών ενώσεων και μακρομορίων έχουν δειχθεί σε διαλύματα μοντέλων (Damodaran και Kinsella, 1980). Οι πρακτικές διαγύασης/σταθεροποίησης έχουν αποδειχθεί ότι επηρεάζουν την αισθητική ποιότητα, το άρωμα και τη γεύση του οίνου (Martinez-Rodriguez και Polo, 2003;ArmadaandFalque, 2007;Cabarogluet al., 2003;Moioetal., 2004;Pozoetal. 2003).

Στον οίνο, που περιέχει πρωτεΐνες από το σταφύλι και τη μαγιά, οι δραστικές για την οσμική ουσίες αλληλεπιδρούν με τον μπεντονίτη.

ΜΕΡΟΣ Β΄ - ΈΡΕΥΝΑ

Κεφάλαιο 4

Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της εργασίας είναι μέσω του πειράματος να διαπιστωθεί αν ο καολίνης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υποκατάστατο του μπεντονίτη ή και σε συνεργασία με αυτόν και σε ποιο βαθμό επιτυχίας ώστε να επιτευχθεί η πρωτεϊνική σταθεροποίηση λευκών και ροζέ οίνων. Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν δυο διαφορετικές μέθοδοι 1) το test θέρμανσης(bentotest) και 2) το test προσθήκης ταννινών (Proteotest της εταιρίας Vason).

Κεφάλαιο 5

Μέθοδος – Πειραματικός σχεδιασμός

Έγιναν δυο τεστ α)θέρμανσης και β) bentotest σε 2 λευκούς(Κτήμα Γεροβασιλείου λευκό του 2021 και Κτήμα Γεροβασιλείου Μαλαγουζιά του 2021 και 1 ροζέ οίνο(Κτήμα Γεροβασιλείου Ξινόμαυρο ροζέ) και τα τεστ έτρεξαν στις 8 παρακάτω συνθήκες :

- 1) Μάρτηρας (καμία προσθήκη)
- 2) Οίνος + Καολίνη 50 g/hl
- 3) Οίνος + Καολίνη 100 g/hl
- 4) Οίνος + Καολίνη 500g/hl
- 5) Οίνος + Μπεντονίτης 50 g/hl
- 6) Οίνος + Μπεντονίτης 100 g/hl
- 7) Οίνος + Μπεντονίτης 120 g/hl
- 8) Οίνος + Καολίνη 50 g/hl + Μπεντονίτης 50 g/hl

Οι δοκιμές έγιναν σε 1 lit οίνου / συνθήκη

Για το τεστ Θέρμανσης

Στον ζυγό ζυγίστηκε η ποσότητα καολίνη ή μπεντονίτη που χρησιμοποιήθηκε για την πειραματική διαδικασία. Σε ογκομετρική φιάλη 1000ml αναμίχθηκε αυτή η ποσότητα με 1 lt οίνου και αφέθηκε για 24 ώρες μέχρι την πλήρη καταβύθιση του ιζήματος μπεντονίτη ή/και καολίνη. Διαχωρίστηκαν προσεκτικά 200 ml οίνου με σιφόνι σε κωνική φιάλη 500 ml. Στη συνέχεια, ο οίνος πέρασε από 3 φίλτρα. Το φιλτραρισμένο κρασί μοιράστηκε σε 12 φιαλίδια των 12 ml και ακολούθησε φυγοκέντριση για 27

λεπτά στις 4.000 rpm και μετά για άλλα 6 λεπτά επιπλέον. Μετά, μεταφέρθηκε με μικροπιπέτα ο οίνος από τα φιαλίδια σε κωνική φιάλη των 500 ml με προσοχή αφήνοντας το ίζημα στον πάτο του φιαλιδίου. Πάρθηκε η πρώτη μέτρηση (T_1) με θολερόμετρο (NTU) και μεταφέρθηκε με σιφόνι των 50 ml σε ποτήρι ζέσεως μια ποσότητα οίνου για το Bentotest. Η κωνική φιάλη με τον υπόλοιπο οίνο θερμάνθηκε σε υδατόλουτρο για 30 λεπτά στους 85 °C. Με τη ολοκλήρωση των τριάντα λεπτών, η φιάλη απομακρύνθηκε από το υδατόλουτρο και αφήθηκε να κρυώσει για 50 λεπτά. Προς το τέλος των 50 λεπτών τοποθετήθηκε η κωνική φιάλη σε παγωμένο νερό για να κατέβει στους 20 °C ελέγχοντας τη θερμοκρασία με θερμομέτρο. Μόλις έφτασε στους 20 °C πάρθηκε η δεύτερη μέτρηση (T_2) με θολερόμετρο (NTU). Κάθε μέτρηση T_1 και T_2 με το θολερόμετρο και για το τεστ θέρμανσης αλλά και για το Proteotest επαναλήφθηκε 10 φορές και βγήκε ο μέσος όρος για την τελική μέτρηση. Η υπόθεση του πειράματος ήταν αν $T_1 - T_2 > 2$ τότε ο οίνος θεωρείται πρωτεϊνικά ασταθής.

Για το τεστ Bentotest

Για την παρασκευή του αντιδραστηρίου προστέθηκαν 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος στο σωληνάκι με τις τανίνες μέχρι τη σημειωμένη γραμμή και ανακινήθηκε μέχρι την πλήρη διάλυση. Κρατώντας την πρώτη μέτρηση (T_1) με θολερόμετρο μετά την φυγοκέντρωση προστέθηκαν στα 50 ml οίνου που είχαν κρατηθεί, 1,25 ml του διαλύματος του αντιδραστηρίου με σύριγγα που τοποθετήθηκε στο στόμιο του φίλτρο σε PVDF 0.45μm (t). Ανακινήθηκε και αφήθηκε για πέντε λεπτά, απαιτούμενο χρόνο για την αντίδραση. Μετά τα 5 λεπτά ξαναμετρήθηκε η (T_2) θολερότητα (NTU). Η υπόθεση του πειράματος ήταν αν $T_2 - T_1 > 15$ NTU τότε ο οίνος είναι ασταθής. Η διαδικασία του τεστ θέρμανσης και του Bentotest επαναλήφθηκε για όλες τις διαφορετικές ποσότητες μπεντονίτη ή/και καολίνης.

Σημειωτών, στο ροζέ κρασί για τη χρονιά του 2021 προστέθηκαν 50 gr/hl Μπεντονίτη πριν την αλκοολική ζύμωση για να τραβήξει το χρώμα. Επίσης, στη γευστική δοκιμή ο καολίνης σε οποιαδήποτε ποσότητα δεν επηρέασε τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου.

Υλικά

Τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή του πειράματος ήταν ογκομετρικές φιάλες 1000ml, σιφόνια, κωνικές φιάλες 500ml με φίλτρα, 12 φιαλίδια

για τη φυγόκεντρο, φυγόκεντρος, μικροπιπέτες, θολερόμετρο, υδατόλουτρο, θερμομέτρο, ζυγός, ποτήρι ζέσεως, σύριγγα, και φίλτρο σύριγγας σε PVDF 0,45 µm.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μπεντονίτης, καολίνης, Bentotest kit της Vason με α) ρυθμιστικό διάλυμα και β)φιαλίδιο με τανίνες σε σκόνη.

Κεφάλαιο 6

Αποτελέσματα

Στο πείραμα που διεξήχθη στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας, έγιναν δυο τεστ α)θέρμανσης και β)bentotest σε 2 λευκούς(Κτήμα Γεροβασιλείου λευκό του 2021 και Κτήμα Γεροβασιλείου Μαλαγουζιά του 2021 και 1 ροζέ οίνο (Κτήμα Γεροβασιλείου Ξινόμαυρο ροζέ) και τα τεστ έτρεξαν υπό 8 συνθήκες. Με μάρτηρα, χωρίς καμία προσθήκη, με οίνο και προσθήκη Καολίνη 50 g/hl, με οίνο και προσθήκηΚαολίνη 100 g/hl, με οίνο και προσθήκη Καολίνη 500 g/hl, με οίνο και προσθήκη Μπεντονίτη 50 g/hl, με οίνο και προσθήκη Μπεντονίτη100 g/hl, με οίνο και προσθήκη Μπεντονίτη120 g/hl και με οίνο και προσθήκη Καολίνη 50 g/hl και μπεντονίτη 50 g/hl. Οι δοκιμές έγιναν σε 1 lit οίνου / συνθήκη.

