

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ - ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ**  
**ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΙΝΟΛΟΓΙΑΣ**  
**ΔΠΜΣ ΑΜΠΕΛΟΥΡΓΙΑ – ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**  
**«ΜΕΛΕΤΗ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΟΙΝΩΝ ΛΕΥΚΩΝ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ**  
**ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ – ΟΛΦΑΚΤΟΜΕΤΡΙΑΣ»**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Γ. ΚΟΤΣΕΡΙΔΗΣ**

**ΙΩΑΝΝΗΣ Ε. ΒΟΥΚΙΑΔΗΣ**

**ΑΘΗΝΑ 2014**

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ - ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ**  
**ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΙΝΟΛΟΓΙΑΣ**  
**ΔΠΜΣ ΑΜΠΕΛΟΥΡΓΙΑ – ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**  
**«ΜΕΛΕΤΗ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΟΙΝΩΝ ΛΕΥΚΩΝ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ**  
**ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ – ΟΛΦΑΚΤΟΜΕΤΡΙΑΣ»**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Γ. ΚΟΤΣΕΡΙΔΗΣ**

**ΙΩΑΝΝΗΣ Ε. ΒΟΥΚΙΑΔΗΣ**

**ΑΘΗΝΑ 2014**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«ΜΕΛΕΤΗ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΟΙΝΩΝ ΛΕΥΚΩΝ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΜΕ  
ΧΡΗΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ – ΟΛΦΑΚΤΟΜΕΤΡΙΑΣ»

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Επ. Καθ. Γ. Κοτσερίδης (επιβλέπων)

Επ. Καθ. Στ. Καλλίθρακα

Επ. Καθ. Αικ. Μπινιάρη

ΙΩΑΝΝΗΣ Ε. ΒΟΥΚΙΔΗΣ

ΑΘΗΝΑ 2014

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στη μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε ποιοτικός προσδιορισμός αρωματικών ενώσεων σε λευκούς οίνους που προήλθαν από τις ποικιλίες Αηδάνι, Moscato d’Asti και Μαλαγουζιά.

Ο προσδιορισμός των αρωματικών ενώσεων έγινε με τη βοήθεια αέριας χρωματογραφίας – ολφακτομετρίας (GC-O) και με αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματογράφο μαζών (GC-MS) μετά από την εφαρμογή υγρής / υγρής εκχύλισης (I/I) στα δείγματα.

Βρέθηκε ότι οι τρεις οίνοι παρουσιάζουν ένα παρόμοιο αρωματικό προφίλ. Εμφανίζονται αρώματα με πρωτογενή προέλευση αλλά και δευτερογενή λόγω ζυμώσεων. Οι αλκοόλες ήταν η πολυπληθέστερη ομάδα ενώσεων που ανιχνεύτηκε και στα τρία δείγματα. Η ομάδα των εστέρων διαμόρφωσε σε μεγαλύτερο ποσοστό το αρωματικό προφίλ των οίνων. Οι αλκοόλες και τα πτητικά οξέα συμμετείχαν στη διαμόρφωση του αρώματος αλλά σε μικρότερο βαθμό.

Επιπλέον στον οίνο που προήλθε από Μαλαγουζιά έγινε κλασματοποίηση του αρωματικού εκχυλίσματος με τη βοήθεια υγρής χρωματογραφίας υψηλής ανάλυσης (HPLC) αλλά δεν προέκυψαν σημαντικά ευρήματα.

Επιστημονική περιοχή της εργασίας: Αθήνα, Αττική, Ελλάδα

Λέξεις κλειδιά: αέρια χρωματογραφία-ολφακτομετρία, υγρή/υγρή εκχύλιση, μαλαγουζιά, αηδάνι, moscato d’asti

# THESIS

## Identification of potent aromatic compounds in white wine varieties with the use of chromatography-olfactometry

### ABSTRACT

Odor impact compounds of white wines from varieties Aidani, Moscato d'Asti and Malagouzia were studied.

The identification of the compounds was made by using several methods, including Gas Chromatography-Olfactometry (GC-O) and Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) after the samples were processed by liquid-liquid (l/l) extraction.

It was found that all the wines appear to have a similar aromatic profile. The aromatic compounds had two origins. The first was the grape (compounds released by crushing), and the second was the yeasts (compounds derived during fermentation). Alcohols were the largest group of compounds detected in all three samples. The group of esters formed, on a larger proportion, the aromatic profile of wines. The alcohols and volatile acids involved in the formation of aroma but to a lesser extent.

In addition, the aroma extract derived from Malagouzia was fractionated by using high performance liquid chromatography analysis (HPLC) but revealed no significant findings.

Scientific area of the experiment: Athens, Attiki, Greece

Key words: gas chromatography-olfactometry, liquid/liquid extraction, Aidani, Malagouzia, Moscato d'Asti

# Περιεχόμενα

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| <b>1</b>   | <b>ΑΡΩΜΑ</b>   | <b>1</b>  |
| <b>1.1</b> | <b>ΤΑΞΕΙΣ ΠΤΗΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΠΟΥ ΒΡΙΣΚΟΝΤΑΙ ΣΤΟΝ ΟΙΝΟ</b>  | <b>3</b>  |
| 1.1.1      | ΤΕΡΠΕΝΙΑ   | 3         |
| 1.1.2      | ΜΗ ΙΣΟΠΡΕΝΟΕΙΔΕΙΣ ΕΝΩΣΕΙΣ  | 5         |
| 1.1.3      | ΠΡΟΔΡΟΜΕΣ ΚΑΡΟΤΕΝΟΕΙΔΕΙΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΣΤΟ ΣΤΑΦΥΛΙ.  | 6         |
| 1.1.4      | ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΜΗ ΙΣΟΠΡΕΝΟΕΙΔΩΝ ΑΠΟ ΚΑΡΟΤΕΝΟΕΙΔΗ  | 7         |
| 1.1.5      | ΦΑΙΝΥΛΟΠΡΟΠΑΝΟΕΙΔΗ   | 8         |
| 1.1.6      | ΠΑΡΑΓΩΓΑ ΦΟΥΡΑΝΙΟΥ ΚΑΙ ΦΟΥΡΑΝΟΝΕΣ  | 10        |
| 1.1.7      | ΠΑΡΑΓΩΓΑ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ   | 12        |
| 1.1.8      | ΠΤΗΤΙΚΑ ΟΞΕΑ, ΕΣΤΕΡΕΣ ΚΑΙ ΑΝΩΤΕΡΕΣ ΑΛΚΟΟΛΕΣ ΠΡΟΕΡΧΟΜΕΝΕΣ ΑΠΟ ΣΑΚΧΑΡΑ ΚΑΙ ΑΜΙΝΟΞΕΑ              | 13        |
| 1.1.9      | ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ  | 13        |
| 1.1.10     | ΕΣΤΕΡΕΣ  | 14        |
| 1.1.11     | ΑΛΚΟΟΛΕΣ   | 18        |
| 1.1.12     | ΠΥΡΑΖΙΝΕΣ  | 19        |
| 1.1.13     | ΠΤΗΤΙΚΕΣ ΘΕΙΟΥΧΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ  | 20        |
| <b>1.2</b> | <b>ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΟ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΤΟ ΣΤΑΦΥΛΙ</b>  | <b>23</b> |
| 1.2.1      | ΤΡΥΓΟΣ   | 24        |
| 1.2.2      | ΗΛΙΟΦΑΝΕΙΑ   | 25        |
| 1.2.3      | ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΥΔΑΤΟΣ ΚΑΙ ΦΥΛΛΩΜΑΤΟΣ   | 26        |
| 1.2.4      | ΩΡΙΜΟΤΗΤΑ ΡΑΓΩΝ  | 27        |
| 1.2.5      | ΜΥΚΗΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ  | 28        |
| <b>2</b>   | <b>ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ – ΟΛΦΑΚΤΟΜΕΤΡΙΑ</b>   | <b>30</b> |
| <b>2.1</b> | <b>ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΑΕΡΙΑΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ-ΟΛΦΑΚΤΟΜΕΤΡΙΑΣ (GC-O) ΚΑΙ ΣΥΝΔΕΣΜΟΛΟΓΙΑ</b> | <b>30</b> |
| <b>2.2</b> | <b>ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ</b>   | <b>32</b> |
| 2.2.1      | ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΣΕ ΔΙΑΛΥΤΗ   | 33        |
| 2.2.2      | ΜΕΘΟΔΟΙ HEADSPACE  | 34        |
| 2.2.3      | ΦΤΙΑΧΝΟΝΤΑΣ ΚΛΑΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ   | 35        |
| 2.2.4      | ΕΚΛΕΚΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ   | 37        |
| 2.2.5      | ΕΠΙΛΕΓΟΝΤΑΣ ΤΗΝ ΚΑΤΑΛΛΗΛΗ ΜΕΘΟΔΟ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ   | 37        |
| 2.2.6      | ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ                                       | 38        |
| <b>2.3</b> | <b>ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ</b>   | <b>38</b> |
| <b>2.4</b> | <b>ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑΤΟΣ</b>  | <b>39</b> |
| <b>2.5</b> | <b>ΠΟΣΟΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>   | <b>40</b> |
| 2.5.1      | ΑΝΙΧΝΕΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑΣ  | 41        |
| 2.5.2      | ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΡΑΙΩΣΗΣ ΜΕΧΡΙ ΤΟ ΚΑΤΩΦΛΙ  | 43        |
| 2.5.3      | ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΠΕΥΘΕΙΑΣ ΕΝΤΑΣΗΣ  | 46        |
| <b>2.6</b> | <b>ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ ΤΗΣ ΑΕΡΙΑΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΜΕ ΟΛΦΑΚΤΟΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ</b>            | <b>49</b> |

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| 2.6.1      | ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΤΗ GC-O ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΕ ΑΛΚΟΟΛΟΥΧΑ ΠΟΤΑ                          | 50        |
| 2.6.2      | ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ GC-O ΓΙΑ ΠΟΙΟΤΙΚΟ ΕΛΕΓΧΟ ΠΡΩΤΩΝ ΥΛΩΝ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΓΙΑ ΝΑ ΠΑΡΑΧΘΟΥΝ ΑΛΚΟΟΛΟΥΧΑ ΠΟΤΑ | 51        |
| 2.6.3      | ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ GC-O ΓΙΑ ΕΛΕΓΧΟ ΤΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΑΛΚΟΟΛΟΥΧΩΝ ΠΟΤΩΝ                                    | 52        |
| 2.6.4      | ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΖΟΝΤΑΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΥΠΕΥΘΥΝΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΓΕΥΣΗ ΑΛΚΟΟΛΟΥΧΩΝ ΠΟΤΩΝ                                     | 54        |
| 2.6.5      | ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΤΟ GC-O ΓΙΑ ΑΝΑΣΚΕΥΑΣΗ ΑΡΩΜΑΤΟΣ ΑΛΚΟΟΛΟΥΧΩΝ ΠΟΤΩΝ  | 55        |
| <b>3</b>   | <b><u>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</u></b>  | <b>57</b> |
| <b>3.1</b> | <b>ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ</b>  | <b>57</b> |
| 3.1.1      | ΟΙΝΟΙ ΠΟΥ ΑΝΑΛΥΘΗΚΑΝ   | 57        |
| 3.1.2      | ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΣΕ ΑΡΩΜΑΤΙΚΑ  | 57        |
| 3.1.3      | ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ ΤΗΣ ΥΓΡΗΣ/ΥΓΡΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ  | 57        |
| 3.1.4      | ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ-ΟΛΦΑΚΤΟΜΕΤΡΙΑ, ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ-ΦΑΣΜΑΤΟΓΡΑΦΟΣ ΜΑΖΩΝ                               | 58        |
| 3.1.5      | ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ   | 59        |
| <b>4</b>   | <b><u>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ</u></b>  | <b>61</b> |
| <b>4.1</b> | <b>ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΟΙΝΩΝ ΑΗΔΑΝΙ, ΜΑΛΑΓΟΥΖΙΑ, MOSCATO D'ASTI</b>   | <b>61</b> |
| 4.1.1      | ΑΛΚΟΟΛΕΣ   | 61        |
| 4.1.2      | ΕΣΤΕΡΕΣ  | 63        |
| 4.1.3      | ΠΤΗΤΙΚΑ ΟΞΕΑ   | 65        |
| 4.1.4      | ΑΛΔΕΥΔΕΣ ΚΑΙ ΚΕΤΟΝΕΣ   | 66        |
| 4.1.5      | ΤΕΡΠΕΝΟΛΕΣ   | 66        |
| <b>4.2</b> | <b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>  | <b>67</b> |
| <b>4.3</b> | <b>ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ</b>  | <b>69</b> |
|            | <b><u>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u></b>   | <b>71</b> |

# 1 Άρωμα

Η προέλευση του αρώματος του οίνου υπήρξε πηγή μεγάλου ενδιαφέροντος κατά τον τελευταίο αιώνα, με ταχύτατη εξέλιξη χάρη στην ανάπτυξη νέων αναλυτικών τεχνικών, υβρίδια αναλυτικών/οργανοληπτικών μεθόδων (Ebeler & Thorngate, 2009) και με τη βοήθεια πολυπαραγοντικών στατιστικών συγκρίσεων με περιγραφική ανάλυση (Saenz-Navajas et al., 2010). Ο συνδυασμός αναλυτικών και οργανοληπτικών μεθόδων υπήρξε ιδιαίτερα σημαντικός στην επίλυση φαινομένων αλληλεπίδρασης αρωματικών ενώσεων με το μη πτητικό κλάσμα του μίγματος (Saenz-Navajas et al., 2010) καθώς και με άλλες αρωματικές ενώσεις (Pineau et al., 2009). Αυτές οι αλληλεπιδράσεις μπορεί να έχουν αντίκτυπο στον οργανοληπτικό χαρακτήρα του προϊόντος λόγω φαινομένων ενίσχυσης ή καταστολής της αντίληψης καθώς και φυσικοχημικών φαινομένων που επηρεάζουν την πτητικότητα και την απελευθέρωση των αρωματικών ενώσεων.

Το άρωμα στόματος (flavor) γίνεται αισθητό όταν αρωματικά ενεργά μόρια διεγείρουν αισθητήρες στο στόμα και στη μύτη, που ο εγκέφαλος παραβάλλει για να παράγει την αντίληψη του αρώματος στόματος. Η παρούσα κατανόηση δείχνει ότι οι πολλαπλές αισθητήριες αλληλεπιδράσεις περιλαμβάνουν οσφρητικές και γευστικές αισθήσεις κατά την αντίληψη του αρώματος στόματος (Aunray & Spence, 2008), όπου το άρωμα παίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην συνολική εκτίμηση του προϊόντος.

Η οσμή είναι μία βιολογική και ηλεκτροφυσιολογική διεργασία που μετατρέπει την μοριακή πληροφορία ενός αρώματος σε αντιληπτική αντίδραση (Hasin-Brumshtein et al., 2009). Το ανθρώπινο οσφρητικό επιθήλιο φιλοξενεί εκατομμύρια οσφρητικών αισθητήριων νεύρων που εφάπτονται στους οσφρητικούς υποδοχείς, καθένας από τους οποίους είναι ικανός να ανιχνεύει πολλαπλές ενώσεις με κοινές λειτουργικές ομάδες. Ταυτόχρονα, πολλαπλοί διαφορετικοί υποδοχείς μπορούν να αναγνωρίσουν την ίδια αρωματική ένωση αν πολλές λειτουργικές ομάδες είναι παρούσες (Hasin-Brumshtein et al., 2009). Αυτή τη στιγμή, 347 εν δυνάμει λειτουργικά γονίδια οσφρητικών υποδοχέων έχουν αναγνωρισθεί επιτρέποντας στον άνθρωπο να αναγνωρίσει χιλιάδες αρωματικές ενώσεις που βρίσκονται στη φύση.



Το άρωμα το οίνου έχει ως προέλευση πολλαπλές πηγές και διεργασίες μεταξύ των οποίων:

- Απευθείας συμβολή των αρωματικών ενώσεων του σταφυλιού, μεταξύ των οποίων μονοτερπένια, μη ισοπρενοειδή, αλοιφατικές ενώσεις, φαινολοπροπανοειδή, μεθοξυπυραζίνες και πτητικές θειούχες ενώσεις (Gonzalez-Barreiro et al., 2013).
- Δευτερογενείς μεταβολίτες μετά από μικροβιακή επίδραση που σχηματίζονται από το μεταβολισμό της ζάχαρης, των λιπαρών οξέων, οργανικών αζωτούχων ενώσεων (πυριμιδίνες, πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα), και κινναμωμικών οξέων που βρίσκονται στο σταφύλι.
- Η συμβολή των αρωμάτων με προέλευση το ξύλο βελανιδιάς που εκχυλίζονται κατά τη ζύμωση και παλαίωση του κρασιού και που ποικίλουν ανάλογα με την προέλευση, ωρίμανση και καύση του ξύλου (Garde-Cerdan et al., 2010).
- Χημικές μεταβολές που σχετίζονται με οξέα και ενζυματική κατάλυση μη αρωματικών και αρωματικών συστατικών του σταφυλιού.
- Χημικές μετατροπές που σχετίζονται με οξειδωτικές διεργασίες στο κρασί που σχετίζονται με την παρουσία οξυγόνου κατά τις οινολογικές πρακτικές, αποθήκευση και το υλικό συσκευασίας.