Στο PROTOTEST σε Ασύρτικο, η εφαρμογή του καολίνη έδειξε να έχει μια μικρή θετική επίδραση απέναντι στην πρωτεϊνική αστάθεια. Στο TEST Θέρμανσης, η εφαρμογή του καολίνη δε φαίνεται να έχει καμία θετική επίδραση απέναντι στην πρωτεϊνική αστάθεια. Στο PROTOTEST στη Μαλαγουζιά, η εφαρμογή του καολίνη έδειξε να έχει μια μικρή θετική επίδραση απέναντι στην πρωτεϊνική αστάθεια. Στο TEST Θέρμανσης, η εφαρμογή του του καολίνη έδειξε να έχει σημαντική θετική επίδραση απέναντι στην πρωτεϊνική αστάθεια, οριακά συγκρίσιμη με αυτή του μπεντονίτη. Στο PROTOTEST του Ξινόμαυρου, η εφαρμογή του καολίνη έδειξε να έχει θετική επίδραση απέναντι στην πρωτεϊνική αστάθεια, όχι όμως στα επίπεδα του μπεντονίτη. Στο TEST Θέρμανσης, η εφαρμογή του καολίνη έδειξε να έχει σημαντική θετική επίδραση απέναντι στην πρωτεϊνική αστάθεια, οριακά συγκρίσιμη με αυτή του μπεντονίτη, με τη σημείωση ότι ο οίνος ήταν πρωτεϊνικά σταθεροποιημένος από τον μάρτυρα.

Συμπερασματικά, και οι δύο ουσίες, ο μπεντονίτης και ο καολίνης, χρησιμοποιούνται για την πρωτεϊνική σταθερότητα των λευκών και ροζέ οίνων. Ο μπεντονίτης είναι ένας φυσικός άργιλος που απορροφά τις πρωτεΐνες και άλλες ανεπιθύμητες ουσίες από τον

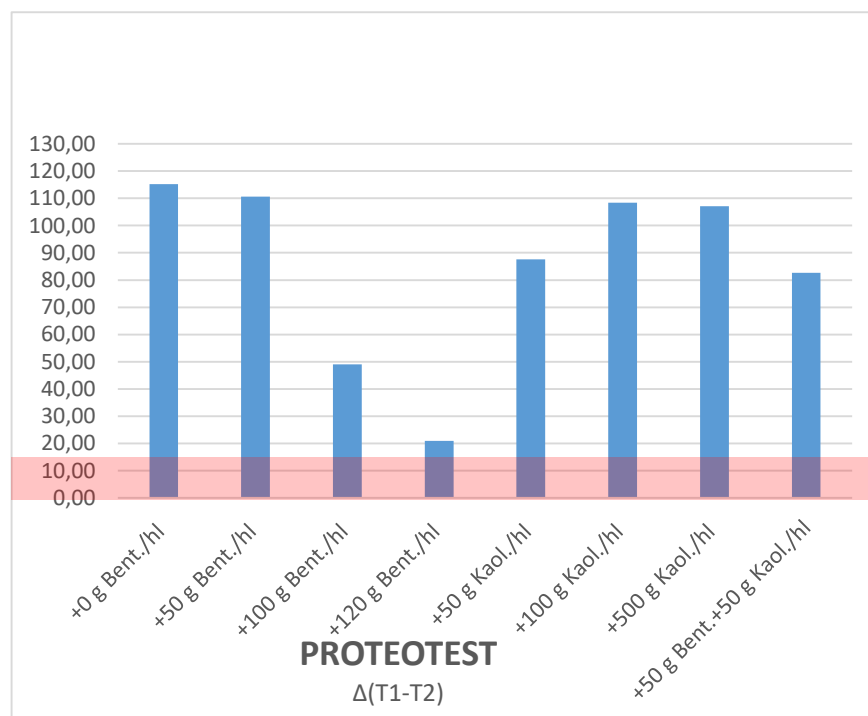
οίνο, ενώ ο καολίνης είναι επίσης ένας άργιλος που χρησιμοποιείται στην αμπελουργία. Ο μπεντονίτης είναι συνήθως πιο αποτελεσματικός στην απομάκρυνση των πρωτεϊνών, αλλά μπορεί να αλλοιώσει και τη γεύση του οίνου. Ο καολίνης δεν επηρεάζει τη γεύση του οίνου, αλλά είναι λιγότερο αποτελεσματικός στην απομάκρυνση των πρωτεϊνών. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η χρήση μπεντονίτη ή καολίνη για πρωτεϊνική σταθερότητα των λευκών οίνων είναι μια κοινή πρακτική στην οινοπαραγωγή και έχει ως στόχο τη βελτίωση της ποιότητας του προϊόντος (Σουφλερός, 2000).

Πιο συγκεκριμένα, στην περίπτωση του Ασύρτικου-Μαλαγουζιάς, όσον αφορά το PROTOTEST, η εφαρμογή του καολίνη φαίνεται να έχει μια μικρή θετική επίδραση απέναντι στην πρωτεϊνική αστάθεια. Ενδιαφέρον έχει η προσθήκη των 50 g/hl Kaolin, είτε μόνος του είτε συνδυαστικά με τον μπεντονίτη.

Πίνακας 1. PROTEOTEST Ασύρτικου-Μαλαγουζιάς

T2
116,60
112,00
50,12
22,20
88,6
109,9
108,4
83,62

T2
9,84
5,71
2,05
1,76
11,14
10,93
10,1
6,17



Στην περίπτωση του Ασύρτικου, όσον αφορά το TEST Θέρμανσης, η εφαρμογή του καολίνη δε φαίνεται να έχει καμία θετική επίδραση απέναντι στην πρωτεϊνική αστάθεια.

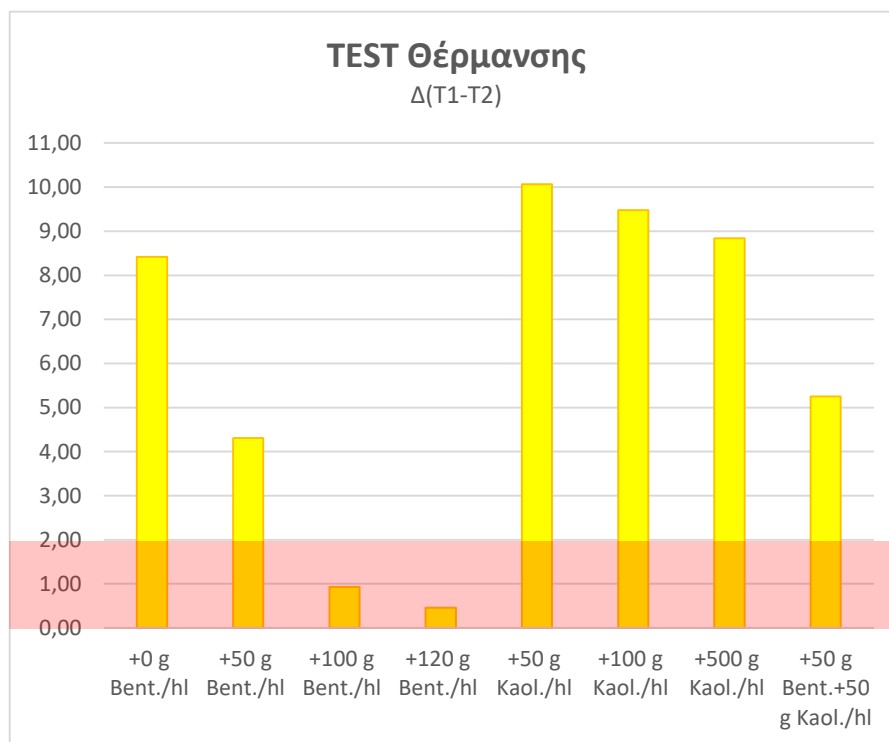
Πίνακας 2. Test θέρμανσης Ασύρτικου

T2

116,60
112,00
50,12
22,20
88,6
109,9
108,4
83,62

T2

9,84
5,71
2,05
1,76
11,14
10,93
10,1
6,17



Στην περίπτωση της Μαλαγουζιά, όσον αφορά το PROTOTEST, η εφαρμογή του καολίνη φαίνεται να έχει μια μικρή θετική επίδραση απέναντι στην πρωτεϊνική αστάθεια.