Ενώ ένας αριθμός αρωματικών ενώσεων έχει ταυτοποιηθεί, η κατανόηση του ρόλου της αμπελουργικής πρακτικής στην εξέλιξή τους παραμένει περιορισμένη. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο χρόνο και το κόστος διεξαγωγής πειραμάτων πάνω στην αμπελουργία και στη μεγάλη έμφαση κατά το παρελθόν στην ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων, στην ανακάλυψη ενώσεων καθώς και στη δυσκολία αναγνώρισης και ποσοτικοποίησης συστατικών του σταφυλιού που συμμετέχουν στο τελικό άρωμα του κρασιού.

## 1.1 Τάξεις πτητικών ενώσεων που βρίσκονται στον οίνο

Η άφιξη της αέριας χρωματογραφίας και ο συνδυασμός της με τη φασματοσκοπία μάζας είχε ως αποτέλεσμα την ταυτοποίηση εκατοντάδων αρωματικών ενώσεων σε πολλά τρόφιμα μεταξύ των οποίων και το κρασί. Οι κύριες ομάδες των αρωματικών ενώσεων που βρίσκονται στο κρασί είναι τα μονοτερπένια, μη ισοπρενοειδή, αλοιφατικές, ανώτερες αλκοόλες, εστέρες, φαινυλοπροπανοειδή, μεθοξυπυραζίνες και πτητικές θειούχες (Ebeler & Thorngate, 2009). Πολυάριθμα πειράματα έχουν ερευνήσει τη σύνθεση συγκεκριμένων ποικιλιών αμπέλου σε μία προσπάθεια για την καλύτερη κατανόηση του αρώματος της ποικιλίας. Σε κάποιες περιπτώσεις έχουν επιτυχημένα διαχωρίσει τις ποικιλίες με βάση ενώσεις κλειδιά ή κυρίαρχες χαρακτηριστικές ομάδες. Όμως, λίγες έρευνες κατάφεραν να αναγνωρίσουν μία ένωση υπεύθυνη για το χαρακτήρα της ποικιλίας. Είναι προφανές ότι ο ποικιλιακός χαρακτήρας βασίζεται, επομένως, όχι σε κάποια συγκεκριμένη ένωση αλλά στο γενικό αρωματικό προφίλ ενώσεων που βρίσκονται στο σταφύλι και το αντίστοιχο κρασί. Τα επόμενα υποκεφάλαια παρέχουν μία επισκόπηση των ενώσεων που βρίσκονται στο σταφύλι και στο κρασί ανάλογα με τις χαρακτηριστικές τους ομάδες.

### 1.1.1 Τερπένια

Μονοτερπένια και πολυτερπένια συνθέτονται βιολογικά από ισοπέντυλο πυροσταφυλικό (IPP) και πυροφωσφορικό διμεθυλλαλύλιο (DMAPP). Αυτές οι πρόδρομες ενώσεις σχηματίζονται είτε μέσω της οδού του μεβαλονικού οξέος (MVA) από τρία μόρια ακέτυλο CoA ή μέσω της οδού του μεβαλονικού (MEP) από πυροσταφυλικό και 3-φωσφορο-γλυκεραλδεΐδη. Στη συνέχεια τα μονοτερπένια παράγονται από το διφωσφορικό γεράνιο (GPP) και τα πολυτερπένια από το διφωσφορικό φαρνεσύλιο (FPP) μέσω της τερπενοσυνθάσης (TPS) (Martin et al., 2010). Η οικογένεια γονιδίων της τερπενοσυνθάσης σε *Vitis vinifera* (VvTPS) περιέχει το μεγαλύτερο αριθμό ενεργών χαρακτηρισμένων TPS για οποιοδήποτε είδος μέχρι σήμερα (Martin et al., 2010). Συνολικά 39 VvTPS παράγωγα γονιδίων έχουν χαρακτηριστεί λειτουργικά, δείχνοντας ότι αυτή η οικογένεια γονιδίων είναι

ικανή να συνθέσει μέχρι και 21 διαφορετικά μονοτερπένια και 47 πολυτερπένια (Martin et al., 2010).

Τα μονοτερπένια παίζουν σημαντικό ρόλο στο άρωμα των λευκών οίνων από Μοσχάτες ποικιλίες (π.χ. Μοσχάτο Αλεξανδρείας, Μοσχάτο Frontignan) και αρωματικών μη μοσχάτων ποικιλιών (π.χ. Gewurztraminer, Riesling). Συσχετίσεις μεταξύ των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών λουλουδιών και υψηλών επιπέδων ελεύθερης λιναλοόλης και α-τερπινεόλης σε αυτές τις ποικιλίες έχουν αποδειχθεί. Επιπρόσθετα, το (Z)-rose oxide έχει αναγνωρισθεί ως μία σημαντικής επίδρασης ένωση σε κρασιά Gewurztraminer και συνδέεται με το άρωμα Lychee που είναι κοινό σε αυτή την ποικιλία. Τέλος, το μονοτερπένιο «λακτόνη οίνου» είναι μία σημαντική ένωση σε κρασιά Gewurztraminer. Άλλες αρωματικές ποικιλίες ή μη μοσχάτες ποικιλίες, μεταξύ των οποίων η πιο γνωστή είναι η Riesling, περιέχουν χαμηλότερα επίπεδα μονοτερπενίων σε σχέση με τις Μοσχάτες ποικιλίες. Η βιοσύνθεση των μονοτερπενίων σε αυτές τις ποικιλίες έχει σχετισθεί με ένα γονίδιο που ονομάζεται VnDXS. Αυτό το γονίδιο κρυπτογραφεί ένα ένζυμο κλειδί στα αρχικά στάδια της οδού σύνθεσης τερπενίων (1-δεοξυ-δ-ξυλουλοξη-5-φωσφορική συνθάση) και έχει δείχθει ότι σχετίζεται με την παραγωγή τερπενίων σε Μοσχάτες ποικιλίες και ποικιλίες που μοιάζουν με αυτές (Emanuelli et al., 2010).

Οι ερυθρές ποικιλίες δεν χαρακτηρίζονται από υψηλά επίπεδα τερπενίων, όμως χαμηλά επίπεδα ορισμένων τερπενίων είναι παρόντα (π.χ. <1,5 μg/kg λιναλοόλης, σιτρονελλόλης, νερόλης και γερονιόλης/νερυλ ακετόνης σε σταφύλια Cabernet Sauvignon. Παρόλα αυτά, πολυάριθμα γονίδια που εμπλέκονται στο μεταβολισμό ισοπρενίων και τερπενίων έχουν ταυτοποιηθεί σε σταφύλια, γεγονός που ίσως δείχνει ένα σημαντικό ρόλο των τερπενίων στην εξέλιξη του σταφυλιού και/ή σε αντοχή σε εχθρούς και ασθένειες (Martin et al., 2010).

Είκοσι μη προσδιορισμένα στο παρελθόν μονοτερπένια πρόσφατα ταυτοποιήθηκαν σε σταφύλια Fernao-Pires από την Πορτογαλία, δείχνοντας ότι ακόμα μπορεί να υπάρχουν μη προσδιορισμένα τερπένια στα σταφύλια. Επιπρόσθετα, ένα μέρος μονοτερπενίων υπόκεινται μεταβολές ανάλογα με το pH και τη θερμοκρασία στο χυμό και στο κρασί, και για αυτό η βιοσύνθεση των σταφυλιών δεν δίνει εξήγηση για όλους τους μεταβολίτες τερπενίων που βρέθηκαν στο κρασί. Για παράδειγμα σε όξινο περιβάλλον, η αποδόμηση της γερανιόλης και λιναλοόλης έχει

ως αποτέλεσμα το σχηματισμό οξειδίου της λιναλόλης και α-τερπινεόλης. Οι αντιδράσεις είναι μεγαλύτερες σε υψηλότερες θερμοκρασίες όπως αυτές που μπορεί να επικρατούν κατά τη μεταφορά ή αποθήκευση και μπορεί να συνδράμουν στον χαρακτήρα του παλαιωμένου οίνου (Silva Ferreira et al., 2002).

Τέλος, τα μονοτερπένια στο κρασί μπορεί να παραχθούν και από υλικά άσχετα με το σταφύλι, που βρίσκονται στο χώρο μέσα και γύρω από τον αμπελώνα. Για παράδειγμα, αποδείχτηκε ότι η 1,8-κινεόλη (ευκαλυπτόλη) ενώ πιθανόν σχηματίζεται σε σταφύλια Cabernet Sauvignon αμέσως μετά την καρπόδεση μπορεί και να παραχθεί από δέντρα ευκάλυπτου γύρω και μέσα στον αμπελώνα (Carone et al., 2012).

Τα πολυτερπένια έχουν αποκτήσει μικρή προσοχή όσον αφορά την ανάλυση σταφυλιού και οίνου, με μόνο τρεις μεγάλες έρευνες να αναφέρουν πολλαπλά πολυτερπένια σε ποικιλίες Riesling, Traminer, Rulander, Muller-Thurgau, Scheurebe, Optima, Rieslaner, Baga και Shiraz. Το πολυτερπένιο α-υλαγνίνη έχει ταυτοποιηθεί ως υποψήφιος δείκτης για το χαρακτήρα πιπεριάς σε αυστραλιανά κρασιά ποικιλίας Shiraz, αλλά η συμβολή του στο κρασί δεν αποδείχθηκε. Το πολυτερπένιο ροτουνδόνη έχει αναγνωρισθεί ως εν δυνάμει αρωματικό στοιχείο υπεύθυνο για το άρωμα μαύρου πιπεριού σε κρασιά από ποικιλία Shiraz (Wood et al., 2008) καθώς και σε ένα αριθμό άλλων φυτών μεταξύ των οποίων το μαύρο πιπέρι (*Piper nigrum*), ρίγανη (*Origanum vulgare*), δεντρολίβανο (*Rosmarinus officinalis*) και στο βασιλικό (*Ocimum basilicum*) (Wood et al., 2008).

Ξεκάθαρα, τα τερπένια και πολυτερπένια παίζουν σημαντικό ρόλο σε πλήθος ποικιλιών αμπέλου. Με συνεχείς ανακαλύψεις σημαντικών νέων στοιχείων, όπως η ροτουνδόνη, είναι προφανές ότι αυτή η ομάδα ενώσεων θα συνεχίσει να αποτελεί εστία ενδιαφέροντος για την έρευνα στο άρωμα του κρασιού.

### **1.1.2 Μη ισοπρενοειδείς ενώσεις**

Οι μη ισοπρενοειδείς (ή αποκαροτενοειδείς) ενώσεις προέρχονται από τα καροτενοειδή, που υπάρχουν συνήθως στη φύση, και έχουν λάβει αρκετή προσοχή ως αρωματικά για πολλά τρόφιμα και αρώματα (Winterhalter & Ebeler, 2013).

Αποτελούνται από ένα σκελετό ανθρακικής αλυσίδας και διαφέρουν στην λειτουργική ομάδα του οξυγόνου, που είτε απουσιάζει, είτε βρίσκεται στον 7-C (δαμασκηνόνη) ή στον 9-C (ιονόνη). Οι μη ισοπρενοειδείς βρίσκονται σε πληθώρα στις ποικιλίες αμπέλου, αλλά πιο πολύ σε αρωματικές ποικιλίες και πιστεύεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στο άρωμα πολλών ποικιλιών όπως Semillon, Sauvignon blanc, Chardonnay, Merlot, Syrah και Cabernet Sauvignon.

### **1.1.3 Πρόδρομες καροτενοειδείς ενώσεις στο σταφύλι.**

Από τη στιγμή που τα μη ισοπρενοειδή προέρχονται από καροτενοειδή, είναι συνακόλουθο ότι η πληθώρα των μη ισοπρενοειδών να επηρεάζεται από τα καροτενοειδή στο σταφύλι. Τα καροτενοειδή παίζουν ένα σημαντικό φωτοπροστατευτικό ρόλο στους φυτικούς ιστούς είτε μέσω δεσμεύοντας μονοσθενές οξυγόνο ή δροσίζοντας την τρισθενή χλωροφύλλη, εμποδίζοντας το σχηματισμό μονοσθενούς οξυγόνου, ένα πολύ ισχυρό οξειδωτικό που μπορεί να καταστρέψει κυτταρικές μεμβράνες και πρωτεΐνες. Επιπρόσθετα, τα καροτενοειδή έχει βρεθεί ότι βελτιώνουν τη φωτοσυνθετική ικανότητα σε ψηλότερα φυτά ως επιπλέον απορροφητές φωτός. Στο σταφύλι, τα καροτενοειδή και οι ξανθοφύλλες σχηματίζονται στους χλωροπλάστες. Κατά την ωρίμανση των ραγών, όταν οι χλωροπλάστες έχουν χαθεί, τα επίπεδα των καροτενοειδών, μαζί και η χλωροφύλλη, μειώνονται.

Περισσότερα από 600 καροτενοειδή και ξανθοφύλλες, με ένα μεγάλο εύρος δομών, έχουν απομονωθεί από φυσικές πηγές. Λίγα από αυτά, ωστόσο, έχουν βρεθεί στο σταφύλι και το κρασί. Το β-καροτένιο και η λουτεΐνη αποτελούν το 85% του συνόλου, με το νεοχρώμιο, νεοξανθίνη, βιολαξανθίνη, λουτεοξανθίνη, φλαβοξανθίνη, λουτεϊν-5,6-εποξειδιο και ζεαξανθίνη καθώς και το cis ισομερές της λουτεΐνης και του β-καροτενίου να είναι τα επόμενα σε αφθονία. Τα καροτενοειδή συσσωρεύονται στο εξωκάρπιο των ραγών πριν τον περκασμό (Guedes de Pinho et al., 2001). Παρόλο που τα καροτενοειδή και οι ξανθοφύλλες βρίσκονται στο φλοιό των ραγών, υπάρχει διαμάχη για το αν εκχυλίζονται στο χυμό κατά την οινοποίηση. Έχει ειπωθεί ότι τα καροτενοειδή είναι πολύ λιπόφιλα για να μπορούν να εκχυλιστούν, αλλά πιο πρόσφατες έρευνες δείχνουν ότι βρίσκονται σε μούστο και κρασί Port της Douro

Valley (Guedes de Pinho et al., 2001). Αυτό μπορεί να αποτελεί ένα χαρακτηριστικό της οινολογικής πρακτικής όπου αιθανόλη προστίθεται κατά τη ζύμωση (μαζί με τους φλοιούς), αυξάνοντας τη διαλυτότητα αυτών των ενώσεων στην αρχή της ζύμωσης (Mendes-Pinto, 2009).

#### 1.1.4 Σχηματισμός μη ισοπρενοειδών από καροτενοειδή

Το 1970, η ανακάλυψη της β-δαμασκηνόνης και β-δαμασκόνης από έλαιο ρόδου Βουλγαρίας (*Rosa damascene*) έδωσε το έναυσμα για περισσότερες έρευνες σχετικά με μη ισοπρενοειδείς τριαντάφυλλο κετόνες. Οι τριαντάφυλλο κετόνες είναι ένα πολυσυλλεκτικό μίγμα αρωματικών ενώσεων με πολύπλοκο χαρακτήρα που περιγράφεται ως λουλουδάτο, σαν μέλι, σαν ιονόνη ανάλογα με τη συγκέντρωση (Sefton et al., 2011). Εξαιρετικής σημασίας είναι το μη ισοπρενοειδές β-ιονόνη (κατώφλι αντίληψης σε model wine, 0,09μg/l) και η β-δαμασκηνόνη (κατώφλι αντίληψης σε 10% αιθανόλη 0,05 μg/l). Επιπρόσθετα ενεργά αρωματικά μη ισοπρενοειδή στο κρασί περιλαμβάνουν το 1,1,6-τριμέθυλο-1,2-διυδρο-ναφθαλένιο (TDN), που σχετίζεται με το χαρακτήρα κηροζίνης σε παλαιωμένους οίνους Riesling και (E)-1-(2,3,6-τριμεθυλοφαινυλ)βουτα-1,3-διένιο (TPB), που μπορεί να σχετίζεται με το λουλουδάτο, σαν γεράνι ή σαν καπνός χαρακτήρας οίνων.