Πίνακας 3. PROTEOTEST Μαλαγουζιά

T2
129,20
52,25
30,60
15,70
112,7
110,2
53,9
74,5

T2
4,20
3,61
2,49
2,30
3,53
3,1
3,39
2,44

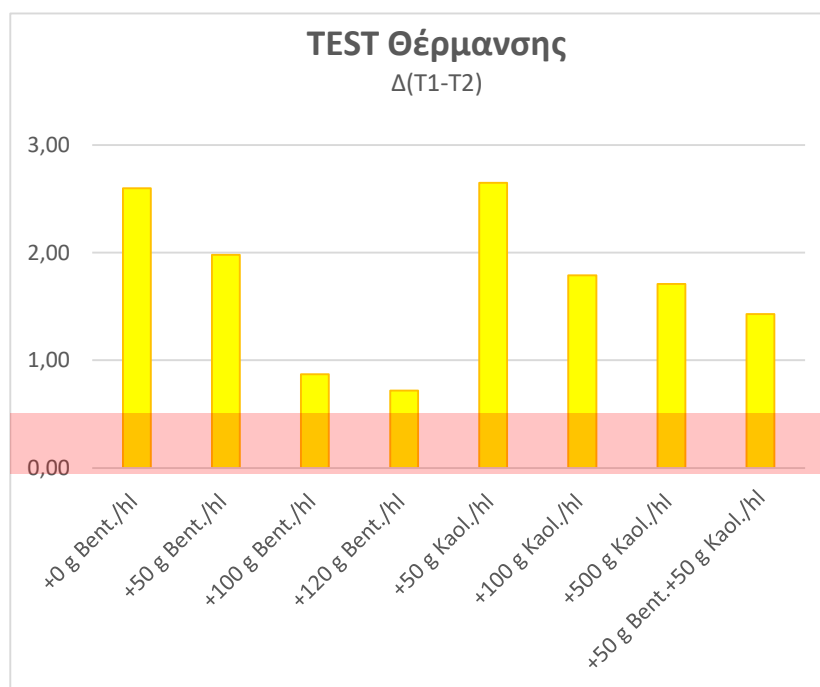


Στην περίπτωση της Μαλαγουζιά, όσον αφορά το TEST Θέρμανσης, η εφαρμογή του του καολίνη φαίνεται να έχει σημαντική θετική επίδραση απέναντι στην πρωτεϊνική αστάθεια, οριακά συγκρίσιμη με αυτή του μπεντονίτη.

Πίνακας 4. TEST Θέρμανσης Μαλαγουζιά

T2
129,20
52,25
30,60
15,70
112,7
110,2
53,9
74,5

T2
4,20
3,61
2,49
2,30
3,53
3,1
3,39
2,44



Στην
περίπτωση
Εινόμαυρου,
όσον αφορά

του

το

PROTEOTEST, η εφαρμογή του καολίνη φαίνεται να έχει θετική επίδραση απέναντι στην πρωτεϊνική αστάθεια,όχι όμως στα επίπεδα του μπεντονίτη. Κύριο ρόλο, βέβαια, παίζουν και οι πολυφαινόλες καθώς πρόκειται για ροζέ οίνο.

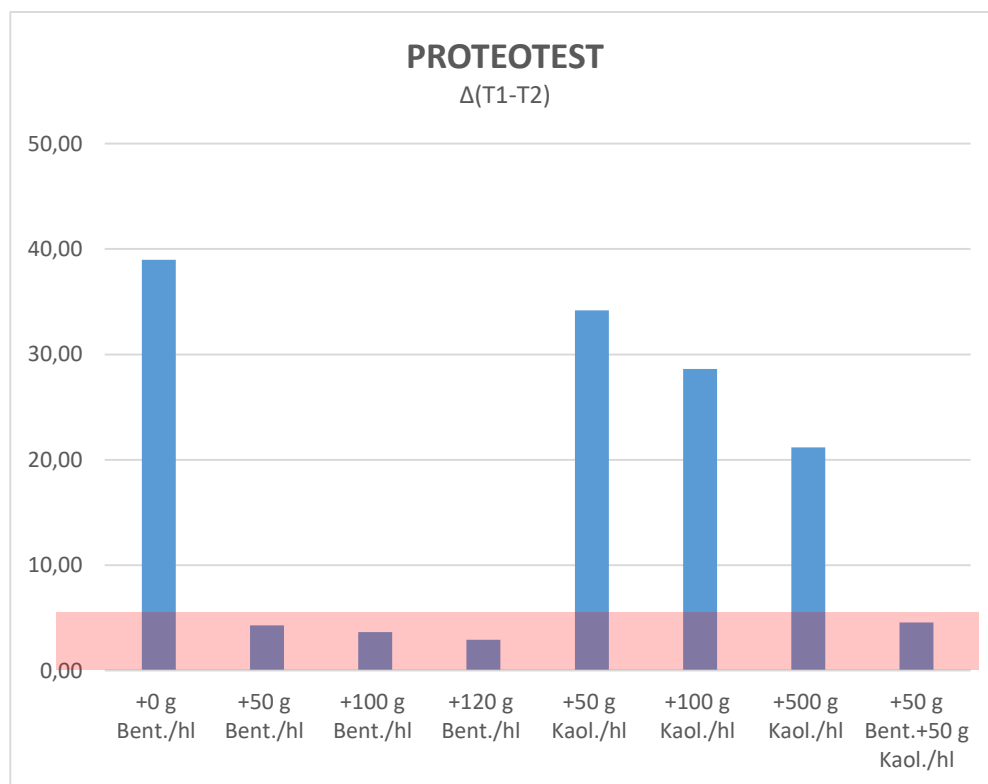
Πίνακας 5. PROTEOTEST Ξινόμαυρου

T2

40,08
5,20
4,48
3,95
35,01
29,8
21,95
5,85

T2

2,37
1,50
1,70
1,27
2,02
2,29
1,46
1,49

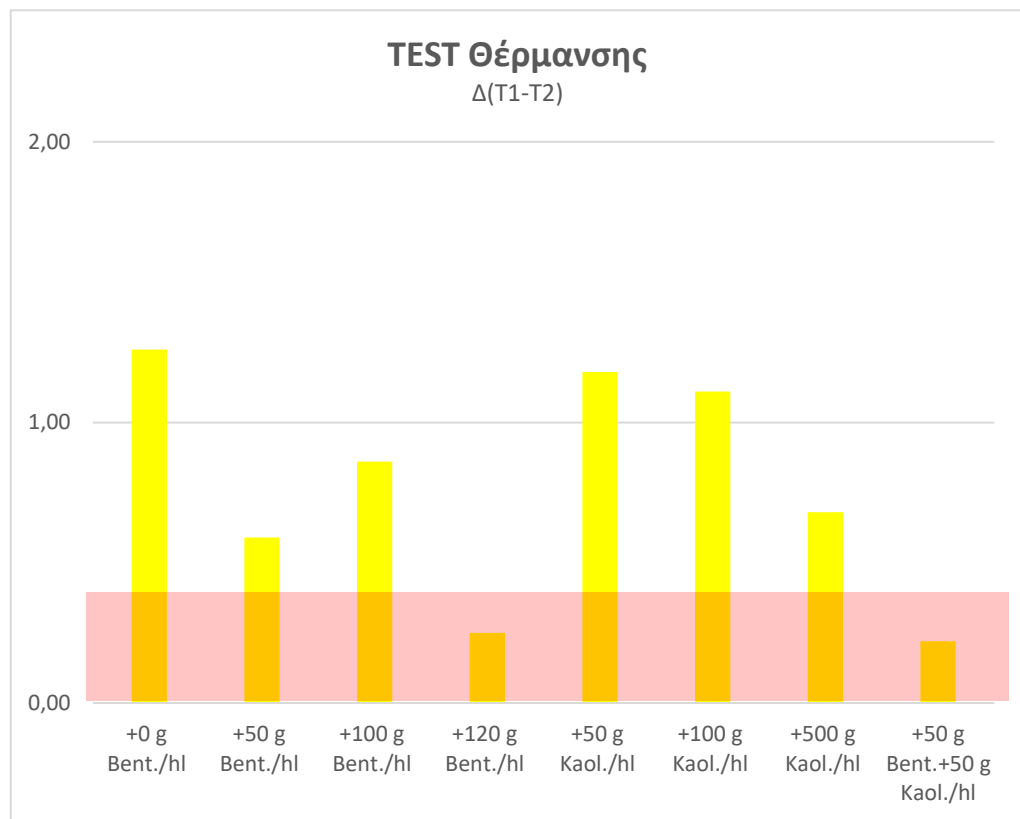


Στην περίπτωση του Ξινόμαυρου, όσον αφορά το TEST Θέρμανσης, η εφαρμογή του καολίνη φαίνεται να έχει σημαντική θετική επίδραση απέναντι στην πρωτεϊνική αστάθεια, οριακά συγκρίσιμη με αυτή του μπεντονίτη, με τη σημείωση ότι ο οίνος ήταν πρωτεϊνικά σταθεροποιημένος από τον μάρτυρα.

Πίνακας 6. TEST θέρμανσης Ξινόμαυρου

T2
40,08
5,20
4,48
3,95
35,01
29,8
21,95
5,85

T2
2,37
1,50
1,70
1,27
2,02
2,29
1,46
1,49



*****Σε όλα τα διαγράμματα η μονάδα μέτρησης στον άξονα των ψ είναι σε NTU**

Κεφάλαιο 7

7.1 Συζήτηση - Συμπεράσματα

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία μελετήθηκε η πρωτεϊνική σταθερότητα στους λευκούς οίνους με στόχο να διαπιστωθεί αν ο καολίνης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υποκατάστατο του μπεντονίτη ή και σε συνεργασία με αυτόν και σε ποιο βαθμό επιτυχίας ώστε να επιτευχθεί η πρωτεϊνική σταθεροποίηση λευκών και ροζέ οίνων.