Ο σχηματισμός των μη ισοπρενοειδών πιστεύεται ότι συμβαίνει μετά από βιοαποδόμηση των αρχικών καροτενοειδών, που ακολουθείται από μία ενζυματική μετατροπή του πρόδρομου αρώματος (π.χ. ένα γλυκοζυλιωμένο ή άλλο πολικό ενδιάμεσο), και τελικά μία όξινο καταλύομενη μετατροπή του αρωματικού συστατικού. Μετά το σχηματισμό τους αυτές οι ενώσεις μπορεί να συνεχίσουν την αντίδραση με οξέα κατά την ωρίμανση του οίνου. Το ακριβές ενζυμικό σύστημα που εμπλέκεται στην αρχική βιοαποδόμηση και οξειδωτικό διαχωρισμό των καροτενοειδών προς σχηματισμό μη ισοπρενοειδών στο σταφύλι είχε περιγραφεί στη δεκαετία 90 και αργότερα αλλά πρόσφατα έγινε για *V.vinifera*. Το ένζυμο διοξυγενάση (CCD) διασπά το μόριο στους διπλούς δεσμούς 9,10 και 9', 10'. Τέσσερις υποοικογένειες έχουν αναγνωρισθεί- CCD1, CCD4, CCD7 και CCD8-και η διάσπαση μπορεί να είναι συμμετρική ή ασύμμετρη ανάλογα με το ένζυμο και το καροτενοειδές υπόστρωμα (Young et al., 2012). Πρόσφατες έρευνες πάνω σε ρίζες

*Crocus sativa*, ρύζι και μυκόρριζες *Medicago truncatula* δείχνουν ότι το CCD4 και CCD7 μπορεί να βρίσκονται στα πλαστίδια και τα αποκαροτενοειδή με 13 ή 27 άνθρακες στην αλυσίδα που σχηματίζονται μετά τη διάσπαση των αποκαροτενοειδών εξάγονται στο κυτταρόπλασμα όπου επιπλέον διάσπαση από CCD1 λαμβάνει χώρα, αποδίδοντας αποκαροτενοειδή παράγωγα με 13 και 14 άτομα άνθρακα. Τα CCD7 και CCD8 πιστεύεται ότι εμπλέκονται στο σχηματισμό στριγολακτόνης, μία φυτική ορμόνη που καθυστερεί τη διακλάδωση των βλαστών (Ruyter-Spira et al., 2013). Η αύξηση έκφρασης ενός CCD4 γονιδίου μετά τον περκασμό δείχνει ότι παίζει ρόλο στην ωρίμανση των ραγών.

Περαιτέρω έρευνα σε αυτή την περιοχή απαιτείται για καλύτερη κατανόηση του πως τα συμπληρώματα των CCD ενζύμων λειτουργούν σε πραγματικές συνθήκες. Επιπρόσθετα, μία πρόσφατη έρευνα παρατήρησε ότι η κυτταρική καλλιέργεια των σταφυλιών μπόρεσε να μεταβολίσει τα πτητικά C13-μη ισοπρενοειδή β-ιονόνη και αφυδροβομιφολιόλη σε δευτερογενή μη ισοπρενοειδή δείχνοντας ότι οι υδροξυλάσες, οξειδοαναγωγάσης και γλυκεροτρανσφεράση μπορεί να είναι σημαντικά στη βιομετατροπή αυτών των καροτενοειδών διασπασμένων παραγώγων.

### **1.1.5 Φαινυλοπροπανοειδή**

Η βιοσύνθεση πτητικών φαινυλοπροπανοειδών δεν έχει μελετηθεί εκτεταμένα στο σταφύλι, αν και ένα πλήθος οργάνων- και ειδών- ειδικών αφυδρογονασών, αναγωγάσης, μεθυλτρανφερασών και ακετυλοτρανσφερασών που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση πτητικών φαινυλοπροπανοειδών έχουν αναγνωρισθεί σε άλλα φυτικά συστήματα. Όμως, λίγα είναι γνωστά σχετικά με τα βιοσυνθετικά μονοπάτια που οδηγούν στο σχηματισμό τους στα φυτά. Για παράδειγμα, ενώ πτητικά φαινυλοπροπανοειδή, όπως η φαινυλαιθανόλη, φαινυλακεταλδεΰδη, βενζαλδεΰδη γενικά πιστεύεται ότι προέρχονται από την L-φαινυλαλανίνη, που σχηματίζεται από το μονοπάτι του σικιμικού οξέος στα πλαστίδια, ένα εναλλακτικό μονοπάτι μέσω του φαινυλοπυροσταφυλικού πρόσφατα προτάθηκε. Το φαινυλοπροπανοειδές μονοπάτι επίσης οδηγεί στο σχηματισμό άλλων σημαντικών δευτερογενών μεταβολιτών στα σταφύλια, που περιλαμβάνουν υδροξυκινναμικό, στιλβένια, λιγνίνη, λιγνάνη, φλαβόνες, ισοφλαβονοειδή καθώς και φλαβονοειδή, που περιέχουν φλαβονόλες,

τανίνες και ανθοκυάνες (Singh et al., 2010). Τα φλαβονοειδή είναι ιδιαίτερα σημαντικά για την αίσθηση στόματος στους ερυθρούς οίνους.

Το φαινολικό περιεχόμενο στο κρασί εξαρτάται, κατα κύριο λόγο, από το φαινολικό περιεχόμενο του σταφυλιού, που επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, όπως η ποικιλία, η ωρίμανση του σταφυλιού, διαφορές στο διαθέσιμο νερό και θρεπτικά, το φως και η θερμοκρασία περιβάλλοντος και μεταβολές στους εχθρούς και ασθένειες. Δεύτερον, εξαρτάται από την εκχυλισσιμότητα των φαινολικών που επηρεάζεται από τα υλικά του κυτταρικού τοιχώματος και πλήθος ερυθρών οινολογικών πρακτικών. Είναι πιθανό ότι παρόμοιοι μεταβλητές θα επηρεάσουν το πτητικό φαινυλοπροπανοειδές περιεχόμενο των οίνων.

Τα πτητικά φαινυλοπροπανοειδή αξίζουν μεγαλύτερης προσοχής επειδή έχει παρατηρηθεί αφθονία σε υδρολυόμενα γλυκοζίδια που έχουν απομονωθεί σε μούστο και κρασί. Για παράδειγμα, μπορεί να αποτελούν το 10 με 20% του συνολικού υδρολυομένου πτητικού κλάσματος σε μούστο Chardonnay και το 51% του υδρολυομένου κλάσματος σε οίνο Tannat. Έχει αποδειχθεί ότι συνεισφέρουν σημαντικά αρώματα ξεραμένου σύκου, καπνού και σοκολάτας σε μούστο Cabernet sauvignon και Merlot. Ένα από τα πιο ενδιαφέροντα πτητικά φαινυλοπροπανοειδή με προέλευση το σταφύλι είναι το μέθυλοanthranilate που θεωρείται υπεύθυνο για το ξεχωριστό «foxy» άρωμα του Washington Concord σταφυλιού (*Vitis labrusca*) και μπορεί να συμμετέχει στο άρωμα Pinot noir. Αρχικά αναγνωρίστηκε σε χυμό σταφυλιού το 1921, το methyl anthranilate υπήρξε μία κυρίαρχη ένωση στο άρωμα για κολώνιες και για καλλυντικά και είναι η ένωση που προσδίδει γεύση σταφυλιού στο φαγητό, και που έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα στον αρωματισμό αναψυκτικών και ποτά σε σκόνη (Wang & De Luca, 2005).

Είναι επίσης κατανοητό ότι τα πτητικά φαινυλοπροπανοειδή υπάρχουν στο κρασί μέσω επαφής με εξωτερικές πηγές. Η πιο κοινή είναι από δρύινα (*Quercus* sp.) βαρέλια που χρησιμοποιούνται για τη ζύμωση ή για την παλαίωση. Πάνω από 50 πτητικά φαινυλοπροπανοειδή έχουν ταυτοποιηθεί στον καπνό από πυρολυμένο (καμένο) δρυ. Πρόσφατα, αποδείχθηκε ότι διάφορα φαινυλοπροπανοειδή μπορεί να περάσουν στο σταφύλι μέσω έκθεσης σε καπνό στον αμπελώνα και αυτά τα φαινυλοπροπανοειδή μπορεί να ελευθερωθούν από μη πτητικά σύμπλοκα σε μούστο και κρασί.



Ο *Saccharomyces cerevisiae* μεταβολίζει τα αρωματικά αμινοξέα, μεταξύ των οποίων η φαινυλαλανίνη και η τυροσίνη, και παράγονται υποκαταστημένα φαινυλοπροπανοειδή όπως η φαινυλαιθυλαλκοόλη και το 2-φαινυλαιθυλοξικό. Αυτές οι ενώσεις που μοιάζουν με του τριαντάφυλλου, λουλουδιού, μελιού, θεωρείται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στο άρωμα λευκών οίνων, καθώς τυπικά βρίσκονται σε συγκεντρώσεις πάνω από το κατώφλι αντίληψης. Ο *Brettanomyces* sp. και η μορφή ασκομύκητα *Dekkera* είναι αναγνωρισμένοι για τη συνεισφορά πτητικών φαινυλοπροπανοειδών σε κρασί μέσω διάσπασης των υδροξυκιναμωμικών οξέων σε βινυλοφαινόλη και στη συνέχεια σε αιθυλοφαινόλες. Οι αιθυλοφαινόλες θεωρούνται επιζήμιες για την αποδοχή του κρασιού από τους καταναλωτές, δίνοντας οσμή δέρματος και σταύλου στο κρασί. Ζύμες από *Brettanomyces* και *Dekkera* περιέχουν ένα ένζυμο φαινολικού οξέος δεκαρβοξυλάση που μετατρέπει το υδροξυκιναμωμικό οξύ στο βινυλο παράγωγό τους, που είναι υπόστρωμα για το ένζυμο βινυλοφαινόλη ρεδουκτάση, του οποίου η δραστηριότητα παράγει αιθυλοφαινόλες (Harris et al., 2008). Πολλά βακτήρια, μύκητες και ζύμες έχουν δραστηριότητα ρεδουκτάσης, αλλά σε οινολογικές πρακτικές κυρίαρχα ο *Brettanomyces* και *Dekkera* παράγουν αιθυλοφαινόλες. Άλλες έρευνες έχουν αναγνωρίσει πλήθος γαλακτικών βακτηρίων που είναι ικανά να αποκαρβοξυλιώνουν φαινολικά οξέα προς βινυλοφαινόλες ενώ πολύ λίγα έχουν ένζυμα προς παραγωγή αιθυλοφαινολών.

Συνολικά, τα πτητικά φαινυλοπροπανοειδή και βενζενοειδή είναι ένα μίγμα πτητικών ενώσεων που αποτελείται από διάφορες πηγές και μπορούν να συνεισφέρουν σημαντικά στο άρωμα.

### **1.1.6 Παράγωγα φουράνιου και φουρανόνες**

Τα παράγωγα φουράνιου, που συμπεριλαμβάνουν τη φουρφοουράλη και τη 5-μεθυλφουρφοουράλη σχηματίζονται από τη πυρόλυση υδατανθράκων κατά το κάψιμο του ξύλου δρυός (και οπότε μεταφέρονται στο κρασί κατά την παραμονή στο βαρέλι) ή από αντίδραση Maillard κατά τη θέρμανση σταφυλιών και κρασιών. Οι φουρφοουράλες προσδίδουν αρώματα καμένου, καραμέλας στο κρασί, αυξάνοντας τη συνολική αντίληψη της έντασης δρυός, ανεξάρτητα από τις χαμηλές τιμές αρωματικής έντασης που έχουν. Η συγκέντρωση των φουράνιων στο κρασί,

προερχόμενα από το ξύλο δρυός, εξαρτάται από το βαθμό καψίματος της επιφάνειας του δρύινου βαρελιού, τα διάφορα είδη και την ωρίμανση ενώ έχουν ποίκιλη επίδραση και περιορισμένη επίδραση.

Η σοτολώνη (3-υδροξυ-4,5-διμεθυλοφουραν-2(5H)-όνη), μία χειρόμορφη φουρανόνη, είναι υπεύθυνη για την γρήγορη γήρανση του αρώματος γεύσης σε ξηρούς λευκούς οίνους. Σχηματίζεται από οξειδωτική αποδόμηση του ασκορβικού οξέος το οποίο μπορεί να προστεθεί ως αντιοξειδωτικό σε κάποια κρασιά πριν την παλαίωση. Το ενδιάμεσο προϊόν αυτής της αντίδρασης, το 2-κετοβουτυρικό οξύ, παράγεται επίσης κατά την αλκοολική ζύμωση, και η αντίδραση μεταξύ του κετο οξέος με ακεταλδεϋδη μπορεί να εξηγήσει την παρουσία σοτολώνης σε οίνους ακόμα και όταν δεν έχει προστεθεί ασκορβικό οξύ.

Τα παράγωγα φουρανόνης έχει επίσης παρατηρηθεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στο άρωμα ενός πλήθους φρούτων, συμπεριλαμβανομένων της φράουλας (*Fragaria x ananassa*), blackberry (*Rubus* L. Subgenus *Rubus* and *Rubus laciniatus*), guava (*Psidium guajava*), και ανανάς (*Ananas comosus*). Μία από τις σημαντικές ενώσεις σε αυτές τις έρευνες, η φουρανεόλη, για πρώτη φορά παρατηρήθηκε στο κρασί από τους Rapp et al. (Rapp et al., 1980) και βρέθηκε σε υβρίδια του γένους *Vitis* (π.χ. *Baco and Villard noir*), σε ποικιλίες *V.lambrusca* (π.χ. *Noah and Isabella*), και σε ποικιλίες *V.vinifera* (π.χ. *Carignan* και *Gewurztraminer*). Μία πρόσφατη έρευνα ιταλικών ποικιλιών *V.vinifera* έχουν επίσης δείξει ότι η φουρανεόλη είναι σημαντική στο άρωμα των *Refosco* και *Primitivo* (επίση γνωστή και ως *Zinfandel* στις Ηνωμένες Πολιτείες και *Crljenak kastelanski* ή *Pribidrag* στην Κροατία. Οι ενώσεις φουρανεόλη και ομοφουρανεόλη έχουν χαμηλό κατώφλι, 5 και 125 μg/l, αντίστοιχα, και έχουν ένα προσθετικό ή συνεργιστικό ρόλο στη μεταφορά χαρακτήρα φρουτώδους, καραμέλας σε ροζέ οίνους. Η βιοσύνθεση της φουρανεόλης έχει μελετηθεί στην φράουλα και ένζυμα κλειδιά έχουν ταυτοποιηθεί, όμως, οι μηχανισμοί σχηματισμού στα σταφύλια και στο κρασί παραμένουν άγνωστοι.

Οι φουρανόνες είναι ξεκάθαρα σημαντικοί βοηθητές του αρώματος και έχουν προέλευση το ξύλο δρυός αλλά και τον καρπό. Παρόλα αυτά, περισσότερη έρευνα στη βιοχημική και χημική προέλευση αυτών των ενώσεων είναι απαραίτητη για καλύτερη κατανόηση των παραγόντων που επηρεάζουν τη συγκέντρωση και ποικιλία αυτών των ενώσεων στο κρασί.

### 1.1.7 Παράγωγα λιπαρών οξέων

Στα φυτά, ένα πλήθος αλκοολών με ευθεία ανθρακική αλυσίδα, αλδεΐδες, κετόνες, οξέα, εστέρες και λακτόνες προέρχονται από τα λιπαρά οξέα μέσω α- ή β-οξειδώσεως ή μέσω του μονοπατιού της λιποξυγενάσης. Οι κύριες αρωματικές ενώσεις που προέρχονται από λιπαρά οξέα στο σταφύλι τείνουν να είναι οι C6-αλδεΐδες και οι αλκοόλες, πολλές από τις οποίες θεωρούνται υπεύθυνες για τα «πράσινα» αρώματα στο μούστο, αν και μπορεί να έχουν μικρότερη επίδραση στο κρασί (Kotseridis & Baumes, 2000). Οι ενώσεις με έξι άτομα άνθρακα γενικά σχηματίζονται από τη δράση της λιποξυγενάσης (LOX), υποξειδίου της λυάσης (HPL), της (3Z)-(3E) ισομεράσης και της αφυδρογονάσης αλκοόλης (ADH), ένζυμα που προέρχονται από το σταφύλι και συνθέτονται, ενεργοποιούνται και/ή ελευθερώνονται σε κομμάτια διαφορετικά από το υπόστρωμα κατά το σπάσιμο του σταφυλιού. Οι ενώσεις με έξι άτομα άνθρακα μπορούν λειτουργήσουν επίσης ως υπόστρωμα για παραγωγή εστέρων από τις ζύμες κατά την αλκοολική ζύμωση.

Η άλλη μεγάλη κατηγορία ενώσεων που προέρχεται από τα λιπαρά οξέα είναι οι γ-(4) και δ-(5) λακτόνες που προέρχονται από τα αντίστοιχα 4- ή 5- υδροξυ καρβοξυλικά οξέα. Τα ένζυμα που εμπλέκονται στη σύνθεση αυτών των ενώσεων δεν έχουν προσδιοριστεί στα φυτά, και επομένως, λίγα είναι γνωστά για το σχηματισμό τους στο σταφύλι. Οι δ- λακτόνες γενικά έχουν μικρότερη σημασία από τις γ-λακτόνες, που έχουν κατώφλι αντίληψης μία τάξη μεγέθους χαμηλότερα για ενώσεις με παρόμοιο μοριακό βάρος. Οι γ- και δ- λακτόνες έχουν ταυτοποιηθεί στο κρασί. Όμως η συνεισφορά τους στο άρωμα δεν έχει επιβεβαιωθεί ακόμα. Μία πρόσφατη έρευνα δείχνει ότι, ενώ καμία γ-λακτόνη δεν έχει βρεθεί σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από το κατώφλι αντίληψης, οι λακτόνες συνδυαστικά μπορεί να συνεισφέρουν στο άρωμα μέσω συνέργειας. Αντίθετα, μία άλλη εργασία συσχέτισε τα διάφορα επίπεδα γ-νοναλακτόνης με αρώματα σαν αυτό του δαμάσκηνου σε παλαιωμένους ερυθρούς οίνους, και πλήθος εργασιών έχουν συσχετίσει τις γ- και δ-λακτόνες με το άρωμα οίνων, από σταφύλι προσβεβλημένο με βοτρυτή, Sauternes, Barsac, Loupiac, Campania (sweet Fiano wines) και Hungary (Tokaji Aszu). Καθώς λιγότερα είναι γνωστά για την προέλευση των παραγώγων λιπαρών οξέων σε σύγκριση με άλλες πτητικές ομάδες ενώσεων προερχόμενων από το σταφύλι,

περαιτέρω έρευνα απαιτείται για την καλύτερη κατανόηση για το σχηματισμό αλλά και τη συνεισφορά τους στο άρωμα του οίνου.

### **1.1.8 Πτητικά οξέα, εστέρες και ανώτερες αλκοόλες προερχόμενες από σάκχαρα και αμινοξέα**

Είναι κατανοητό ότι οι πτητικοί μεταβολίτες από ζύμες και βακτήρια, περιλαμβάνουν τα πτητικά λιπαρά οξέα, εστέρες, ανώτερες αλκοόλες και καρβονύλια παράγονται μέσω του μεταβολισμού των σακχάρων και αμινοξέων. Πολλές από αυτές τις ενώσεις μπορεί να παραχθούν από τα φυτά, αλλά η έρευνα πάνω στο κρασί έχει εστιάσει στη συνεισφορά της μικροχλωρίδας από τη στιγμή που η πλειοψηφία των πτητικών λιπαρών οξέων, εστέρων και ανώτερων αλκοολών απουσιάζουν από το μούστο και σχηματίζονται κατά την αλκοολική ζύμωση.

### **1.1.9 Λιπαρά οξέα**

Οι ζύμες παράγουν λιπαρά οξέα μικρής (<6), μεσαίας (6-12) ή μεγάλης (>12) ανθρακικής αλυσίδας, με αυτά της μικρής και μεσαίας αλυσίδας να αποτελούν τα πτητικά λιπαρά οξέα. Η πλειοψηφία των λιπαρών οξέων που παράγονται από τις ζύμες είναι μεγάλης ανθρακικής αλυσίδας, όπως το παλμιτικό (16 άτομα άνθρακα), το στεατικό (18 άτομα άνθρακα) οξύ. Παρόλα αυτά, αυτά είναι πολύ μεγάλα και μη πτητικά για να συνεισφέρουν στο άρωμα του οίνου. Το μικρής αλυσίδας λιπαρό οξύ οξικό οξύ (2 άτομα άνθρακα) αποτελεί το 90% των πτητικών λιπαρών οξέων στο κρασί και σχηματίζεται ως μεταβολικό ενδιάμεσο κατά τη σύνθεση ακέτυλου συνένζυμου Α (ακέτυλο-CoA) από πυροσταφυλικό οξύ.

Τα λιπαρά οξέα μικρής αλυσίδας που εν δυνάμει συμμετέχουν στο άρωμα και γεύση του κρασιού περιλαμβάνουν το διακλαδισμένης αλυσίδας ισοβουτυρικό και ισοβαλερικό οξύ καθώς και το ευθείας αλυσίδας βουτυρικό και προπανοϊκό οξύ, αλλά ο ρόλος αυτών των ενώσεων στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά δεν έχει μελετηθεί εκτεταμένα. Το ισοβουτυρικό και ισοβαλερικό οξύ έχουν σημειωθεί ως δείκτες της μόλυνσης από *Brettanomyces bruxellensis* και πιστεύεται ότι έχουν την ικανότητα να καλύπτουν το «χαρακτήρα Bret» που αποδίδεται στην 4-αιθυλοφαινόλη και 4-

αιθυλγουαγιακόλη, που είναι κατά κάποιο τρόπο δυσνόητο (Romano et al., 2009), από τη στιγμή που τα λιπαρά οξέα μικρής αλυσίδας έχουν μυρωδιά που μοιάζει με τυρί, ιδρώτα (Francis & Newton, 2005).

Τα λιπαρά οξέα μεσαίας αλυσίδας, εξανοϊκό, οκτανοϊκό, δεκανοϊκό, επίσης συνεισφέρουν στο άρωμα του οίνου (Francis & Newton, 2005), και οι συγκεντρώσεις τους εξαρτώνται από τις αναερόβιες συνθήκες αύξησης, τη σύνθεση του μούστου, την καλλιέργεια του αμπελιού, το στέλεχος του ζυμομύκητα, τη θερμοκρασία ζύμωσης και τις οινολογικές πρακτικές. Τα μεσαίας αλυσίδας λιπαρά οξέα συσχετίζονται με σταματημένες ή αργές ζυμώσεις, καθώς η παρουσία τους είναι ανασταλτική για το *S. Cerevisiae* και για κάποια βακτήρια. Το ανασταλτικό φαινόμενο των μεσαίας αλυσίδας λιπαρών οξέων συνήθως παρατηρείται σε συνθήκες χαμηλού pH, χαμηλής θερμοκρασίας και υψηλά ποσοστά αιθανόλης. Ωστόσο, μία έρευνα δείχνει ότι η κυτταρική αύξηση σταματάει επειδή η βιοσύνθεση λιπαρών οξέων εμποδίζεται από την έλλειψη οξυγόνου και η αύξηση μεσαίας αλυσίδας λιπαρών οξέων δεν είναι η πρώτη αιτία που προκαλεί μία σταματημένη ζύμωση.

### **1.1.10 Εστέρες**

#### **1.1.10.1 Εστέρες στον οίνο**

Οι εστέρες είναι συστατικά της γεύσης που εμφανίζονται ευρέως σε μία ποικιλία τροφίμων. Στα ποτά που προέρχονται μετά από ζύμωση όπως το κρασί και μύρα, είναι συχνά σε ίχνη, έτσι ώστε ξεχωριστά το καθένα βρίσκεται συχνά σε συγκέντρωση που δεν ξεπερνά το κατώφλι αντίληψης του αρώματος, και ομαδικά γενικά δεν υπερβαίνουν τις συγκεντρώσεις των 100 mg/l. Εν τούτοις, ως ομάδα αυτές οι ενώσεις είναι τα πιο σημαντικά συστατικά στον οίνο μετά από το νερό, την αιθανόλη και τις αλκοόλες της ζύμωσης, και είναι η πρωταρχική πηγή των φρουτοδών αρωμάτων. Ως τέτοιοι, οι εστέρες είναι εξαιρετικά σημαντικοί για το προφίλ της γεύσης των ζυμωμένων ποτών, με την παρουσία διαφορετικών εστέρων συχνά να έχουν συνεργιστική επίδραση, έχοντας αντίκτυπο σε κάθε μεμονωμένη γεύση αρκετά κάτω από τις ατομικές συγκεντρώσεις του κατωφλίου αντίληψης. Το γεγονός ότι οι περισσότεροι εστέρες στον οίνο εμφανίζονται σε συγκεντρώσεις κοντά

στο κατώφλι αντίληψης, αλλαγές συγκέντρωσης είναι πολύ πιθανό να έχουν μια σημαντική επίδραση στις οργανοληπτικές ιδιότητες του οίνου. Η κατανόηση επομένως της υδρόλυσης/σύνθεσης των εστέρων βοηθάει ουσιαστικά τον οινοποιό να πετύχει το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα στην οινοποίηση.

#### **1.1.10.2 Σχηματισμός εστέρων**

Οι εστέρες σχηματίζονται όταν η αλκοόλη και οι λειτουργικές ομάδες του καρβοξυλικού οξέος αντιδρούν, και ένα μόριο νερού αποβάλλεται. Στον οίνο, οι εστέρες μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο ομάδες, σε εκείνους που σχηματίζονται ενζυμικά και εκείνους που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της παλαίωσης του οίνου, με χημική εστεροποίηση μεταξύ της αλκοόλης και των οξέων σε χαμηλό pH. Η ενζυμική σύνθεση των εστέρων καταλύεται από τις εστεράσες και τις λιπάσες, οι οποίες παράγονται από πολλούς μικροοργανισμούς των τροφίμων. Η σύνθεση των εστέρων μπορεί επίσης να καταλυθεί από τις αλκοολικές ακετυλοτρανσφεράσες. Παραδείγματα ενζυμικά σχηματισμένων εστέρων περιλαμβάνουν τον οξικό, τον βουτανοϊκό, τον εξανοϊκό και τον οκτανοϊκό αιθυλεστέρα. Λόγω της πολύπλοκης φύσης του, ο οίνος υπόκειται σε συνεχείς αλλαγές στη σύνθεση κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης και ακόμα και μετά από το άνοιγμα του μπουκαλιού. Αυτό μπορεί να είναι λόγω της υδρόλυσης και της εστεροποίησης ή θα μπορούσε να προκληθεί από την οξειδωση των εστέρων μέσω διαδικασιών που σχετίζονται με τις ρίζες υδροξυλίου. Με δεδομένο το μεγάλο αριθμό διαφορετικών οξέων και αλκοολών στον οίνο υπάρχει μεγάλη πιθανότητα για το σχηματισμό ενός μεγάλου εύρους, φάσματος εστέρων, πολλοί από τους οποίους βρίσκονται στην πραγματικότητα στον οίνο. Οι C4-C10 αιθυλεστέρες των οργανικών οξέων, οι αιθυλεστέρες της ευθείας αλυσίδας των λιπαρών οξέων (οι αιθυλεστέρες της διακλαδισμένης αλυσίδας των λιπαρών οξέων σε μικρότερο βαθμό) και τα οξικά άλατα των ανώτερων αλκοολών είναι κατά ένα μεγάλο μέρος, εάν όχι αποκλειστικά, υπεύθυνα για το φρουτώδες άρωμα του οίνου και είναι ιδιαίτερα έντονα στους νέους οίνους. Οι αιθυλεστέρες αποτελούνται από μια αλκοολική ομάδα (αιθανόλη) και μια όξινη ομάδα (λιπαρό οξύ μέσης αλυσίδας), και περιλαμβάνουν τον εξανοϊκό, τον οκτανοϊκό και τον δεκανοϊκό αιθυλεστέρα. Οι εστέρες των οξικών αλάτων αποτελούνται από μια όξινη ομάδα (οξικό άλας) και μία αλκοολική ομάδα που είναι είτε αιθανόλη είτε μία σύνθετη

αλκοόλη που προέρχεται από το μεταβολισμό των αμινοξέων, και περιλαμβάνει εστέρες όπως τον οξικό αιθυλεστέρα και τον οξικό ισοαμυλεστέρα. Η Μηλογαλακτική ζύμωση (ΜΛΖ) μπορεί επίσης να έχει αντίκτυπο στο εστερικό προφίλ του τελικού οινικού προϊόντος. Η αρωματική ένωση που παράγεται περισσότερο κατά τη διάρκεια της ΜΛΖ είναι ο 2-υδροξυπροπανοϊκός αιθυλεστέρας (γαλακτικός αιθυλεστέρας). Η παραγωγή του 2-υδροξυπροπανοϊκού αιθυλεστέρα συνδέεται με τον σχηματισμό του γαλακτικού οξέος και η σύνθεσή του μπορεί να συσχετιστεί με το ποσοστό αποικοδόμησης του μηλικού οξέος.

### **1.1.10.3 Επίπτωση στο άρωμα του οίνου**

Οι αιθυλεστέρες ως ομάδα έχουν ισχυρή επιρροή στο άρωμα του οίνου, με τον οξικό αιθυλεστέρα να είναι ποιοτικά ο πιο κοινός εστέρας στον οίνο, λόγω του έτοιμου σχηματισμού του από την κυρίαρχη αιθανόλη και το οξικό οξύ. Αυτό οφείλεται στην παρουσία μεγάλων ποσοτήτων αιθανόλης και στο γεγονός ότι οι πρωτοταγείς αλκοόλες είναι οι πιο δραστικές. Επομένως συχνά συνεισφέρει σημαντικά στο άρωμα του οίνου· σε χαμηλές συγκεντρώσεις (6100 mg/l) προσδίδοντας έναν επιθυμητό και φρουτώδη χαρακτήρα στον οίνο, εντούτοις, σε υψηλότερες συγκεντρώσεις μπορεί να μεταδώσει ένα άρωμα σαν διαλυτικό/βερνίκι νυχιών. Εστέρες που έχουν αναφερθεί ότι παρουσιάζονται στον οίνο σε συγκεντρώσεις επάνω από το κατώφλι αντίληψης του αρώματός τους περιλαμβάνουν τον 2-υδροξυπροπανοϊκό αιθυλεστέρα (μετά από ΜΛΖ), τον βουτανοϊκό, τον εξανοϊκό, τον οκτανοϊκό, τον δεκανοϊκό, τον οξικό, τον 2-μεθυλοπροπανοϊκό, τον 2-μεθυλοβουτανοϊκό, τον 3-μεθυλοβουτανοϊκό, τον κινναμωμικό αιθυλεστέρα, τον οξικό 2-φαινυλαιθυλεστέρα, τον οξικό 3-μεθυλοβουτυλεστέρα, και τον οξικό εξυλεστέρα. Καθώς το μήκος των αλυσίδων των υδρογονανθράκων αυξάνεται, αναπτύσσεται μία οσμή που μοιάζει με αυτή του σαπουνιού, με εστέρες σχηματισμένους από αλυσίδες υδρογονανθράκων λιπαρών οξέων C16 και C18 που έχουν περιγραφεί ότι μοιάζουν με λαρδί.

#### 1.1.10.4 Σχηματισμός κατά την αλκοολική ζύμωση

Ο σχηματισμός των εστέρων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης έχει περιγραφεί ως μία δυναμική διαδικασία, με την αλληλεπίδραση πολυάριθμων μεταβλητών. Οι μεταβλητές που είναι γνωστές ότι επηρεάζουν την παραγωγή των εστέρων και τη συγκέντρωσή τους περιλαμβάνουν την ποσότητα των εστέρων ή των προδρόμων τους που αρχικά παρουσιάζονται στο σταφύλι, τη θερμοκρασία της ζύμωσης, το στέλεχος της ζύμης που υπερισχύει και τις θρεπτικές ουσίες που υπάρχουν, ειδικά τη συγκέντρωση των αζωτούχων ενώσεων και των στερεών συστατικών του γλεύκους. Η μέση παραγωγή εστέρων και οι σχετικές αναλογίες από κάθε εστέρα εξαρτώνται ιδιαίτερα από το στέλεχος της ζύμης και η επίδραση άλλων παραμέτρων, όπως η θερμοκρασία, το οξυγόνο και το άζωτο, μπορεί επίσης να είναι εξαρτώμενη από το στέλεχος. Οι διαφορές εξειδικευμένων στελεχών μπορεί ακόμη να οφείλονται σε διαφορές στην έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στη σύνθεση των εστέρων.

Η επίδραση των διαφόρων μεταβλητών στη σύνθεση του οίνου είναι καλά τεκμηριωμένη. Παραδείγματος χάριν, μια πρόσφατη μελέτη που χρησιμοποίησε ένα εμπορικό στέλεχος ζύμης οινοποίησης ανέφερε ότι υπήρξαν υψηλότερες συγκεντρώσεις φρέσκων και φρουτωδών αρωμάτων έπειτα από ζύμωση σε 15°C, ενώ αντιτάχθηκε σε ζύμωση στους 28°C, η οποία παρήγαγε υψηλότερες συγκεντρώσεις ενώσεων με λουλουδάτο άρωμα. Η γενική πτητική σύνθεση των περισσότερων ποικιλιών σταφυλιών είναι παρόμοια παρά τις σαφείς διαφορές στα αρώματά τους. Οι περισσότερες ποικιλιακές διαφορές εμφανίζονται από αλλαγές στις σχετικές αναλογίες των πτητικών ενώσεων. Υπάρχει σημαντική μεταβλητότητα στην περιεκτικότητα σε εστέρες μεταξύ των διαφορετικών ποικιλιών σταφυλιών. Έχει βρεθεί ότι οι προερχόμενοι από τις ζύμες εστέρες συνδέονται έντονα με την ποικιλία του σταφυλιού. Οι Gurbuz et al. (2006) ανέφεραν επίσης ότι το αυστραλιανό Merlot είχε μεγαλύτερο μέρος εστέρων (83%) μεταξύ των προσδιορισμένων πτητικών ουσιών, έναντι του καλιφορνέζικου Merlot (60%) και του Cabernet Sauvignon από τις ίδιες πηγές. Αυτή η μελέτη χρησιμοποίησε διαθέσιμα εμφιαλωμένα κρασιά εμπορίου αλλά από την ίδια περιοχή (Barossa Valley στην Αυστραλία και Napa Valley στις ΗΠΑ), εντούτοις οι διαφορές στην πρακτική οινοποίησης δεν ελήφθησαν υπόψη.