Η σταθερότητα είναι μια υποκειμενική ισορροπία που περιγράφει πώς ένας οίνος θα αντέξει κάτω από ελεγχόμενες ρυθμίσεις με την πάροδο του χρόνου. Οι σταθεροποιημένοι οίνοι είναι λιγότερο πιθανό να υποστούν δυσμενείς αλλαγές στην εμφάνιση ή τη γεύση από τη στιγμή που εμφιαλώνονται μέχρι την κατανάλωσή τους.

Είναι δύσκολο να αναπτύξει κανείς απόλυτες δοκιμές, καθώς είναι αδύνατο για έναν οινοποιό να γνωρίζει πόσο καιρό θα διαρκέσει το προϊόν του στην αγορά και να προβλέψει όλες τις μεταβλητές που θα αντιμετωπίσει ο οίνος σε βάθος χρόνου. Οι οίνοι

είναι εμφανώς δύσκολο να προβλεφθούν, αν και έχουν επινοηθεί δοκιμές σταθερότητας που μπορούν να το κάνουν υπό τυπικές συνθήκες αποθήκευσης (Τσέτουρας, 2008).

Η σύνδεση με ορισμένες χημικές ουσίες μπορεί μερικές φορές να παρέχει σταθερότητα. Αυτό μειώνει τη συγκέντρωση των ασταθών χημικών ουσιών σε ένα ασφαλές επίπεδο, όπου δεν θα προκαλέσουν θολώσεις ή ιζήματα στο κρασί και μπορεί να παραμείνουν για όλη τη διάρκεια ζωής του. Τα αποτελέσματα της δοκιμής θα υπαγορεύσουν τα βήματα που πρέπει να γίνουν εάν διαπιστωθεί ότι ο οίνος είναι ασταθής. Η διαδικασία σταθεροποίησης μπορεί να αλλάξει τις οργανοληπτικές ιδιότητες του οίνου. Έτσι, η επαλήθευση της σταθερότητας του οτιδήποτε περιλαμβάνει ένα κρίσιμο βήμα: τη δοκιμή του (Τσέτουρας, 2008).

Οι δοκιμές σταθερότητας πραγματοποιούνται πριν από την εμφιάλωση λόγω των διακυμάνσεων της θερμοκρασίας και του pH που εμφανίζονται κατά την οινοποίηση. Οι δοκιμές κολάρου και σταθερότητας χρειάζονται τη χρήση αντιδραστηρίων που πρέπει να αντιμετωπίζονται με μεγάλη προσοχή λόγω της ευαισθησίας τους. Η σταθερότητα των πρωτεϊνών, του τρυγικού, της οξειδωσης, του χρώματος και των μετάλλων μπορεί όλα να προβλεφθούν με τη χρήση πολλών δοκιμών (Σουφλερός, 2000).

Υπάρχει μια ποικιλία μεθόδων για τον προσδιορισμό του εάν οι πρωτεΐνες του οίνου έχουν αποικοδομηθεί ή όχι. Όλες αυτές οι διαδικασίες περιλαμβάνουν τη μετουσίωση των πρωτεϊνών με κάποιο τρόπο, είτε με θερμότητα, είτε με οξύ είτε με αλκοόλ. Αυτές οι εξετάσεις διεξάγονται πάντα παράλληλα με τις εξετάσεις του κολάρου μεντονίτη. Άλλες ουσίες, όπως οι τανίνες και οι πολυσακχαρίτες, μπορεί να επηρεάσουν τον βαθμό ανάπτυξης θολότητας κατά τη διάρκεια της δοκιμής θέρμανσης, επομένως μπορεί να μην περιλαμβάνουν καν πρωτεΐνες. Ωστόσο, οι δοκιμές μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως οδηγός για τον προσδιορισμό της έκτασης ενός πιθανού ζητήματος σταθερότητας πρωτεΐνης, δεδομένου ότι βασίζονται σε προηγούμενη εμπειρία (Σουφλερός, 2000).

Το τεστ θερμικής σταθερότητας χρησιμοποιείται ευρέως και προτείνεται ως αξιόπιστος δείκτης της σταθερότητας της πρωτεΐνης ενός οίνου. Η ανάπτυξη θολότητας μπορεί να ελεγχθεί υποβάλλοντας τον οίνο σε υψηλές θερμοκρασίες για μεγάλο χρονικό διάστημα και στη συνέχεια αφήνοντάς το να πέσει σε θερμοκρασία δωματίου.

Πριν από τη διεξαγωγή της δοκιμής, ο οίνος πρέπει να φιλτραριστεί για να αφαιρεθεί τυχόν ίζημα. Το κρασί μπορεί να φιλτραριστεί ή να φυγοκεντρηθεί για να γίνει αυτό. Πρέπει πρώτα να προσδιοριστεί τη ποσότητα του οίνου που θα χρειαστεί να φυγοκεντρηθεί ή να φιλτραριστεί, λαμβάνοντας υπόψη το μέγεθος των δοκιμαστικών σωλήνων που θα χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό της θολότητας. Συνήθως, 20 έως 30 mL οίνου είναι το μόνο που απαιτείται. Αρχικά, ο οίνος φυγοκεντρείται στις 3500 rpm για περίπου 10 λεπτά για να αφαιρεθεί τυχόν ίζημα. Έπειτα, χρησιμοποιώντας είτε μια σύριγγα είτε μια συσκευή διήθησης κενού, το δείγμα διηθείται μέσω ενός φίλτρου μεμβράνης με μέγεθος πόρων 0,45 μ. Ενδέχεται να απαιτείται προφίλτρο με μεγαλύτερο πορώδες εάν ο οίνος είναι πολύ μουντός. Θα πρέπει να αποφεύγονται τα φίλτρα που βοηθούν στην ανάπτυξη θολώματος. Το πρώτο χλιοστόλιτρο του διηθήματος πετιέται (Σουφλερός, 2000).

Κατόπιν, χρησιμοποιείται δοκιμαστικός σωλήνας κατάλληλου μεγέθους για να συγκρατεί ο φιλτραρισμένος οίνος. Αυτό σημαίνει ότι πρέπει να υπάρχει λίγος χώρος πάνω από το δείγμα προκειμένου ο οίνος να διαστέλλεται καθώς ζεσταίνεται. Ο όγκος του οίνου δεν θα αλλάξει λόγω της εξάτμισης και ο σωλήνας θα κρατήσει έξω τυχόν ατμούς ή νερό από ένα λουτρό νερού. Για τα βύσματα πρέπει να χρησιμοποιείται PTFE ή σιλικόνη. Ένα θολερόμετρο χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του επιπέδου θολότητας. Για τις επόμενες έξι ώρες, ο σωλήνας θερμαίνεται στους 80 βαθμούς Κελσίου σε υδατόλουτρο ή άλλο κατάλληλο θερμαντικό μέσο. Αφού περάσει ο καθορισμένος χρόνος, ο σωλήνας αφαιρείται από το λουτρό νερού ή από την πηγή θέρμανσης. Μετά, ο σωλήνας αφήνεται να κρυώσει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ενώ στροβιλίζεται απαλά αρκετές φορές. Η διαδικασία ψύξης μπορεί να επιταχυνθεί βυθίζοντας το σωλήνα σε λουτρό νερού σε θερμοκρασία δωματίου. Η διαδικασία της ανάμειξης επαναλαμβάνεται. Το επίπεδο θολότητας αξιολογείται οπτικά ή/και χρησιμοποιώντας θολερόμετρο (Κοτσερίδης, Καλλίθρακα, Προξενιά, 2012).

Με την τοποθέτηση φωτός στο δοκιμαστικό σωλήνα, μπορεί να ανιχνευθεί θολότητα. Το θόλωμα είναι παρών εάν υπάρχει κάποια εσωτερική ενατένιση. Μια ισχυρή πηγή φωτισμού είναι ο μικρός λαμπτήρας ή το στυλό. Εάν χρησιμοποιηθεί θολερόμετρο, συνιστάται η συλλογή μετρήσεων τόσο πριν όσο και μετά τη θέρμανση κάθε δείγματος. Για να αποφευχθεί η μόλυνση, θα πρέπει το εξωτερικό του σωλήνα μέτρησης να είναι στεγνό πριν τοποθετηθεί στη συσκευή. Μετά από αυτό, η ανάγνωση καταγράφεται. Εάν η θολότητα του οίνου αυξάνεται κατά περισσότερες από 2 μονάδες θολότητας (NTU)

όταν θερμαίνεται, ο οίνος θεωρείται ασταθής σε πρωτεΐνη. Μερικές φορές χρησιμοποιείται ένα όριο θολώματος 1 ή ακόμα και 0,5. Αυτές οι εκτιμήσεις βασίζονται σε ιστορικά δεδομένα και τον βαθμό θολότητας που θεωρείται αποδεκτός για τον οίνο που αποθηκεύεται (Κοτσερίδης, Καλλίθρακα, Προξενιά, 2012).

Ωστόσο, υπάρχουν διάφορες προτάσεις για περαιτέρω έρευνα σχετικά με την πρωτεϊνική σταθερότητα των λευκών οίνων. Θα μπορούσε να μελετηθεί η επίδραση της πρωτεΐνης στη γεύση και την αρωματική πολυπλοκότητα των λευκών οίνων, να εξεταστεί η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια της χρήσης διαφόρων απορροφητικών υλικών για την πρωτεϊνική σταθερότητα των λευκών οίνων, να διερευνηθεί η επίδραση των διαφόρων τεχνικών επεξεργασίας στην πρωτεϊνική σταθερότητα των λευκών οίνων. Θα μπορούσε επίσης, να γίνει μελέτη της επίδρασης του χρόνου αποθήκευσης στην πρωτεϊνική σταθερότητα των λευκών οίνων ή της επίδρασης της πρωτεΐνης στην ευστάθεια του οίνου κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. Αυτές οι ερευνητικές εργασίες μπορούν να βοηθήσουν στην καλύτερη κατανόηση της πρωτεϊνικής σταθερότητας των λευκών οίνων και στη βελτίωση της ποιότητας του προϊόντος (Τσέτουρας, 2008).

Βιβλιογραφικές Αναφορές

- Κοτσερίδης Γ., Καλλίθρακα Σ., Προξενιά Ν. (2012). Εργαστηριακές Ασκήσεις. Οινολογία Ι & ΙΙ. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων. Αθήνα.
- Κωστάκης, Γ. (2005). *Γενική Ορυκτολογία*. Πολυτεχνείο Κρήτης, Τμήμα Μηχανικών Ορυκτών Πόρων, Χανιά.
- Σουφλερός Ε. Η. (2000). Οινολογία, Επιστήμη και τεχνογνωσία, Τόμος 1 & 2, Θεσσαλονίκη.
- Τσέτουρας, Π. (2008). Οινότεχνία. Η επιστήμη του κρασιού στην πράξη, Αθήνα, εκδόσεις Σταμούλη Α.Ε.
- Χρηστίδης Γ. (2012). *Κοιτασματολογία ΙΙ*, Πολυτεχνείο Κρήτης, Τμήμα Μηχανικών Ορυκτών Πόρων, Χανιά.
- Achaerandio, I., V. Pachova, C. Güell, and F. López. (2001). Protein adsorption by bentonite in a white wine model solution: Effect of protein molecular weight and ethanol concentration. *Am. J. Enol.Vitic.* 52:122-126.
- Amany, S. A. E., Sameera, O. B., Abdulmoneam, A.T. (2016). Effect of Chemical, Organic and Bio Fertilizers on Germination, Growth. *Agriculture and biology journal of North America*. Kingdom of Saudi Arabia, 121-133
- Arenas, I, Ribeiro ,M, Filipe-Ribeiro, L, Vilamarim, R, Costa, E, Siopa, J. (2021). Effect of pre-fermentative maceration and fining agents on protein stability, macromolecular, and phenolic composition of Albaripo white wines: Comparative efficiency of chitosan, k-carrageenan and bentonite as heat stabilisers. *Food.*;10(3):608. DOI: 10.3390/foods10030608
- Armada, L. and Falqué, E. (2007). Repercussion of the clarification treatment agents before the alcoholic fermentation on volatile composition of white wines. *Eur. Food Res. Technol.* 225:553-558.

- Arroyo, J.; Farkaš, V.; Sanz, A.B.; Cabib, E. (2016). Strengthening the fungal cell wall through chitin–glucan cross-links: Effects on morphogenesis and cell integrity. *Cell Microbiol.* 18, 1239–1250.
- Batista, L, Monteiro, S, Loureiro, VB, Teixeira, AR, Ferreira, RB. (2010). Protein haze formation in wines revisited. The stabilizing effect of organic acids. *Food Chemistry*;122:1067-1075
- Bayly, F.C., Berg, H.W. (1967).Grape and wine proteins of white wine varieties. *Am. J. Enol. Vitic.*, 24, 18–32
- Benucci, I., Esti, M., Liburdi, K. (2014). Effect of free and immobilised stem bromelain on protein haze in white wine. *Aust. J. Grape Wine Res*, 20, 347–352.
- Benucci, I. Esti, M. Liburdi, K. (2015). Effect of wine inhibitors on the proteolytic activity of papain from *Carica papaya* L. Latex. *Biotechnol. Prog.*, 31, 48–54.
- Benucci, I., Lombardelli, C., Liburdi, K., Acciaro, G., Zappino, M., Esti, M. (2016). Immobilised native plant cysteine proteases: Packed-bed reactor for white wine protein stabilisation. *J. Food Sci. Technol.*, 53, 1130–1139
- Berg, H.W., Akiyoshi, M. (1961). Determination of protein stability in wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, 12, 107–110
- Besse, C, Clark, A, Scollary, G. (2000). Investigation of the role of total and free copper in protein haze formation. *Australian and New Zealand Grapegrower and Winemaker*;437:19-20
- Blade, W.H. and Boulton, R. (1988). Adsorption of protein by bentonite in a model wine solution. *Am. J. Enol. Vitic.* 39:193-199.
- Boulton, R. (1980). The nature of wine proteins. In *Proceedings of the Sixth Annual Wine Industry Technology Seminar of the Wine Institute*, San Francisco, CA, USA, 1980; pp. 46–58.
- Brindley, G.W. (1984). Order–disorder in clay mineral structures. In *Crystal Structures of Clay Minerals and Their X-Ray Identification*. G.W. Brindley and G. Brown (eds.), pp. 125-199. *Mineralogical Society Monograph* No 5, London, UK.

Cabaroglu, T., A. Razungles, R. Baumes, and Z. Gunata. (2003). Effect of fining treatments on the aromatic potential of white wines from Muscat Ottonel and Gewurztraminer cultivars. *Sci. Aliments* 23:411-423.

Cabello-Pasini, A., Victoria-Cota, N., Macias-Carranza, V., Hernandez-Garibay, E., Muñiz-Salazar, R. (2005). Clarification of wines using polysaccharides extracted from seaweeds. *Am. J. Enol. Vitic* 56, 52–59

Campo, V.L., Kawano, F.F., Silva, D.B., Carvalho, I. (2009). Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis. *Carbohydr. Polym.* 77, 167–180.

Carr, S., Aebersold, R., Baldwin, M., Burlingame, A., Clause, K., Nesvizhskii, A. (2004). The need for guidelines in publication of peptide and protein identification data: Working Group on Publication Guidelines for Peptide and Protein Identification Data. *Mol. Cell. Proteom* 3, 531–533.

Catarino, S., M. Madeira, F. Monteiro, F. Rocha, A.S. Curvelo-Garcia, and R. Bruno de Sousa. (2008). Effect of bentonite characteristics on the elemental composition of wine. *J. Agric. Food Chem.* 56:158-165.

Catharino, RR, Cunha, IBS, Fogaca, AO, Facco, EMP, Godoy, HT, Daudt, CE. (2006). Characterization of must and wine of six varieties of grapes by direct infusion electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* ;41:185-190

Chagas, R, Ferreira, LM, Laia, CAT, Monteiro, S, Ferreira, RB. (2016). The challenging SO₂-mediated chemical build-up of protein aggregates in wines. *Food Chemistry*;192: 460-469

Chambery, A., Del Monaco, G., Di Maro, A., Parente, A. (2009). Peptide fingerprint of high quality Campania white wines by MALDI-TOF mass spectrometry. *Food Chem.*, 113, 1283–1289.