#### 1.1.10.5 Σχηματισμός κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση

Ανάλογα με το στυλ του οίνου που ο οινοποιός επιδιώκει να πετύχει, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η ΜΛΖ. Η ΜΛΖ περιλαμβάνει βιομετατροπή του μηλικού οξέος σε γαλακτικό οξύ και διοξείδιο του άνθρακα, και βελτιώνει τη βιολογική σταθερότητα του οίνου παρεμποδίζοντας τη χρησιμοποίηση του μηλικού οξέος από οργανισμούς αλλοίωσης μετά την εμφιάλωση του οίνου. Αυτή η δευτερογενής ζύμωση τυπικά πραγματοποιείται από έναν ή περισσότερους πληθυσμούς βακτηρίων γαλακτικού οξέος (ΒΓΟ). Οι ομάδες των ΒΓΟ που συνδέονται συνηθέστερα με τη ΜΛΖ είναι τα *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus* sp. και *Pediococcus* sp. τα οποία φαίνεται να τροποποιούν και ενδεχομένως να συνθέτουν φρουτώδη αρώματα κατά τη διάρκεια της ΜΛΖ, επομένως έχουν τεράστια δυνατότητα να επηρεάσουν τη σύνθεση του οίνου.

#### 1.1.11 Αλκοόλες

Ο *Saccharomyces cerevisiae* παράγει την πλειοψηφία των ανώτερων αλκοολών κατά το μεταβολισμό των σακχάρων, παράγοντας τις πρόδρομες ενώσεις α-κετονοξέα, από πυροσταφυλικό και ακέτυλο-CoA μέσω του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων (TCA). Εναλλακτικά, οι ανώτερες αλκοόλες μπορεί να παραχθούν όταν οι ζύμες καταβολίζουν αμινοξέα μέσω του μονοπατιού του Ehrlich. Μέσω αυτής της οδού, τα αμινοξέα καταναλώνονται πλήρως κατά τα πρώτα στάδια αύξησης των ζυμών, που έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή αντίστοιχων ανώτερων αλκοολών κατά τη στάσιμη φάση των ζυμών.

Οι διακλαδισμένες ανώτερες αλκοόλες, μεταξύ των οποίων η ισοαμυλο αλκοόλη και ισοβουτυλ αλκοόλη, συνθέτονται από διακλαδισμένης αλυσίδας αμινοξέα και έχουν οσμή whiskey/ βύνης/ καμένου και κρασιού/ διαλύτη/ πικρού, αντίστοιχα. Τα αρωματικά αμινοξέα, που περιλαμβάνουν τη φαινυλαλανίνη και τυροσίνη, παράγουν αρωματικές αλκοόλες, όπως η φαινυλεθυλο αλκοόλη, που έχει άρωμα σαν μέλι/ μπαχαρικό/ τριαντάφυλλο/ πασχαλιά. Όπως ειπώθηκε προηγουμένως, η φαινυλοαιθυλο αλκοόλη θεωρείται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στο

άρωμα των λευκών οίνων, καθώς τυπικά βρίσκεται σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από το κατώφλι αντίληψης των 10 mg/l (Lopez et al., 2003).

### 1.1.12 Πυραζίνες

Οι 3-αλκυλο-2-μεθοξυπυραζίνες, που περιλαμβάνουν την 3-ισοβουτυλο-2-μεθοξυπυραζίνη (IBMP), 3-ισοπρόπυλο-2-μεθοξυπυραζίνη (IPMP), και τη δευτεροβουτυλο-2-μεθοξυπυραζίνη (SBMP), προσδίδουν οργανοληπτικά χαρακτηριστικά πράσινης πιπεριάς, σπαραγγιού ή μπιτζελιού στους οίνους και είναι ανιχνεύσιμα σε συγκεντρώσεις ng/l. Αρχικά, ανιχνεύτηκαν σε πράσινη πιπεριά (*Capsicum annuum* var. *grossum*), αυτές οι πυραζίνες με πράσινο άρωμα επίσης υπάρχουν στις καυτερές πιπεριές (*Capsicum annuum* var. *Annuum*), στο μπιζέλι (*Pisum sativum*), στην πατάτα (*Solanum tuberosum*) και στο τυρί. Αν και η αναλυτική ανίχνευση αυτών των ενώσεων σε τόσο χαμηλές συγκεντρώσεις έκανε την έρευνα δύσκολη, είναι πια κοινή γνώση ότι οι μεθοξυπυραζίνες παίζουν σημαντικό ρόλο στο άρωμα του χυμού αλλά και του οίνου Sauvignon blanc, Cabernet sauvignon, Cabernet franc, Merlot και Carmenere. Χαμηλά επίπεδα μεθοξυπυραζινών συνεισφέρουν στον ποικιλιακό χαρακτήρα αυτών των οίνων και είναι επιθυμητά για το στυλ ορισμένων οίνων, παρόλα αυτά, υψηλά επίπεδα θεωρούνται ανεπιθύμητα. Οι μεθοξυπυραζίνες βρέθηκαν σε συγκεντρώσεις κάτω από το κατώφλι αντίληψης σε άγουρα Pinot noir, Chardonnay και Riesling, αλλά είναι αδιευκρίνιστο αν αυτό οφείλεται σε άλλους ιστούς όπως τους μίσχους και έλικες που είναι παρόντες κατά την πίεση και εκχύλιση.

Έχει ειπωθεί ότι η ενζυματική μεθυλίωση των πρόδρομων ουσιών υδροξυπυραζινών προς μεθοξυπυραζίνων από O-μεθυλοτρανσφεράσες (OMT) είναι ένας σημαντικός παράγοντας για τον προσδιορισμό του επιπέδου της συσσώρευσης μεθοξυπυραζινών στις ράγες σταφυλιών (Dunlevy et al., 2010). Τα θεωρητικά γονίδια, που περιλαμβάνουν τα VvOMT1 και VvOMT3, που κωδικοποιούν γονίδια ικανά για τη μεθυλίωση των υδροξυπυραζινών έχουν ταυτοποιηθεί σε σταφύλι της ποικιλίας Cabernet Sauvignon. Το γονίδιο VvOMT3 ειδικότερα παρουσιάζει μεγάλη συγγένεια με το υπόστρωμα υδροξυπυραζινών και έχει βρεθεί σε σταφύλια άλλων ποικιλιών γνωστά για τα υψηλά επίπεδα IBMP, που περιλαμβάνουν τις Cabernet franc, Sauvignon blanc, Merlot, Semillon, Fer, Ruby Cabernet και Roussane. Η

έκφραση των γονιδίων ήταν υψηλότερη στο διάστημα μεταξύ 4 και 8 εβδομάδων μετά την άνθηση και έπεφτε σε χαμηλότερα επίπεδα μετά το γυάλισμα, και συμπίπτει με τη συσσώρευση μεθοξυπυραζινών στο σταφύλι. Αν και οι μεθοξυπυραζίνες υπάρχουν σε άλλους ιστούς του αμπελιού, μεταξύ των οποίων η ράχη, τα άνθη, τις έλικες και τις ρίζες, αλλά όχι τα φύλλα, δεν μετακινούνται από αυτούς τους ιστούς στη ράγα (Koch et al., 2010).

Η έρευνα έχει δείξει ότι το περιεχόμενο του κρασιού σε αλκυλο μεθοξυπυραζίνες εξαρτάται κυρίως από τη σύσταση της ράγας (Roujou de Boubee et al., 2002). Οπότε, οι περισσότερες εργασίες έχουν κατευθύνει την διαχείριση των αλκυλο μεθοξυπυραζινών μέσω αμπελουργικών πρακτικών, ειδικά έμφαση δόθηκε στη λήψη φωτός στην ανθοταξία (Ryona et al., 2008).

Οι πυραζίνες υπήρξαν ειδικού ενδιαφέροντος στο σταφύλι και κρασί και ερευνητές λόγω του χαμηλού κατωφλιού αντίληψης και η συσχέτιση με τα χορτώδη αρώματα του Cabernet Sauvignon και Sauvignon blanc, και τα δύο εκτεταμένης φύτευσης και σημαντικής αξίας στην διεθνή αγορά. Περαιτέρω έρευνα στην κατανόηση του σχηματισμού αυτών των ενώσεων στο σταφύλι θα οδηγήσει στην ικανότητα καλύτερης διαχείρισης της συγκέντρωσής τους στα κρασιά για ειδικά τμήματα της αγοράς.

### **1.1.13 Πτητικές θειούχες ενώσεις**

Οι πτητικές ενώσεις που περιέχουν θείο αρχικά συσχετίστηκαν με αρνητικές οσμές κυρίως λόγω στα μόριο όπως το υδροθείο ( $H_2S$ ), μεθυλομερκαπτάνη (μεθανιόλη), αιθαναιθιόλη και μεθιονόλη. Παρόλα αυτά, πλέον κάτι τέτοιο δεν ισχύει με την ανακάλυψη ενός πλήθους πτητικών θειολών που μεταδίδουν ένα ευχάριστο βοτανικό, φρουτώδες, μεταλλικό, καπνιστό και καπνώδες άρωμα το κρασί (Dubourdieu & Tominaga, 2009). Οι μεγαλύτερες σε αφθονία πτητικές θειούχες ενώσεις στο κρασί είναι το υδρόθειο, η μεθανιόλη, οι διμεθυλομερκαπτάνες (διμεθυλοσουλφίδιο, διμεθυλοδισουλφίδιο, διμεθυλτρисуλφίδιο), μεθυλοθειοεστέρες (S-θειοοξικός μεθυλεστέρας, S-θειοπροπανοϊκος μεθυλεστέρας και S-θειολβουτανοϊκος μεθυλεστέρας) και ελεύθερη γλουταθειόνη και κυστεΐνη πολυλειτουργικές θειόλες (4-μερκαπτο-μεθυλοπενταν-2-όνη, 4MMP, 3-

μερκαπτοεξαν-1-όλη, 3ΜΗ και οξικός 3-μερκαπτοεξυλεστέρας, 3ΜΗΑ). Πολλές ακόμα ενώσεις που περιέχουν θείο έχουν ανιχνευτεί στο κρασί, υποδηλώνοντας ότι υπάρχει περιθώριο για περαιτέρω έρευνα (Dubourdieu & Tominaga, 2009).

Το υδρόθειο μπορεί να παραχθεί από τον *S. cerevisiae* μέσω της αποδόμησης των αμινοξέων που περιέχουν θείο (κυστεΐνη και γλουταθιόνη), της αναγωγής του αρχικού θείου ή της αναγωγής τωνθειωδών αλάτων καιθειϊκών αλάτων. Η παραγωγή υδροθείου ποικίλει ανάλογα με το στέλεχος της ζύμης και με την περιεκτικότητα του χυμού σε άζωτο. Γενικά είναι κατανοητό ότι η προσθήκη αζώτου, σε μορφή αμινοξέων, με την εξαίρεση της κυστεΐνης ή του αμμωνίου, μειώνει την παραγωγή υδροθείου από τη ζύμη. Αυτό συμβαίνει επειδή αυτές οι πηγές αζώτου είναι πρόδρομες ενώσεις για την σύνθεση της Ο-ακετυλοσερινίνης ή της Ο-ακετυλοομοσερινίνης, που είναι σημαντικές για τη σύνθεση της κυστεΐνης, μεθειονίνης και γλουταθιόνης. Η δραστηριότητα των Ο-ακετυλοσερινίνης/Ο-ακετυλοομοσερινίνηςθειουδρυλάσης (το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για την ενσωμάτωση ανηγμένου θείου σε οργανικές ενώσεις) δεν είναι ο μόνος σημαντικός παράγοντας για τη μείωση υδρόθειου, αλλά μάλλον η δραστηριότητα ενός συμπληρώματος από ένζυμα που εμπλέκονται στη σύνθεση της Ο-ακετυλο-L-ομοσερινίνης και ομοκυστεΐνης που βοηθούν στη μείωση υδρόθειου από *S. cerevisiae*. Αρκετό ενδιαφέρον παρουσιάζει μία πρόσφατη έρευνα που δηλώνει ότι τα θρεπτικά που χρησιμοποιούνται κατά την ενυδάτωση των ζυμών κατά τον εμβολιασμό μπορούν να επηρεάσουν το σχηματισμό υδρόθειου (και άλλων πτητικών ενώσεων) (Winter et al., 2011). Σε αυτή την έρευνα, η κινητική της παραγωγής υδρόθειου μεταβλήθηκε αλλά όχι και η έκφραση των γονιδίων το μονοπάτι αφομοίωσης τωνθειϊκών αλάτων. Οι συγγραφείς σημειώνουν ότι η χειραγώγηση των πρωτοκόλων για την ενυδάτωση των ζυμών ίσως να αποτελούν μία «δυναμική προσέγγιση για την διαχείριση τωνθειωδών αρωματικών ενώσεων στο κρασί» (Winter et al., 2011).

Η μεθειονίνη και κυστεΐνη θεωρούνται ρυθμιστές της οδού αναγωγής του θείου. Παρόλα αυτά, υπάρχει η υπόθεση ότι κάτω από αναερόβιες συνθήκες που συναντώνται κατά τη ζύμωση, η συγκέντρωση της κυστεΐνης μπορεί να παίξει ένα πιο σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στην αναγωγή του θείου. Έχει αποδειχθεί ότι η αντίδραση των ζυμομυκήτων στην προσθήκη κυστεΐνης με αύξηση της παραγωγής υδρόθειου σε σχέση με τη μεθειονόλη ενώ η προσθήκη της μεθειονίνης έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της μεθειονόλης σε σχέση με το υδρόθειο. Αυτό μπορεί

μερικώς να αποδοθεί στο ότι η κυστεΐνη παρεμποδίζει τη σερίνη Ο-ακετυλοτρανσφεράση, που χαμηλώνει τη κυτταρική συγκέντρωση της Ο-ακετυλοσερινίνης που απαιτείται για την διεξαγωγή του αναγωγικού μονοπατιού του θείου, και/ή κυστεΐνη παρεμποδίζει τα γονίδια που κωδικοποιούν την κυσταθειονίνη β-συνθάση και κυσταθειονίνη γ-λυάση επιπρόσθετα με γονίδια που εμπλέκονται στο μονοπάτι αναγωγής του θείου. Ένας αριθμός άλλων πτητικών θειωδών ενώσεων μπορεί να σχηματιστεί από αντιδράσεις με το υδρόθειο με άλλες οργανικές ενώσεις. Για παράδειγμα, το υδρόθειο σε συνδυασμό με αιθανόλη ή ακεταλδεΐδη σχηματίζει αιθανεθιόλη.

Το διμεθυλοσουλφίδιο (DMS) θεωρείται ότι σχηματίζεται από μικροβιακή αποδόμηση της μεθειονίνης και κυστεΐνης, αν και οριστικά μονοπάτια κατά την αλκοολική ζύμωση δεν έχουν αποτυπωθεί. Το διμεθυλοσουλφίδιο έχει σημειωθεί ότι αυξάνει την οσμή μαύρης ελιάς, τρούφας και θάμνου σε οίνους Syrah και επίσης μπορεί να ενισχύσει το φρουτώδες άρωμα σε ερυθρούς οίνους ως αποτέλεσμα πολύπλοκων αντιδράσεων με άλλα πτητικά συστατικά, μεταξύ των οποίων οι εστέρες και τα μη ισοπρενοειδή. Όμως, το DMS γενικά δεν θεωρείται ότι λειτουργεί θετικά στο άρωμα των λευκών οίνων από τη στιγμή που αυξάνει το άρωμα σπαραγγιού, καλαμποκιού και της μολάσας, αν και μπορεί να θεωρηθεί ότι αυξάνει την πολυπλοκότητα του αρώματος. Το DMS, η μεθειονόλη, το διαίθυλο σουλφίδιο και το διαίθυλο δισουλφίδιο αυξάνουν στο κρασί κατά την παλαίωση, και σε συνδυασμό με αύξηση θερμοκρασίας μπορεί να συμβάλλουν στο άρωμα παλαιωμένων οίνων.

Η μεθειονόλη συμμετέχει με αρώματα ωμής πατάτας ή κουνουπιδιού στο χαρακτήρα του κρασιού, και μπορεί να βρεθεί σε συγκεντρώσεις μέχρι 5 mg/l, και παράγεται είτε από τον *S. Cerevisiae* ή από τον *Oenococcus oeni* μέσω του καταβολισμού της μεθειονίνης. Συνεισφέρει και στο άρωμα μαγειρεμένων λαχανικών σε οξειδωμένους οίνους. Η συγκέντρωση της μεθειονάλης αυξάνει στους λευκούς οίνους όταν εκτίθενται σε αυξημένες θερμοκρασίες και οξυγόνο. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, η ένωση μπορεί να σχηματιστεί μέσω της αποδόμησης Strecker της μεθειονίνης σε μεθειονάλη με παρουσία δικαρβονυλικής ένωσης ή μέσω απευθείας υπεροξειδωσίας της μεθειονόλης.

Μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον έχει επικεντρωθεί προσφάτως σε μία ομάδα ενώσεων που περιέχουν θείο και αναφέρονται ως πολυλειτουργικές θειόλες, που

προσδίδουν ευχάριστα φρουτώδη αρώματα σε μία πληθώρα ποικιλιών, μεταξύ των οποίων Scheurebe, Sauvignon blanc, Gewurztraminer, Riesling, Colombard, Petit Manseng, Semillon, Cabernet sauvignon και Merlot. Οι πολυλειτουργικές θειόλες θεωρούνται σημαντικές για το πρωτογενές ποικιλιακό άρωμα των οίνων και σημειώνεται ότι έχουν χαμηλό κατώφλι αντίληψης, με τις 4MMP, 3MH και 3MHA ανιχνεύσιμες στο κρασί σε συγκεντρώσεις ng/l (Dubourdieu & Tominaga, 2009).

Οι πτητικές θειούχες ενώσεις είναι ένα ποικιλόμορφο γκρουπ ενώσεων με υψηλή αρωματική ενέργεια με πολλαπλή επίδραση λόγω της παρουσίας τους στο κρασί. Ξεκάθαρα, έχουν σημαντική συνεισφορά στο άρωμα του οίνου και δεδομένου του αριθμού των ενώσεων με θείο που έχουν ταυτοποιηθεί στο κρασί κατά την τελευταία δεκαετία, υπάρχει το δυναμικό να ανακαλυφθούν ακόμα περισσότερα σε αυτήν την περιοχή (Dubourdieu & Tominaga, 2009).

## **1.2 Περιβαλλοντικοί παράγοντες που επηρεάζουν το σχηματισμό αρωματικών ενώσεων στο σταφύλι**

Μία πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι το 18% περίπου των γονιδίων στο αμπέλι μπορεί να μεταβληθεί από περιβαλλοντικές συνθήκες και ότι το κλίμα έχει τη μεγαλύτερη επίδραση στην έκφραση γονιδίων κατά το γυάλισμα. Πιο συγκεκριμένα, τα γονίδια που σχετίζονται με φαινυλοπροπανοειδή και εμπλέκονται στον σχηματισμό αρωματικών ενώσεων και πολυφαινολών επηρεάστηκαν σημαντικά από τις εποχιακές ειδικές κλιματικές συνθήκες. Η έρευνα αναφέρει ένα πρόγραμμα σχετικά με μελλοντικές έρευνες με στόχο την ολοκληρωμένη γονιδιοματική πληροφόρηση των περιβαλλοντικών και αμπελουργικών επιδράσεων στη σύνθεση του σταφυλιού και του οίνου και στο άρωμα στόματος (Heymann & Cantu, 2013).

Η κατανόηση αυτών των αλληλεπιδράσεων μπορεί να αποδειχθεί ιδιαίτερα σημαντική καθώς οι επιδράσεις της αλλαγής του κλίματος στο μεταβολισμό στο πρέμνο, η ποιότητα του νερού και η διαθεσιμότητα, η ωρίμανση των ραγών και άλλες παράμετροι γίνονται πιο εμφανείς. Σε μία ενδιαφέρουσα πρόσφατη έρευνα, οι οργανοληπτικοί χαρακτήρες των ραγών (π.χ. αρώματα φρούτων και βοτάνων και το χυμώδες) επηρεάστηκαν από αυξημένες θερμοκρασίες κατά τη περίοδο της αύξησης ακόμα και όταν ο τρύγος έγινε κατά την ίδια ωριμότητα μετρημένη σε Brix. Αυτή η

εργασία είναι μοναδική στη χρήση ενός συστήματος θέρμανσης για να χειραγωγηθούν θερμοκρασίες στο εργαστήριο, με αρκετά καλή μίμηση των πραγματικών συνθηκών. Ξεκάθαρα, μελλοντικές καλά οργανωμένες εργασίες που θα έχουν ως στόχο την κατανόηση της επίδρασης των κλιματικών αλλαγών στη σύσταση του σταφυλιού και του οίνου και στην ποιότητα είναι κρίσιμες για την εξασφάλιση βιώσιμης παγκόσμιας παραγωγής σταφυλιών και κρασιού με επιθυμητές αρωματικές ιδιότητες.

Εργασίες πάνω στο ρόλο που παίζει το κλίμα στη σύσταση των ραγών μπορεί να είναι δύσκολο να αξιολογηθούν καθώς το κλίμα εμπεριέχει όλες τις κλιματικές συνθήκες της ηλιοφάνειας, θερμοκρασίας, υγρασίας και της βροχόπτωσης σε μία περιοχή, που όλες παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του πρέμνου και της ράγας. Επιπρόσθετα, τα επίπεδα των αρωματικών και των πρόδρομων αρωματικών ενώσεων ποικίλουν μεταξύ αλλά και εντός των διαφόρων κλιμάτων. Για παράδειγμα, τα επίπεδα λουτεΐνης, β-καροτενίου, 1,1,6-τριμέθυλο-1,2-διυδροναφθαλενίου (TDN) έχουν βρεθεί σε υψηλότερες συγκεντρώσεις σε οίνους από θερμότερα κλίματα (Νότιος Αφρική) σε σύγκριση με πιο ψυχρά (Γερμανία). Από την άλλη, η αντίστροφη σχέση που παρατηρείται μεταξύ των υψηλότερων επιπέδων μεθοξυπυραζίνων σε Sauvignon blanc από ψυχρά κλίματα (N. Ζηλανδία) σε σχέση με τα θερμά (Australia).

Το αν αυτές οι διαφορές οφείλονται στη θερμοκρασία, έκθεση στον ήλιο ή σε κάποια άλλη μεταβλητή που σχετίζεται με το διαφορετικό περιβάλλον δεν είναι ξεκάθαρο και αυτή η έλλειψη γνώσης κάνει δύσκολη την διάκριση επιδράσεων αυτών των ασύνδετων μεταξύ τους μεταβλητών. Στα παρακάτω κομμάτια αναλύονται η επίδραση του τρύγου, ηλιοφάνειας, ύδατος και διαχείρισης του φυλλώματος, η ωριμότητα των ραγών και πιέσεις από ασθένειες στη σύνθεση του αρωματικού προφίλ στο κρασί και στο σταφύλι.

### **1.2.1 Τρύγος**

Οι μοναδικές συνθήκες που επικρατούν ποικίλουν κάθε χρονιά και είναι γενικά αποδεκτό ότι ο τρύγος παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη σύσταση των ραγών. Έρευνες πάνω στην αρωματική σύνθεση σε Chardonnay, Sauvignon blanc, Semillon,

Merlot noir και Melon B έχουν επιβεβαιώσει αυτή την παρατήρηση σε αναλυτικό επίπεδο. Η παγκόσμια κλιματική αλλαγή μπορεί να οξύνει τις μεταβολές από χρονιά σε χρονιά, κάνοντας την κατανόηση αυτού του ζητήματος μεγάλης συσχέτισης με τους αμπελουργούς (Schultz, 2000).

### **1.2.2 Ηλιοφάνεια**

Τα επίπεδα πολυάριθμων αρωματικών ενώσεων στο σταφύλι επηρεάζονται από την έκθεση στο φως. Για παράδειγμα, η έκθεση στον ήλιο ευνοεί τη συσσώρευση των ελεύθερων μη ισοπρενοειδών καθώς και των γλυκοζυλιωμένων μη ισοπρενοειδών, μονοτερπενίων και άλλων άγλυκων μη τερπενίων. Αυτή η αυξημένη συγκέντρωση των γλυκοζιδίων στο σταφύλι μπορεί να είναι και λόγω της θερμοκρασίας εξίσου με την ηλιοφάνεια στην ενζυμική δραστηριότητα εντός της ράγας. Αντίθετα, η έκθεση στο φως έχει παρατηρηθεί ότι μειώνει την συγκέντρωση μεθοξυπυραζινών, αν και η εποχή της έκθεσης έχει επίσης σημασία (πριν ή μετά το γυάλισμα) στα επίπεδα των μεθοξυπυραζινών κατά τον τρύγο. Ξεφύλλισμα στην αρχή της περιόδου βλάστησης επίσης μείωσε τα επίπεδα μεθοξυπυραζινών σε σταφύλια Cabernet franc και Merlot, όμως αν η αλλαγή οφείλεται σε μεταβολές της έκθεσης κατά την άνθηση δεν είναι γνωστό.

Έχει υποτεθεί ότι η ποιότητα και όχι η ένταση του φωτός καθορίζει τη συσσώρευση των μη ισοπρενοειδών ενώσεων. Αυτές οι έρευνες δείχνουν ότι έκθεση σε μπλε-πράσινο φως έχει ως αποτέλεσμα τη σύνθεση καροτενοειδών ως φωτοπροστατευτική άμυνα των πρέμνων. Επιπρόσθετα, η αποδόμηση των καροτενοειδών ενισχύεται από την έκθεση σε ίδια μήκη κύματος φωτός. Η ακόλουθη μείωση καροτενοειδών στο σταφύλι παρατηρείται όταν οι χλωροπλάστες έχουν χαθεί ή μετασχηματιστεί και παύει η σύνθεση καροτενοειδών (Baumes et al., 2002).



### 1.2.3 Διαχείριση ύδατος και φυλλώματος

Οι αμπελοκομικές πρακτικές, που περιλαμβάνουν τη διαχείριση του φυλλώματος και του υποχρεωτικού υδατικού stress, είναι τρόποι για να ελεγχθεί η έκθεση των ραγών στο φως για να αποκτηθεί το επιθυμητό ποικιλιακό άρωμα. Γενικά, η μείωση του χρησιμοποιούμενου νερού από το πρέμνο πιστεύεται ότι αλλάζει τη συνθεση των καροτενοειδών και των μη ισοπρενοειδών ενώσεων. Στο σταφύλι ελλειματική άρδευση ανέβασε τα επίπεδα των καροτενοειδών και επιλεγμένα μη ισοπρενοειδή με 13 άτομα άνθρακα που παρήχθησαν μετά από αποδόμηση καροτενοειδών, αν και η επίδραση μπορεί να εξαρτάται από το μη ισοπρενοειδές που μετρήθηκε. Αυτά τα αποτελέσματα συμφωνούν με μία πρόσφατη έρευνα που δείχνει ότι η ρύθμιση του μεταβολισμού/αποδόμησης των καροτενοειδών είναι πολύπλοκη και μπορεί να υπάρχει σε πολλαπλά επίπεδα. Η ελλειματική άρδευση είχε διάφορα αποτελέσματα στα επίπεδα των μονοτερπενίων, με είτε κανένα απολύτως ή αυξάνοντας τη συγκέντρωση ορισμένων ενώσεων. Η έλλειψη ύδατος δεν συσχετίζονται καλά με επίπεδα της 3-ισοβουτυλο-2-μεθοξυπυραζίνης σε οίνους Cabernet Sauvignon. Επειδή η έλλειψη ύδατος επιταχύνει την γρήγορη ωρίμανση στις ράγες στο πρέμνο, εμφανίζεται μία μη συσχέτιση μεταξύ της ωρίμανσης και επιδράσεις του υδατικού στρες που κάνουν πιο πολύπλοκη την κατανόηση αυτών των ερευνών αν δεν ελεγχθεί ή μετρηθεί. Επιπρόσθετα, το επίπεδο του ύδατος επηρεάζει την πυκνότητα του φυλλώματος και επομένως την έκθεση στο φως όπως αναφέρθηκε προηγουμένως.

Το αραίωμα του φορτίου (κοινή πρακτική στον αμπελώνα) έχει παρατηρηθεί ότι αυξάνει τα επίπεδα γλυκοζυλιωμένων τερπενίων και αλειφατικών ενώσεων, αλλά καμία επίδραση στα επίπεδα γλυκοζυλιωμένων μη ισοπρενοειδών. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από την ανεξάρτητη βιοσύνθεση των μη ισοπρενοειδών στις ράγες παρά την μεταφορά τους από τα φύλλα. Αντίθετα, όταν το φορτίο έχει ελεγχθεί μέσω του χειμερινού κλαδέματος καρποφορίας, εμφανίστηκε αρνητική συσχέτιση μεταξύ της απόδοσης και των επιπέδων των μεθοξυπυραζινών (Chapman et al., 2004).

#### 1.2.4 Ωριμότητα ραγών

Η διαδικασία ωρίμανσης των ραγών εμπεριέχει πολλές διαδικασίες, μεταξύ των οποίων μεταφορά, συσσώρευση και μεταβολισμό πρωταρχικών ενώσεων μέσα στη ράγα. Αυτές οι μετατροπές περιλαμβάνουν: πρόσληψη σουκρόζης από τα φύλλα μέσω του φλοιού ακολουθούμενη από την ιμβερτοποίηση και αποθήκευση της D(+)-γλυκόζης και της D(-)-φρουκτόζης, αραίωση του L-(+)-ταρταρικού οξέος στο φλοιό, που έχει σχηματιστεί από το ασκορβικό κατά το στάδιο πριν το γυάλισμα, και μεταβολισμό του L-(-)-μηλικού οξέος, συσσώρευση αμινοξέων, ειδικά αργινίνης και προλίνης, που ενώνονται για να μετασχηματιστούν σε αμμώνιο μειωμένη σύνθεση φαινολών και συσσώρευση των condensed τανινών στο φλοιό και τα γίγαρτα, συσσώρευση φλαβονόλων, ανθοκυανών (σε ερυθρές ποικιλίες), και λευκο-ανθοκυανών (σε λευκές ποικιλίες) στους φλοιούς και αλλαγές στη συγκέντρωση και ποικιλία των πρόδρομων αρωματικών και αρωματικών ενώσεων. Αυτές οι ενώσεις συνολικά χαρακτηρίζουν την πλειονότητα των οργανικών ενώσεων που βρίσκονται στις ράγες και χρησιμοποιούνται κατά την οινοπαραγωγή. Σε πολλές περιπτώσεις, αυτές οι ενώσεις είναι εύκολο να αλλάξουν μέσω βιολογικών και χημικών μετατροπών μέσω της διαδικασίας της ωρίμανσης και οινοποίησης. Όμως, αποτελούν το βασικό συστατικό της σύστασης του κρασιού.

Διάφορες έρευνες έχουν καταγράψει την επίδραση της ωρίμανσης στα επίπεδα των αρωματικών ενώσεων και των πρόδρομών τους ενώσεων, μεταξύ των οποίων, τα καροτενοειδή, μη ισοπρενοειδή, μονοτερπένια και μεθοξυπυραζίνες. Αυτές οι έρευνες υποδεικνύουν ότι τα καροτενοειδή που συσσωρεύονται πριν το γυάλισμα αποδομούνται ταχύτατα στο στάδιο μετά το γυάλισμα. Αυτή η ραγδαία μείωση συμβαίνει στο β-καροτένιο, λουτεΐνη και βιολαξανθίνη ενώ τα επίπεδα της νεοξανθίνης μειώνονται με ένα σταθερό ρυθμό. Η ακόλουθη συσσώρευση των μη ισοπρενοειδών είναι αντιστρόφως ανάλογη στην αποδόμηση των καροτενοειδών και θετικά σχετιζόμενη με την αύξηση συγκέντρωσης των σακχάρων. Αυτή η σχέση επίσης ισχύει για τα μονοτερπένια και είναι σύμφωνη με την αύξηση αρκετών γονιδίων που συμμετέχουν στα πρώτα στάδια σύνθεσης των τερπενίων κατά την ωρίμανση (Martin et al., 2012). Έρευνες πάνω σε Sauvignon blanc, Cabernet Sauvignon, Cabernet franc, Carmenera και Merlot έχουν δείξει ότι οι μεθοξυπυραζίνες μειώνονται κατά την ωρίμανση των ραγών.

Έχει υποτεθεί ότι αν και αλλαγές στη συγκέντρωση των αρωματικών ενώσεων και συσώρευσης των σακχάρων συμβαίνουν ταυτόχρονα, μπορεί να μην είναι αμοιβαία εξαρτώμενες. Τέλος, η ωρίμανση σε λευκές ποικιλίες είναι γενετικά ελεγχόμενη, και επίσης σημαντικά μεταβαλλόμενη από τις περιβαλλοντικές συνθήκες όπως έχει αναφερθεί παραπάνω. Οπότε, είναι συχνά δύσκολο να διαχωριστούν οι επιδράσεις του περιβάλλοντος και της ωρίμανσης πάνω στη σύνθεση του αρώματος.