Cilindre, C, Jegou, S, Hovasse, A, Schaeer, C, Castro, AJ, Clement, C. (2008). Proteomic approach to identify champagne wine proteins as modified by *Botrytis cinerea* infection. *Journal of Proteome Research*;7:1199-1208

- Cilindre, C, Castro, AJ, Clument, C, Jeandet, P, Marchal, R. (2007). Influence of *Botrytis cinerea* infection on Champagne wine proteins (characterized by twodimensional electrophoresis/ immunodetection) and wine foaming properties. *Food Chemistry*; 103:139-149
- Conde, A., Neves, A., Breia, R., Pimentel, D., Dinis, L. T., Bernardo, S. (2018). Kaolin particle film application stimulates photoassimilate synthesis and modifies the primary metabolome of grape leaves. *J. Plant Physiol.* 223, 47–56. doi: 10.1016/j.jplph.2018.02.004
- Conde, A., Pimentel, D., Neves, A., Dinis, L. T., Bernardo, S., Correia, C. M. (2016). Kaolin Foliar Application Has a Stimulatory Effect on Phenylpropanoid and Flavonoid Pathways in Grape Berries. *Front. Plant Sci.* 7:01150. doi: 10.3389/fpls.2016.01150
- Conde, A., Regalado, A., Rodrigues, D., Costa, J. M., Blumwald, E., Chaves, M. M. (2015). Polyols in grape berry: transport and metabolic adjustments as a physiological strategy for water-deficit stress tolerance in grapevine. *J. Exp. Bot.* 66, 889–906. doi: 10.1093/jxb/eru446
- Cosme, F, Fernandes, C, Ribeiro, T, Filipe-Ribeiro, L, Nunes, FM. (2020). White wine protein instability: Mechanism, quality control and technological alternatives for wine stabilization. An overview. *Beverage*; 6(1):19. DOI: 10.3390/ beverages6010019
- D'Amato, A, Fasoli, E, Kravchuk, AV, Righetti, PG. (2011). Mehercules, adhuc Bacchus! The debate on wine proteomics continues. *Journal of Proteome Research.*;10:3789-3801
- Dambrouck, T, Marchal, R, Cilindre, C, Parmentier, M, Jeandet, P. (2005). Determination of the grape invertase content (using PTA-ELISA) following various fining treatments versus changes in the total protein content of wine. Relationships with wine foamability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*;53:8782-8789
- Damodaran, S., and J.E. Kinsella. (1980). Flavor protein interactions. Binding of carbonyls to bovine serum albumin: Thermodynamic and conformational effects. *J. Agric. Food Chem.* 28:567-571.

Dawes, H, Boyes, S, Keene, J, Heatherbell, DA. (1994). Protein instability of *White Wine Protein Instability: Origin, Preventive and Removal Strategies* DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.101713>

De Bruijn, J, Loyola, C, Arumi, JL, Martinez, J. (2014). Effect of non-protein factors on heat stability of Chilean Sauvignon Blanc wines. *Chilean Journal of Agricultural Research.*;74:490-496

De Bruijn, J., C. Loyola, A. Flores, F. Hevia, P. Melin, and I. Serra. (2009). Protein stabilisation of Chardonnay wine using trisacryl and bentonite: A comparative study. *Int. J. Food Sci. Tech.* 44:330-336.

Dinis, L. T., Bernardo, S., Conde, A., Pimentel, D., Ferreira, H., Felix, L. (2016a). Kaolin exogenous application boosts antioxidant capacity and phenolic content in berries and leaves of grapevine under summer stress. *J. Plant Physiol.* 191, 45–53. doi: 10.1016/j.jplph.2015.12.005

Dinis, L. T., Bernardo, S., Matos, C., Malheiro, A., Flores, R., Alves, S. (2020). Overview of Kaolin Outcomes from Vine to Wine: Cerceal White Variety Case Study. *Agronomy Basel* 10:agronomy10091422. doi: 10.3390/agronomy10091422

Dinis, L. T., Ferreira, H., Pinto, G., Bernardo, S., Correia, C. M., and Moutinho-Pereira, J. (2016b). Kaolin-based, foliar reflective film protects photosystem II structure and function in grapevine leaves exposed to heat and high solar radiation. *Photosynthetica* 54, 47–55. doi: 10.1007/s11099-015-0156-8

Dinis, L. T., Malheiro, A. C., Luzio, A., Fraga, H., Ferreira, H., Goncalves, I. (2018). Improvement of grapevine physiology and yield under summer stress by kaolin-foliar application: water relations, photosynthesis and oxidative damage. *Photosynthetica* 56, 641–651. doi: 10.1007/s11099-017-0714-3

Dordoni, R., Colangelo, D., Giribaldi, M., Giuffrida, M.G., De Faveri, D.M., Lambri, M. (2015). Effect of Bentonite Characteristics on Wine Proteins, Polyphenols, and Metals under Conditions of Different pH. *Am. J. Enol. Vitic.*, 66, 518–530.

Dufrechou, M, Poncet-Legrand, C, Sauvage, FX, Vernhet, A. (2012). Stability of white wine proteins: Combined effect of pH, ionic strength, and temperature on their aggregation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.;60:1308-1319

Dufrechou, M, Vernhet, A, Roblin, P, Sauvage, FX, Poncet-Legrand, C. (2013). White wine proteins: How does the pH affect their conformation at room temperature? *Langmuir*.;29:10475-10482

Dupin, I.V.S., McKinnon, B.M., Ryan, C., Boulay, M., Markides, A.J., Jones, G.P., Williams, P.J., Waters, E.J. (2000). Saccharomyces cerevisiae mannoproteins that protect wine from protein haze: Their release during fermentation and lees contact and a proposal for their mechanism of action. *J. Agric. Food Chem*, 48, 3098–3105.

Edreva, A. (2005). Pathogenesis-related proteins: Research progress in the last 15 years. *General and Applied Plant Physiology*.;31:105-124

Esteruelas, M, Poinssaut, P, Sieczkowski, N, Manteau, S, Fort, MF, Canals, JM. (2009). Comparison of methods for estimating protein stability in white wines. *American Journal of Enology and Viticulture*.;60: 302-311

Esteruelas, M., Poinssaut, P., Sieczkowski, N., Manteau, S., Fort, M.F., Canals, J.M., Zamora, F. (2009). Characterization of natural haze protein in Sauvignon white wine. *Food Chem.*, 113, 28–35.

Esti, M., Benucci, I., Lombardelli, C., Liburdi, K., Garzillo, A.M.V. (2013). Papain from papaya (*Carica papaya* L.) fruit and latex: Preliminary characterization in alcoholic-acidic buffer for wine application. *Food Bioprod. Process.*, 91, 595–598.

European Union (2011). *Commission regulation (EU) 53/2011 of 21 January 2011*. Available online: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:019:0001:0006:EN:PDF>,
ACCESSED 19 April 2023

Ewart, A.J.W., Phipps, G.J., Iland, P.G. (1980). Bentonite additions to wine: Before, during or after fermentation? *Aust. N. Z. Grapegrow. Winemak.*, 196, 46–47

- Falconer, R, Marangon, M, Van Sluyter, SC, Neilson, KA, Chan, C, Waters, EJ. (2010). Thermal stability of thaumatin-like protein, chitinases, and invertase isolated from Sauvignon blanc and Semillon juice and their role in haze formation in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*;58:975-980
- Ferreira, RB, Monteiro, S, Pereira, MA, Teixeira, AR. (2004). Engineering grapevine for increased resistance to fungal pathogens without compromising wine stability. *Trends in Biotechnology*.;22:168-173
- Ferreira, R.B., M.A. Picarra-Perreira, S. Monteiro, V.B. Loureiro, and A.R. Teixeira. (2002). The wine proteins. *Trends Food Sci. Technol.*12:230-239.
- Filipe-Ribeiro, L., Cosme, F., Nunes, F.M. (2018). Reducing the negative sensory impact of volatile phenols in red wine with different chitosans: Effect of structure on efficiency. *Food Chem*, 242, 591–600.
- Firew, E., Diriba, M., Delelegn, W. (2016). Phosphate solubilization potential of Rhizosphere fungi isolated from plants in Jimma zone, Southwest Ethiopia. *International Journal of Microbiology*. Addis Ababa, 1-11
- Gazzola, D., Van Sluyter, S.C., Curioni, A., Waters, E.J., Marangon, M. (2012). Roles of proteins, polysaccharides, and phenolics in haze formation in white wine via reconstitution experiments. *J. Agric. Food Chem.*, 60, 10666–10673.
- Glenn, D. M. and Puterka, G. J. (2010). Particle Films: A New Technology for Agriculture. *Horticult. Rev.* 31:ch1. doi: 10.1002/9780470650882.ch1
- Gonçalves, F., Fernandes, C., Pinho, M.N. (2001). White wine clarification by micro/ultrafiltration: Effect of remover colloids in tartaric stability. *Sep. Purif. Technol.*, 22–23, 423–429.
- Gonçalves, F., Heyraud, A., Pinho, M.N., Rinaudo, M. (2002). Characterization of white wine mannoproteins. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 6097–6101.
- Gonzalez-Ramos, D., Quiro, M., Gonzalez, R. (2009). Three different targets for the genetic modification of wine yeast strains resulting in improved effectiveness of bentonite fining. *J. Agric. Food Chem*, 57, 8373–8378

- Guadalupe, Z., Palacios, A., Ayestarán, B. (2007). Maceration enzymes and mannoproteins: A possible strategy to increase colloidal stability and colour extraction in red wines. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 4854–4862
- Guangling, J., Guangli, Y., Junzeng, Z., Ewart, H.S. (2011). Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. *Mar. Drugs*, 9, 196–233
- Guichard, E. (2006). Flavour retention and release from protein solutions. *Biotechnol. Adv.* 24:226-229.
- Haggag, W. M. (2002). Control of Downy Mildew on protected cucumber plants with film forming antitranspirants. *OnLine J. Biol. Sci.* 2, 403–407. doi: 10.1016/S0960-9822(02)00857-6
- Hernández, L.M., Ballou, L., Alvarado, E., Gillece-Castro, B.L., Burlingame, A.L., Ballou, C.E. (1989). A new *Saccharomyces cerevisiae mnn* mutant N-linked oligosaccharide structure. *J. Biol. Chem.*, 264, 11849–11856
- Hsu, J, Heatherbell, DA, Flores, JH, Watson, BT. (1987). Heat-unstable proteins in grape juice and wine. II. Characterization and removal by ultrafiltration. *American Journal of Enology and Viticulture*;38(1): 17-22
- Hsu, J.C., and D.A. Heatherbell. (1987). Isolation and characterization of soluble proteins in grapes, grape juice, and wine. *Am. J. Enol.Vitic.* 38:6-10.
- Jaeckels, N., Tenzer, S., Meier, M., Will, F., Dietrich, H., Decker, H., Fronk, P. (2017). Influence of bentonite fining on protein composition in wine. *LWT-Food Sci. Technol*, 75, 335–343.
- Klis, F.M., Mol, P., Hellingwerf, K., Brul, S. (2002). Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev*, 26, 239–256
- Koch, J, Sajak ,E. (1959). A review and some studies on grape protein. *American Journal of Enology and Viticulture.*;18:114-123
- Lambri, M, Dordoni, R, Giribaldi, M, Violetta, MR, Giurida, MG. (2012). Heatunstable protein removal by different bentonite labels in white wines. *LWT Food Science and Technology*;46:460-467

- Lambri, M., Dordoni, R., Silva, A., Favari, D.M. (2010). Effect of bentonite fining on odor-active compounds in two different white wine styles. *Am. J. Enol. Vitic*, 61, 225–233
- Langourieux, S., and J.C. Crouzet(1997). Study of interaction between aroma compounds and glycopeptides by a model system. *J. Agric.Food Chem.* 45:1873-1877.
- Linthorst, HJM. (1991). Pathogenesis-related proteins of plants. *Critical Reviews in Plant Sciences.*;10:123-150
- Lira, E., Rodríguez-Bencomo, J.J., Salazar, F.N., Orriols, I., Fornos, D., López, F. (2015). Impact of Bentonite Additions during Vinification on Protein Stability and Volatile Compounds of Albariño Wines. *J. Agric. Food Chem.*, 63, 3004–3011.
- Liu, A., Nyavor, K., Ankumah, R. (2005). Structural and adsorptive properties of Ba or Mg oxide modified zirconia. *J. Colloid Interface Sci.*, 284, 66–70
- Lubbers, S., A. Voilley, C. Charpentier, and M. Feuillat (1993). Mise en évidence d'interactions entre le macromolecules et les aromes du vin. *Rev. Fr. Oenol.* 144:12-18
- Marangon, M, Lucchetta, M, Waters, EJ. (2011). Protein stabilisation of white wines using zirconium dioxide enclosed in a metallic cage. *Australian Journal of Grape and Wine Research*; 17:28-35
- Marangon, M, Stockdale, VJ, Munro, P, Trethewey, T, Schulkin, A, Holt, HE. (2013). Addition of carrageenan at different stages of winemaking for white wine protein stabilization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*;61:6516-6524
- Marangon, M, Van Sluyter, SC, Waters, EJ, Menz, RI. (2014). Structure of haze forming proteins in white wines: *Vitisvinifera* thaumatin-like proteins. *PLoS One.*;9:e113757
- Marangon, M, Vincenzi, S, Lucchetta, M, Curioni, A. (2010). Heating and reduction affect the reaction with tannins of wine protein fractions differing in hydrophobicity. *Analytica Chimica Acta*;660:110-118

- Marangon, M., Lucchetta, M., Waters, E.J. (2011). Protein stabilisation of white wines using zirconium dioxide enclosed in a metallic cage. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 17, 28–35.
- Marangon, M., Stockdale, V.J., Munro, P., Trethewey, T., Schulkin, A., Holt, H.E., Smith, P.A. (2013). Addition of carrageenan at different stages of winemaking for white wine protein stabilization. *J. Agric. Food Chem.*, 61, 6516–6524
- Martinez-Rodriguez, A.J., and M.C. Polo. (2003). Effect of the addition of bentonite to the tirage solution on the nitrogen composition and sensory quality of sparkling wines. *Food Chem.* 81:383-388.
- McRae, J.M., Barricklow, V., Pocock, K.F., Smith, P.A. (2018). Predicting protein haze formation in white wines. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 24, 504–511
- Mercurio, M., Mercurio, V., Gennaro, B., Gennaro, M., Grifra, C., Langella, A., Morra, V. (2010). Natural zeolites and white wines from Campania region (Southern Italy): A new contribution for solving some oenological problems. *Period Miner.*, 79, 95–112.
- Mesquita, P.R., Piçarra-Pereira, M.A., Monteiro, S., Loureiro, V.B., Teixeira, A.R., Ferreira, R.B. (2001). Effect of wine composition on protein stability. *Am. J. Enol. Vitic.*, 52, 324–330.
- Mesrob, B., Gorinova, N., Tsakov, D. (1983). Characterization of the electrical properties and molecular weights of the proteins in white wines. *Nahrung*, 27, 727–733
- Mierczynska-Vasilev, A., Mierczynskic, P., Maniukiewicz, W., Visalakshanb, R.M., Vasilevd, K., Smith, P.A. (2019). Magnetic separation technology: Functional group efficiency in the removal of haze-forming proteins from wines. *Food Chem.*, 275, 154–160.
- Mierczynska-Vasilev, A., Qi, G., Smith, P., Bindon, K., Vasilev, K. (2020). Regeneration of Magnetic Nanoparticles Used in the Removal of Pathogenesis-Related Proteins from White Wines. *Foods*, 9, 1.
- Moio, L., M., Ugliano, A., Gambuti, A., Genovese, and P. Piombino. (2004). Influence of clarification treatment on concentrations of selected free varietal aroma compounds

and glycoconjugates in Falanghina (*Vitis vinifera* L.) must and wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 55:7-12.

Monteiro, S, Pereira, MA, Mesquita, PR, Loureiro, VB, Teixeira, A, Ferreira, RB. (2001). The wide diversity of structurally similar wine proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*;49:3999-4010

Moretti, RH, Berg, HW. (1965). Variability among wines to protein clouding. *American Journal of Enology and Viticulture*;16:69-78

Muhlack, RA, O'Neill, BK, Waters, EJ, Colby, CB. (2016). Optimal conditions for controlling haze-forming wine protein with bentonite treatment: Investigation of matrix effects and interactions using a factorial design. *Food and Bioprocess Technology*.;9:936-943. DOI: 10.1007/s11947-016-1682-5

Muhlack, RA, Waters, EJ, Lim, A, O'Neill, BK, Colby, CB. (2007). An alternative method for purification of a major thaumatin-like grape protein (VVTL1) responsible for haze formation in white wine. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*;2:70-74

Ndlovu, T., Divol, B., Bauera, F.F. (2018). Yeast Cell Wall Chitin Reduces Wine Haze Formation. *Appl. Environ. Microbiol*, 84, e00668-1

Odjakova, M, Hadjiivanova, C. (2001). The complexity of pathogen defense in plants. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*;27:101-109

OIV (2009). *Codex Oenologique International*; Internationale de la Vigne et du Vin: Paris, France

Paetzold, M, Dulau, L, Dubourdieu, D. (1990). Fractionnement et caractérisation des glycoprotéines dans les moûts de raisins blancs. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*.; 24:13-28

Pashova, V., Guell, C., López, F. (2004). White wine continuous protein stabilization by Packed Column. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 1558–1563

Pasquier, G, Feilhes, C, Dufourcq, T, Geffroy, O. (2021). Potential contribution of climate change to the protein haze of white wines from the French southwest region. *Food*;10:1355. DOI: 10.3390/foods10061355

Pellerin, P, Waters, EJ, Brillouet, J-M, Moutounet, ME. (1994). Effect of polysaccharides sur la formation de trouble protique dans un vin blanc. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*.;24:13-18

Pocock, KF, Alexander, GM, Hayasaka, Y, Jones, PR, Waters, EJ. (2007). Sulfate—A candidate for the missing essential factor that is required for the formation of protein haze in white wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*;55:1799-1807

Pocock, KF, Hayasaka, Y, McCarthy, MG, Waters, EJ. (2000). Grapes and Wine Thaumatin-like proteins and chitinases, the haze-forming proteins of wine, accumulate during ripening of grape (*Vitis vinifera*) berries and drought stress does not affect the final levels per berry at maturity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.;48:1637-1643

Pocock, K., Rankine, B.C. (1973). Heat test for detecting protein instability in wine. *Aust. Wine Brew. Spirit Rev*, 91, 42–43.