### 1.2.5 Μυκητολογικές ασθένειες

Το κλίμα (π.χ. θερμοκρασία και υγρασία) καθώς και γενετικοί παράγοντες (π.χ. πυκνότητα των ραγών κατά την άνθηση) μπορεί να επηρεάσουν την επιδεκτικότητα των ανθοταξιών σε μυκητολογικές προσβολές. Καθώς οι θερμοκρασία σε κάθε τόπο αλλάζει λόγω της παγκόσμιας κλιματικής αλλαγής, η ευαισθησία των ραγών έχει αυξηθεί (π.χ. *Botrytis cinerea* και *Aspergillus niger*) μπορεί επίσης να επηρεαστούν με αντίστοιχο αντίκτυπο στο άρωμα. Για παράδειγμα, ο κοινός μύκητας *B. cinerea* προκαλεί την φαιά σήψη των ραγών και έχει παρατηρηθεί ότι μετασχηματίζει τα μονοτερπένια και τα μη ισοπρενοειδή στο μούστο. Νέες ενώσεις ενωμένες με πολυλειτουργική θειόλη κυστεΐνη έχουν βρεθεί σε Sauvignon blanc και Semillon μετά από προσβολή από βοτρυτή που μπορεί να συμβάλλουν στο μοναδικό άρωμα των γλυκών οίνων από σταφύλια με ευγενή σήψη (Thibon et al., 2010). Επιπρόσθετα, οι γλυκοζυδάσες που προέρχονται από *A. niger*, αν και χρησιμοποιούνται ευρέως στην ανάλυση γλυκοσιδίων των σταφυλιών, είναι γνωστό ότι παράγουν οξειδωτικά παράγωγα αρωμάτων όταν βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις. Αν και *A. niger* γλυκοσιδάση είναι ανενεργή σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης, είναι ένδειξη ότι η προσβολή από *A. Niger* με *B. Cinerea* μπορεί να έχουν αθροιστικές επιδράσεις στο ποικιλιακό άρωμα των προσβεβλημένων σταφυλιών.

Περίληπτικά, αυτές οι έρευνες σκοπό έχουν την πολυπλοκότητα στην κατανόηση των αλληλεξαρτήσεων μεταξύ διαφόρων αμπελοκομικών τεχνικών και τη σύσταση της ράγας και της σύστασης και ποιότητας του αντίστοιχου οίνου. Επειδή, πολλές ενώσεις εμπλέκονται στο άρωμα, πρακτικές που αυξάνουν συγκεκριμένα μεταβολικά μονοπάτια, μπορεί να αλλάξουν άλλα μονοπάτια και μεταβολικά

παράγωγα, κάνοντας δύσκολη την πρόβλεψη του τελικού αποτελέσματος. Στις περισσότερες των περιπτώσεων, οι μηχανισμοί για την επίδραση σε μοριακό επίπεδο είναι επίσης άγνωστοι, κάνοντας ακόμα πιο δύσκολη την προσπάθεια να φτιαχτεί ένα μοντέλο και να συσχετιστούν αποτελέσματα μίας έρευνας με αυτά μιας άλλης σε διαφορετικό κλίμα ή περιοχή. Αντί να εξετάζονται επιδράσεις μόνο σε μια ένωση τη φορά, οι αναλυτικές μέθοδοι που υπολογίζουν συγκεντρώσεις σε πολλαπλές ενώσεις, σε συνδυασμό με πολυπαραγοντικές στατιστικές αναλύσεις για να συσχετιστούν γονιδιοματικές και οργανοληπτικές πληροφορίες, μπορεί να παρέχουν πολύτιμα εργαλεία για μελλοντικές έρευνες πάνω σε αυτόν τον τομέα.

## **2 Αέρια χρωματογραφία – ολφακτομετρία**

Η σύσταση καθώς και η περιεκτικότητα των αλκοολούχων ποτών σε πτητικές ενώσεις καθορίζει την ποιότητα του παραγόμενου προϊόντος. Η οσμή στα αλκοολούχα ποτά είναι αποτέλεσμα ενός μεγάλου αριθμού χημικών ενώσεων με διαφορετικές ιδιότητες (όπως η πολικότητα και η πτητικότητα) που απαντώνται σε ένα μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων. Η χημική σύσταση εξαρτάται από την ποιότητα και το είδος της πρώτης ύλης καθώς και τις συνθήκες που επικρατούν κατά τη ζύμωση.

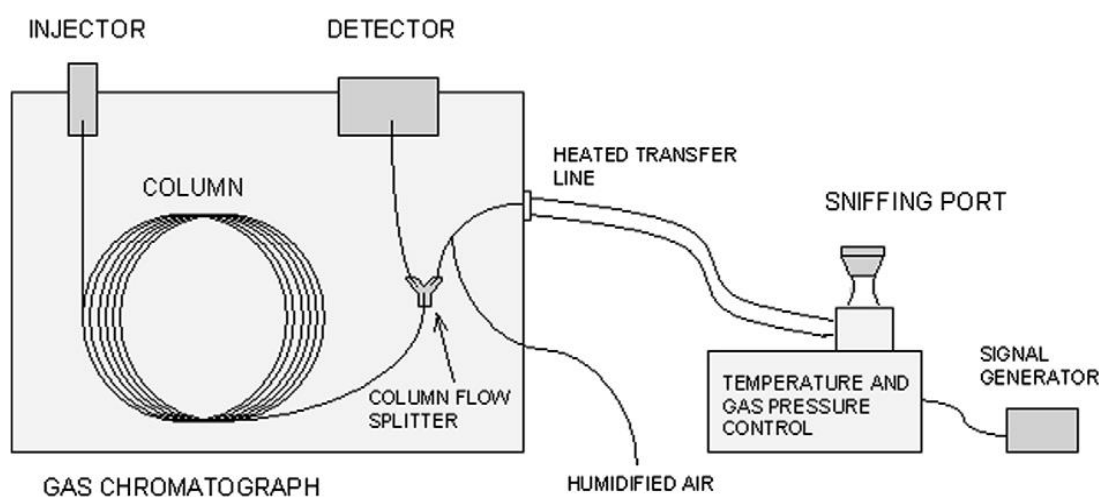
Η αλκοολική ζύμωση που γίνεται κάτω από βιομηχανικές συνθήκες οδηγεί σε μία σειρά παραπροϊόντων και αιθανόλη. Περιλαμβάνουν αλκοόλες, εστέρες, οξέα και ακετάλες, και όλα αυτά τα παραπροϊόντα επηρεάζουν την ποιότητα του τελικού προϊόντος. Η σύνθεση καθώς και η συγκέντρωση των παραπροϊόντων ποικίλει σε μεγάλο βαθμό. Κάποια συστατικά απαντώνται σε μεγάλες συγκεντρώσεις (εκατοντάδες mg/l), όμως, ένα μεγάλο μέρος εμφανίζεται σε σημαντικά χαμηλότερες συγκεντρώσεις (μέχρι ng/l). Η συμμετοχή της κάθε ένωσης ξεχωριστά στο αρωματικό προφίλ διαφέρει. Πολύ συχνά, ενώσεις που βρίσκονται σε ελάχιστη συγκέντρωση επηρεάζουν σημαντικά το τελικό προϊόν σε σχέση με ενώσεις που απαντώνται σε υψηλές συγκεντρώσεις.

Τα τελευταία χρόνια, εντατικές έρευνες έχουν διεξαχθεί με θέμα τις οργανοληπτικές ιδιότητες ενώσεων σε ατομικό επίπεδο σε αλκοολούχα ποτά καθώς και στο κρασί, και την εξάρτηση της οσμής από τη χημική σύσταση των ενώσεων που συνθέτουν το πτητικό κομμάτι αυτών των προϊόντων. Η πλειοψηφία των επιτυχιών σε αυτό τον τομέα μπορεί να αποδοθεί στη χρήση της αέριας χρωματογραφίας σε συνδυασμό με την ολφακτομετρία.

### **2.1 Γενικά χαρακτηριστικά της αέριας χρωματογραφίας-ολφακτομετρίας (GC-O) και συνδεσμολογία**

Η αέρια χρωματογραφία με ολφακτομετρική ανίχνευση βασίζεται στην οργανοληπτική αξιολόγηση των ουσιών, που εξέρχονται από τη στήλη

χρωματογραφίας, με στόχο τον προσδιορισμό των ενεργών αρωματικών ουσιών. Ο ρόλος του ανιχνευτή γίνεται από ένα ορθά εκπαιδευμένο χρήστη ή ομάδα χρηστών. Ποιοτική και ποσοτική αξιολόγηση του αρώματος γίνεται για κάθε ουσία που εξέρχεται από τη στήλη χρωματογραφίας. Αυτό οδηγεί σε ασφαλές συμπέρασμα για το αν μία συγκεκριμένη ένωση είναι οργανοληπτικά ενεργή σε συγκεκριμένη συγκέντρωση (άσχετα αν εμφανίζεται σε επίπεδο υψηλότερα από το κατώφλι αντίληψης), καθώς επίσης και τον χρόνο που διατηρείται και την ένταση του αρώματος. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω ενός επιπρόσθετου παρελκόμενου που είναι γνωστό ως ολφακτομετρικός δίαυλος, που βρίσκεται σε παράλληλη σύνδεση με τους συνήθεις ανιχνευτές όπως αυτός της φλόγας ιονισμού (FID) και της φασματοσκοπίας μάζας (MS) (εικ1).



Εικόνα 1 Αέριος χρωματογράφος με ολφακτομετρικό ανιχνευτή

Η ροή του εκλούσματος χωρίζεται με τέτοιο τρόπο ώστε οι ενώσεις να φτάνουν στους δύο ανιχνευτές ταυτόχρονα και έτσι τα δύο σήματα να αποτελούν συγκρίσιμα μεγέθη. Ο συνδυασμός με ένα φασματογράφο μάζας αποτελεί μεγάλο πλεονέκτημα καθώς επιτρέπει τον ποιοτικό προσδιορισμό των πτητικών ενώσεων. Όμως, το φασματοφωτόμετρο μάζας λειτουργεί υπό κενό, ενώ ο ανιχνευτής ολφακτομετρίας υπό ατμοσφαιρικές συνθήκες πίεσης και ο χρόνος κατακράτησης των ουσιών μπορεί να διαφέρει για τους δύο ανιχνευτές (γενικά μικρότερος για το φασματογράφο μάζας). Αυτή η δυσκολία μπορεί να ξεπεραστεί εγκαθιστώντας ένα παρεμποδιστή (σε μορφή λεπτής διάτρητης τριχοειδούς στήλης) πριν από το φασματογράφο μάζας για να αυξηθεί η πτώση της πίεσης ανάμεσα στη διασύνδεση και το ρυθμιστή ροής, καθώς και με προσεκτική επιλογή της ροής του φέροντος και των υπόλοιπων αερίων (Hocchreu & Brucht, 2004).

Ο σχεδιασμός των εμπορικά διαθέσιμων ολφακτομετρικών διαύλων είναι παρόμοιος. Το έκλουσμα που φτάνει στο διάυλο διαμέσου μιας γραμμής μεταφοράς γίνεται διαθέσιμο μέσω ενός PTFE κωνικού καναλιού που έχει το σχήμα της μύτης. Η γραμμή μεταφοράς είναι θερμαινόμενη για να αποφευχθεί η συμπύκνωση ημιπτητικών ουσιών στα τοίχη του τριχοειδούς σωλήνα. Βοηθητικό αέριο (υγρός αέρας) προστίθεται για να αποφευχθεί η ξήρανση των οσφρητικών κυττάρων της μύτης του προσωπικού αξιολόγησης, ειδικά για αναλύσεις που κρατάνε μεγάλο χρονικό διάστημα. Το μήκος της γραμμής μεταφοράς ποικίλλει, αλλά πρέπει να είναι σε τέτοιο μήκος που να επιτρέπει την άνετη θέση για το προσωπικό. Αν το εκχύλισμα υπό ανάλυση είναι επαρκώς συμπυκνωμένο τότε η ροή των ουσιών μπορεί να χωριστεί σε περισσότερα του ενός κανάλια και να γίνεται ταυτόχρονη αξιολόγηση από περισσότερους του ενός αξιολογητές. Τα πιο αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα μπορούν να εξαχθούν με αυτόν τον τρόπο (Debonneville, Orsier, Flament & Chaintreau, 2002).

## **2.2 Μέθοδοι προετοιμασίας δειγμάτων**

Ο προσδιορισμός αρωματικών ενώσεων με τη χρήση της ενόργανης ανάλυσης γίνεται σε δύο στάδια. Το πρώτο από αυτά είναι η απομόνωση των πτητικών ενώσεων από τον οίνο, και είναι εξαιρετικά σημαντικό στάδιο. Η εμφάνιση των ολφακτογραφημάτων βασίζεται σε μεγάλο βαθμό στην διαδικασία απομόνωσης, καθώς συγκριτικές μελέτες δείχνουν ότι η χρήση διαφορετικών μεθόδων (ακόμα και η χρήση διαφορετικών διαλυτών κατά την 1/1 εκχύλιση) επηρεάζει τη σύσταση αλλά και τη συγκέντρωση των ενώσεων προς εξέταση (Bonino et al., 2003). Το εκχύλισμα οφείλει να είναι αντιπροσωπευτικό, οπότε και η επιλογή της σωστής μεθόδου προετοιμασίας του δείγματος είναι κρίσιμη (Plutowska & Wardencki, 2007). Μέθοδοι που περιλαμβάνουν τη υγρή-υγρή εκχύλιση ή την απόσταξη δεν αντιπροσωπεύουν πάντα την οσμή που συναντάνε όσοι δοκιμάσουν το προϊόν. Είναι σημαντικό το ότι ένα μόνο μέρος των πτητικών ενώσεων συνεισφέρουν στο αρωματικό προφίλ του οίνου. Η σύνθεση των οργανοληπτικών ιδιοτήτων μεταβάλλεται ανάλογα με τη διαλυτότητα και τις ιδιότητες του μέσου (για παράδειγμα η συγκέντρωση των σακχάρων). Οπότε, είναι καλύτερο να χρησιμοποιούνται μέθοδοι που καθορίζουν την συγκέντρωση των πτητικών ενώσεων που πραγματικά ελευθερώνονται στον οίνο

παρά να υπολογίζεται η ολική τους συγκέντρωση, καθώς αυτό διευκολύνει τα αποτελέσματα του οργανοληπτικού ελέγχου. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για αυτό το σκοπό είναι η στατική (static) και η δυναμική (dynamic) head space ανάλυση. Η δυναμική μέθοδος είναι αυτή που χρησιμοποιείται πιο συχνά καθώς με τη στατική υπάρχει η πιθανότητα εμπλουτισμού του δείγματος σε ενώσεις (Pollien et al., 1997).

### **2.2.1 Μέθοδοι εκχύλισης σε διαλύτη**

Αυτές οι μέθοδοι συνήθως είναι χρονοβόρες και περιλαμβάνουν αρκετά στάδια. Αυτό οφείλεται στο ότι το δείγμα ξεπλένεται με υδατικά διαλύματα μεταβαλλόμενου pH με σκοπό την απομάκρυνση των οξέων και μη πτητικών ενώσεων και η διαδικασία μπορεί να οδηγήσει σε ανεπαρκή εκχύλιση. Η απομάκρυνση μη πτητικών ενώσεων γίνεται γιατί υπάρχει το ρίσκο μόλυνσης της στήλης χρωματογραφίας αλλά και η πιθανή αλλοίωση των αποτελεσμάτων λόγω της υψηλής θερμοκρασίας του εισαγωγέα δείγματος. Επιπρόσθετα, η οσμή των λιπαρών οξέων είναι έντονη και με μεγάλη χρονική διάρκεια με αποτέλεσμα τον κίνδυνο επικάλυψης ενώσεων που ακολουθούν (Ferreira, Lopez, Escudero & Cacho, 1998). Προβλήματα που σχετίζονται με την χαμηλή επιλεκτικότητα των διαλυτών σε σχέση με τα συστατικά του αλκοολούχου ποτού μπορεί μερικά να ξεπεραστεί χρησιμοποιώντας προσροφητικές ρητίνες που μεταγενέστερα εκχυλίζονται με τους διαλύτες. Αυτή είναι μία αποτελεσματική μέθοδος για την εκχύλιση αρωματικών ενώσεων από κάποιο αλκοολούχο ποτό. Κυρίως amberlite ρητίνες του τύπου XAD χρησιμοποιούνται ως προσροφητικά λόγω της χαμηλής εκλεκτικότητας και της μεγάλης αποτελεσματικότητας με πολικές ενώσεις (Aznar, Lopez, Cacho & Ferreira, 2001). Η εκχύλιση με στερεά προσροφητικά μπορεί να γίνει ανακινώντας το δείγμα με προσροφητικά τεμαχίδια, όμως η ίδια διαδικασία γίνεται πιο εύκολα με στήλες SPE καθώς και με γυάλινες στήλες (Cullere, Escudero, Cacho & Ferreira, 2004; Aznar et al., 2001). Παρά τα πλεονεκτήματα της στερεάς προσροφητικής εκχύλισης έχει βρεθεί ότι η δυναμική head space τεχνική παράγει απλότερα και καθαρότερα ολφακτογραφήματα για αλκοολούχα ποτά όπως το κρασί (Campo, Ferreira, Escudero & Cacho, 2005).