Pocock, K.F., Alexander, G.M., Hayasaka, Y., Jones, P.R., Waters, E.J. (2007). Sulfate—A candidate for the missing essential factor that is required for the formation of protein haze in white wine. *J. Agric. Food Chem*, 55, 1799–1807

Pocock, K.F., Waters, E.J. (2006). Protein haze in bottled white wines: How well do stability tests and bentonite fining trials predict haze formation during storage and transport? *Aust. J. Grape Wine Res*, 12, 212–220.

Pozo-Bayón, M.A., E. Pueyo, P.J. Martín-Álvarez, A.J. Martínez- Rodríguez, and M.C. Polo. (2003). Influence of yeast stain, bentonite addition, and aging time on volatile compounds of sparkling wines. *Am. J. Enol. Vitic*. 54:273-278.

Rankine, B.C., Pocock, K.F. (1971). A new method for detecting protein instability in white wines. *Aust. Wine Brew. Spirit Rev*. 89, 61.

- Ratnayake, S., Stockdale, V., Grafton, S., Munro, P., Robinson, A.L., Pearson, W., McRae, J.M., Bacic, A. (2019). Carrageenans as heat stabilisers of white wine. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 25, 439–450
- Ribéreau-Gayon, P., Y., Glories, A., Maujean, and D. Dubourdieu. (2000). The chemistry of wine stabilization and treatments. In *Handbook of Enology*. Vol. 2. Wiley & Sons, Paris.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D. (2006). *Handbook of Enology. Volume 2: The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments*; John Wiley and Sons Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2006
- Rodrigues, A., Ricardo-Da-Silva, J.M., Lucas, C., Laureano, O. (2012). Effect of commercial mannoproteins on wine colour and tannins stability. *Food Chem.*, 131, 907–914
- Salazar, F.N., Achaerandio, I., Labbé, M.A., Güell, C., López, F. (2006). Comparative study of protein stabilisation in white wine using zirconia and bentonite: Physiochemical and wine sensory analysis. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 9955–9958
- Salazar, FN, Zamora, F, Canals, JM, Lopez, F. (2010). Protein stabilization in sparkling base wine using zirconia and bentonite: Influence in the foam parameters and protein fractions. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*;43:51-58
- Sarmiento, MR, Oliveira, JC, Boulton, RB. (2000). Selection of low swelling materials for protein adsorption from white wines. *International Journal of Food Science and Technology*.;35(1):41-47. DOI: 10.1046/j. 1365-2621.2000.00340.x
- Sarmiento, MR, Oliveira, JC, Slatner, M, Boulton, RB. (2000). Influence of intrinsic factors on conventional wineprotein stability tests. *Food Control*.11:423-432
- Sarmiento, MR, Oliveiraz, JC, Slatner, M, Boulton, RB. (2001). Effect of ion-exchange adsorption on the protein profiles of white wines. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*.;7:217-224
- Sauvage, F.-X., Bach, B., Moutonet, M., Vernhet, A. (2010). Proteins in white wines: Thermo-sensitivity and differential adsorption by bentonite. *Food Chem.*, 118, 26–34.

- Segad, M., Jonsson, B., Akesson, T., Cabane, B. (2010). Ca/Na Montmorillonite: Structure, Forces and Swelling Properties. *Langmuir*, 26, 5782–5790
- Selitreffnikoff, CP. (2001). Antifungal proteins. *Applied and Environmental Microbiology*;67:2883-2894
- Sharma, R. R., Reddy, S. V. R., and Datta, S. C. (2015). Particle films and their applications in horticultural crops. *Appl. Clay Sci.* 116, 54–68. doi: 10.1016/j.clay.2015.08.009
- Shellie, K. C., and King, B. A. (2013b). Kaolin Particle Film and Water Deficit Influence Red Winegrape Color under High Solar Radiation in an Arid Climate. *Am. J. Enol. Viticult.* 64, 214–222. doi: 10.5344/ajev.2013.12067
- Siebert, KJ, Troukhanova, NV, Lynn, PY. (1996). Nature of polyphenol-protein interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*;44:80-85
- Siebert, K.J., Troukhanova, N.V., Lynn, P.Y. (1996). Nature of polyphenol-protein interactions. *J. Agric. Food Chem*, 44, 80–85.
- Tabilo-Munizaga, G, Gordon, TA, Villalobos-Carvajal, R, Moreno-Osorio, L, Salazar, FN, Prez-Won, M. (2014). Effects of high hydrostatic pressure (HHP) on the protein structure and thermal stability of Sauvignon blanc wine. *Food Chemistry*.155:214-220. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.01.051
- Tattersall, DB, Pocock, KF, Hayasaka, Y, Adams, K, Van Heeswijck, R, Waters, EJ. (2001). Pathogenesis related proteins—Their accumulation in grapes during berry growth and their involvement in white wine heat instability. Current knowledge and future perspectives in relation to winemaking practices. In: Roubelakis-Angelakis KA, editor. *Molecular Biology & Biotechnology of the Grapevine*. Vol. 7. Dordrecht: Kluwer Academic. pp. 183-201
- Toledo, LN, Salazar, FN, Aquino, AJA. (2017). A theoretical approach for understanding the haze phenomenon in bottled white wines at molecular level. *South African Journal of Enology and Viticulture*;38(1):64-71. DOI: 10.21548/38-1-837

- Van Sluyter, SC, McRae, JM, Falconer, RJ, Smith, PA, Bacic, A, Waters, EJ. (2015). Wine protein haze: Mechanisms of formation and advances in prevention. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 63:4020-4030
- Varki, A., Cummings, R.D., Aebi, M., Packer, N.H., Seeberger, P.H., Esko, J.D., Stanley, P., Hart, G., Darvill, A., Kinoshita, T. (2015). Symbol Nomenclature for Graphical Representation of Glycans. *Glycobiology*, 25, 1323–1324.
- Versari, A., Laghi, L., Thorngate, J.H., Boulton, R.B. (2011). Prediction of colloidal stability in white wines using infrared spectroscopy. *J. Food Eng*, 104, 239–245
- Voilley, A., C. Lamer, P. Dubois, and M. Feuillat. (1990). Influence of macromolecules and treatments on the behavior of aroma compounds in a model wine. *J. Agric. Food Chem.* 38: 248-251.
- Walters, D. R. (2006). Disguising the leaf surface: the use of leaf coatings for plant disease control. *Eur. J. Plant Pathol.* 114, 255–260. doi: 10.1007/s10658-005-5463-7
- Wang, Y., Xue, T., Han, X., Guan, L., and Li, H. (2020). Kaolin Particle Film Affects Grapevine Berry Quality in cv. Meili in Humid Climate Conditions. *HortScience* 55, 1987–2000. doi: 10.21273/HORTSCI15364-20
- Wang, Z. L., Xue, T. T., Gao, F. F., Zhang, L., Han, X., Wang, Y., et al. (2021). Intraspecific recurrent selection in *V. vinifera* : an effective method for breeding of high quality, disease-, cold-, and drought -resistant grapes. *Euphytica* 217:111. doi: 10.1007/s10681-021-02851-7
- Waters, EJ, Alexander, G, Muhlack, R, Pocock, KF, Colby, C, O'Neill, BK. (2005). Preventing protein haze in bottled white wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*;11:215-225
- Waters, EJ, Hayasaka, Y, Tattersall, DB, Adams, KS, Williams, PJ. (1998). Sequence analysis of grape (*Vitisvinifera*) berry chitinases that cause haze formation in wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*;46:4950-4957
- Waters, EJ, Shirley, NJ, Williams, PJ. (1996). Nuisance proteins of wine are grape pathogenesis-related proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*;44:3-5

Waters, EJ, Wallace, W, Tate, ME, Williams, PJ. (1993). Isolation and partial characterization of a natural haze protective factor from white wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*;41:724-730

Waters, EJ, Wallace, W, Williams, PJ. (1991). Heat haze characteristics of fractionated wine proteins. *American Journal of Enology and Viticulture*;42:123-127

Waters, E.J., Alexander, G., Muhlack, R., Pocock, K.F., Colby, C., O'Neill, B.K., Høj, P.B., Jones, P. (2005). Preventing protein haze in bottled white wine. *Aust. J. Grape Wine Res*, 11, 215–225.

Waters, E.J., Pellerin, P., Brillouet, J.-M. (1994). A *Saccharomyces mannoprotein* that protects wine from protein haze. *Carbohydr. Polym.*, 23, 185–191.

Wyss, C., Cuénat, P. (2005). Stabilisation tartrique des vins par traitement aux zéolithes. *Rev. Suisse Vitic. Arboric. Hortic*, 37, 341–347

Yokotsuka, K, Singleton, VL. (1995). 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*;46:329-338

Yokotsuka, K., Nozaki, K., Kushida, T. (1983). Turbidity formation caused by interaction of must proteins with wine tannins. *J. Ferment. Technol*, 61, 413–416