Η συμβατική εκχύλιση με διαλύτη ακολουθείται από παραλαβή του εκχυλίσματος μέσω μερικής ή ολικής απομάκρυνσης του διαλύτη μέσω απόσταξης. Αυτό παρατείνει το χρόνο επεξεργασίας που απαιτείται και αυξάνεται το ρίσκο απώλειας πτητικών ενώσεων και απώλειας μέσω αποδόμησης λόγω οξειδωτικών διεργασιών. Η απόσταξη γίνεται συνήθως σε μειωμένη πίεση και θερμοκρασία αλλά είναι πρακτικώς αδύνατο να αποφευχθεί η επαφή του εκχυλίσματος με τον αέρα κατά την προετοιμασία του δείγματος. Έρευνες έχουν δείξει ότι απαιτείται η χρήση αντιοξειδωτικών όπως το 2-τερτ-βουτυλο-4-μεθοξυφαινόλη (BHA). Χωρίς το αντιοξειδωτικό το εκχύλισμα δεν θα είναι αντιπροσωπευτικό καθώς οξειδωτικές αντιδράσεις θα μεταβάλλουν ανώτερες αλκοόλες, αμινοξέα, κάποιες λακτόνες καθώς και τερπένια και εστέρες (Escudero & Etievant, 1999).

### **2.2.2 Μέθοδοι Headspace**

Οι μέθοδοι παραλαβής πτητικών ουσιών από τον οίνο ποικίλει σημαντικά. Παγίδες απορρόφησης με πορώδη πολυμερή όπως το Tenax TA ή το Porapak Q, καθώς και ρητίνες όπως η Lichrolut EN, είναι αυτές που χρησιμοποιούνται συχνότερα (Campo et al., 2005). Η παραλαβή των ενώσεων από τις παγίδες γίνεται μέσω θερμικής εκρόφησης ή μέσω έκλουσης διαλύτη (Garruti, Franco, Silva, Janzanti & Alves, 2006). Τα προσροφητικά πορώδη πολυμερή, ειδικά το Porapak Q, αιχμαλωτίζουν μόνο μικρές ποσότητες αιθανόλης το οποίο αποτελεί πλεονέκτημα καθώς μειώνεται η πιθανότητα να υπάρξει διάτρηση της παγίδας και επίσης μειώνεται και το πλάτος της κορυφής του διαλύτη στο χρωματογράφημα. Σε σύγκριση με παραδοσιακές εξαντλητικές μεθόδους εξαγωγής, οι μέθοδοι headspace συνήθως δεν προκαλούν απώλειες των πιο πτητικών ουσιών, που πολλές φορές είναι αυτές που διαμορφώνουν το άρωμα του δείγματος. Επιπρόσθετα, επιτρέπεται η χρωματογραφική τους ανάλυση, που είναι συχνά δύσκολη με τις μεθόδους διαλύτη λόγω της παρουσίας της κορυφής του διαλύτη (Grosch, 2001).

### **2.2.2.1 Μικροεκχύλιση σταθερής φάσης (SPME)**

Η μικροεκχύλιση σταθερής φάσης χρησιμοποιείται σε αναλύσεις headspace (Gurbuz, Rouseff & Rouseff, 2006). Ειδικά επιτυχημένη είναι στη χρήση της για διαλύτη σε μεθόδους για κατώφλι αντίληψης (Deibler, Acree & Lavin, 1999), καθώς επιτρέπει σημαντική απλοποίηση της αναλυτικής διαδικασίας. Το πιο σημαντικό είναι ότι αντί να αραιώνεται το εκχύλισμα, είναι δυνατή η απευθείας αραιώση του δείγματος, που συνήθως χρειάζεται λιγότερο χρόνο (Fan & Qian, 2005). Επιπρόσθετα, η SPME επιτρέπει σχεδόν την απόλειψη της προετοιμασίας του δείγματος. Η απλότητα έγκειται στο ότι η τεχνική βασίζεται στην δυνατότητα χρήσης διαφορετικού πάχους στηλών εκχύλισης σταθερής φάσης αντί να γίνεται μία σειρά συνεχόμενων αραιώσεων του δείγματος. Το μειονέκτημα όμως είναι ο μικρός αριθμός διαθέσιμων εκχυλιστικών στηλών στο εμπόριο. Το χρονοβόρο κομμάτι της προετοιμασίας δειγμάτων με διαφορετικές συγκεντρώσεις των αρωματικών ενώσεων μπορεί να αντικατασταθεί με τη χρήση διαφορετικών ροών του φέροντος αερίου στον split/splitless εισαγωγή (Deibler, Llesca, Lavin & Acree, 2004), ή μέσω της χρήσης διαφορετικών μηκών των στηλών (Deibler et al., 1999). Αυτές οι λύσεις κάνουν δυνατή την αραιώση του δείγματος μέχρι και 50 φορές.

Η αρχική βελτιστοποίηση των συνθηκών είναι απαραίτητη όταν η SPME χρησιμοποιείται, καθώς η ποσοτική και ποιοτική σύνθεση του δείγματος μεταβάλλεται ανάλογα με το είδος της στήλης μικροεκχύλισης σταθερής φάσης που χρησιμοποιείται, τη θερμοκρασία, το χρόνο εκχύλισης και τον όγκο του δείγματος (Fan & Qian, 2005). Έρευνες δείχνουν ότι στις περισσότερες των περιπτώσεων μία στήλη δύο εκατοστών με DVB/CAR/PDMS (διβινυλοβενζένιο, carboxen, πολιδιμεθυλοοκτάνιο) εξασφαλίζει ικανοποιητικές αποδόσεις για το μεγαλύτερο ποσοστό των αρωματικών ενώσεων που προέρχονται από αλκοολούχα ποτά.

### **2.2.3 Φτιάχνοντας κλάσματα από εκχύλισμα**

Όταν το άρωμα του δείγματος προς ανάλυση χαρακτηρίζεται από μία πολύπλοκη ποσοτική σύνθεση, η κλασματοποίησή του μερικές φορές είναι η προτεινόμενη λύση (Lee & Noble, 2003). Αυτό συχνά επιτρέπει τον προσδιορισμό

αρωματικών ενώσεων που εμφανίζονται σε ίχνη μέσα σε ένα μίγμα από ενώσεις όπως ανώτερες αλκοόλες ή εστέρες λιπαρών οξέων που βρίσκονται σε πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις. Για παράδειγμα η κλασματοποίηση του δείγματος από το κινέζικο αλκοολούχο απόσταγμα Yanghe Daqu που έγινε από την εξαγωγή σε διαλύτη Freon 11 σε ένα όξινο κλάσμα και τέσσερα με ουδέτερο προς αλκαλικό χαρακτήρα επέτρεψε τον διαχωρισμό και την αναγνώριση περισσότερων από 70 ενεργών αρωματικών ενώσεων (Fan & Qian, 2006a, 2006b). Τα κλάσματα που ήταν ουδέτερα προς αλκαλικά πάθησαν από την εκχύλιση του απομονωμένου Freon σε νερό σε υψηλό pH, και το όξινο κλάσμα μετά από εκχύλιση σε διαιθυλαιθέρα σε χαμηλό pH. Εξαιτίας της πολυπλοκότητας της σύνθεσης του ουδέτερου-αλκαλικού κλάσματος, έγινε περαιτέρω κλασματοποίηση χρησιμοποιώντας μία κανονικής φάσης παρασκευαστική υγρή χρωματογραφία. Μία ανάλογη μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για αρωματικές ενώσεις σε νεαρούς ερυθρούς οίνους (Ferreira et al., 1998). Παρομοίως, οι αρωματικές ενώσεις ενός οίνου από σταφύλια της ποικιλίας Pinot Noir χωρίστηκαν σε δύο κλάσματα που αποκτήθηκαν μετά από μία solvent-assisted flavor evaporation (SAFE) (Fang & Qian, 2005).

Η χρωματογραφική κλασματοποίηση μπορεί να γίνει και σε λειτουργία ανεστραμμένης φάσης, με την κινητή φάση να αποτελείται από νερό και αιθανόλη. Αυτό αποκλείει τη χρήση τοξικών και ενεργών αρωματικά διαλυτών αλλά δυστυχώς καθιστά αδύνατο τον επιπλέον αναλυτικό εμπλουτισμό, και ως αποτέλεσμα επιπρόσθετη εκχύλιση σε διαλύτη απαιτείται για τα κλάσματα (Aznar et al., 2001). 15 κλάσματα αποκτήθηκαν από κρασιά της ποικιλίας Chardonnay με αυτό τον τρόπο, που επέτρεψε τον προσδιορισμό περισσότερων από 70 ενεργών ενώσεων που συμμετέχουν στο άρωμα (Ferreira, Hernandez-Orte, Escudero, Lopez & Cacho, 1999). 50 κλάσματα λήφθηκαν από ισπανικό οίνο Rioja, που επέτρεψε τον προσδιορισμό περισσότερων από 50 αρωματικών ενώσεων (Aznar et al., 2001). Θα πρέπει να δωθεί έμφαση στο ότι η παρασκευαστική υγρή χρωματογραφία είναι ένα συντηρητική μέθοδος που δεν προκαλεί καμία ποιοτική ή ποσοτική διαφοροποίηση στη σύνθεση του δείγματος.

#### 2.2.4 Εκλεκτικές μέθοδοι εκχύλισης

Ένας από τους στόχους της αέριας χρωματογραφικής ανάλυσης με τη χρήση ολφακτομετρίας είναι η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός συγκεκριμένων ουσιών από μία συγκεκριμένη ομάδα χημικών ενώσεων. Οι εκλεκτικές μέθοδοι εκχύλισης χρησιμοποιούνται για αυτό το σκοπό (Fretz, Kanel, Luisier & Amado, 2005). Για παράδειγμα, οι Bouchilloux et al. χρησιμοποίησαν ένα συνδυασμό απόσταξης υπό κενό (vacuum distillation) και επιλεκτική παγίδευση θειολών μέσω της αντίδρασης με το π-υδροξυ-υδραργυροβενζοϊκό οξύ (p-HMB), το οποίο επιτρέπει την απόληψη αρωματικών προφίλ ερυθρών οίνων Bordeaux με την παρουσία μόνο ενώσεων του θείου χωρίς την επίδραση ενός μεγάλου πλήθους αρωματικών ενώσεων (Bouchilloux, Darriet, Henry, Lavigne-Cruege & Dubourdieu, 1998). Ένα επιπρόσθετο όφελος της μεθόδου ήταν η εξάλειψη των πολυφαινολών από το εκχύλισμα. Αυτές οι ενώσεις που είναι παρούσες στα εκχυλίσματα που παρασκευάστηκαν με συμβατικές μεθόδους, κάνουν τη χρωματογραφική ανάλυση δυσκολότερη.

#### 2.2.5 Επιλέγοντας την κατάλληλη μέθοδο εκχύλισης

Η χρησιμότητα μίας δοθούσας μεθόδου εκχύλισης και η αντιπροσωπευτικότητα του δείγματος συχνά επιβεβαιώνονται μέσω ενός αρχικού τυπικού οργανοληπτικού ελέγχου και η σύγκριση του αρώματος ενός αλκοολούχου ποτού και των αντίστοιχων εκχυλισμάτων (Ferreira, Hogg & Guedes de Pinho, 2003). Για παράδειγμα, τεστ για ομοιότητα σε δείγματα από μύρα lager και αρωμάτων που εκχυλίστηκαν χρησιμοποιώντας διαφορετικούς διαλύτες όπως εξάνιο, διαιθυλαιθέρα, οξικό αιθυλεστέρα και διχλωρομεθάνιο έδειξαν ότι το εκχύλισμα σε διχλωρομεθάνιο ήταν το πιο αντιπροσωπευτικό (Soares da Costa et al., 2004). Οργανοληπτικός έλεγχος σε δείγματα από σαμπάνια που αποκτήθηκαν με τρεις διαφορετικές μεθόδους, προσρόφηση με XAD ρητίνες, εκχύλιση σε διχλωρομεθάνιο και εκχύλιση μέσω επαναπρόσθεσης αιθανόλης με τη περιγραφική οργανοληπτική εξέταση (Barylko-Pikielma, 1975) απέδειξε ότι η απομόνωση αρώματος με την τελευταία μέθοδο ήταν πιο κοντά στο αρχικό προϊόν (Priser et al., 1997).

Δυστυχώς, τα τεστ ομοιότητας δεν είναι απευθείας εφαρμόσιμα στην περίπτωση εκχυλισμάτων όταν έχει χρησιμοποιηθεί διαλύτης με δριμύ άρωμα ή με τη μέθοδο headspace, και περιλαμβάνεται και η μικροεκχύλιση σταθερής φάσης (SPME). Στην περίπτωση SPME, το μεγαλύτερο μειονέκτημα είναι ότι τα εκχυλίσματα μπορεί να διαφέρουν και ποιοτικά και ποσοτικά ανάλογα με τον τύπο στήλης που χρησιμοποιήθηκε.

### **2.2.6 Παράγοντες που επηρεάζουν την ποιότητα των αποτελεσμάτων**

Ένας αριθμός παραγόντων επηρεάζει την ποιότητα των αποτελεσμάτων. Η εκχυλιστική τεχνική πτητικών ενώσεων είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς επηρεάζει την αντιπροσωπευτικότητα των απομονωθέντων ενώσεων και τη σύνθεση του εκλούσματος προς οργανοληπτικό έλεγχο. Η αποθήκευση είναι επίσης κρίσιμη σε σχέση με την αντιπροσωπευτικότητα του δείγματος. Για να αποφευχθεί αυτό-οξειδωση, τα εκχυλίσματα από οίνο θα πρέπει να αποθηκεύονται σε ατμόσφαιρα διοξειδίου του άνθρακα σε χαμηλή θερμοκρασία (Bernet et al., 2002). Χωρίζοντας το δείγμα σε μικρότερα, ατομικά τμήματα αποφεύγονται αλλαγές στη σύνθεση μετά από επαναλαμβανόμενο άνοιγμα του δοχείου του δείγματος. Από την άποψη της ποσοτικής ανάλυσης του αρώματος, η ποιότητα του χρωματογραφικού διαχωρισμού είναι σημαντική, συνεπώς οι συνθήκες του διαχωρισμού πρέπει να είναι οι βέλτιστες. Τέλος, δεν μπορεί να αποφευχθεί η επίδραση του ανθρώπινου παράγοντα σε αυτή την τεχνική καθώς και τους περιορισμούς που σχετίζονται με αυτή. Για να μειωθούν οι αποκλίσεις, πρέπει να γίνει μεγάλη προσπάθεια για να υπάρχουν συνεχείς καταγραφές των συνθηκών για κάθε αναλυτή, όπως η συνέπεια στη σειρά των δειγμάτων ή τη χρησιμοποίηση της ίδιας κλίμακας για την ένταση του αρώματος (Delahunty, Eyres, & Dufour, 2006).

### **2.3 Συνθήκες κατά την ανίχνευση**

Πρέπει να γίνει η υπενθύμιση ότι ο άνθρωπος είναι ο ανιχνευτής στην συγκεκριμένη τεχνική, οπότε ελαχιστοποιώντας όλους τους παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν τον εκτιμητή και κατά συνέπεια να επιδράσουν τα αποτελέσματα της

ανάλυσης είναι πολύ σημαντικά όπως και στη συμβατική οργανοληπτική εξέταση. Για παράδειγμα, το περιβάλλον στο οποίο πραγματοποιείται η ολφακτομετρική εκτίμηση είναι μεγάλης σημασίας. Ακόμα πιο σημαντικό, το εργαστήριο πρέπει να είναι ελεύθερο οσμών και ήχων και πρέπει να επιτρέπει τη διατήρηση σταθερής θερμοκρασίας και πίεσης.

Αντίθετα, με τις συμβατικές μεθόδους οργανοληπτικού ελέγχου, το άτομο που εκτιμά το δείγμα πρέπει να έρθει σε επαφή με πολλές διαφορετικές οσμές που εμφανίζονται για μερικά μόνο δευτερόλεπτα σε μη καθορισμένα χρονικά διαστήματα κατά τη χρωματογραφική ανάλυση που συνήθως διαρκεί δεκάδες λεπτά κάθε φορά. Παρόλα αυτά, λάθη της κλασσικής οργανοληπτικής εξέτασης μπορεί να συμβούν και εδώ, σχετιζόμενα με την ικανότητα του ατόμου να θυμηθεί προφίλ αρωμάτων και η ικανότητα να προβλέπει ή να υπολογίζει τη σύνθεση και το περιεχόμενο των αρωματικών στοιχείων σε επόμενα δείγματα. Αυτό είναι αληθές όταν τα δείγματα δεν διαφέρουν σημαντικά ποιοτικά και ποσοτικά και αναλύονται περισσότερες από δύο φορές. Η πιθανότητα αυτού του είδους λάθους μπορεί να μειωθεί αναλύοντας τα δείγματα σε τυχαία σειρά και/ή τοποθετώντας κενά δείγματα ή τελείως διαφορετικά δείγματα από τη σειρά δειγμάτων του πειράματος μέσα στην αλληλουχία.

Τα δείγματα που προέρχονται από αλκοολούχα ποτά, ειδικά από κρασί, είναι συχνά πολύπλοκα μίγματα από πολλές ενώσεις, των οποίων ο διαχωρισμός απαιτεί τη χρήση μεγάλων χρωματογραφικών προγραμμάτων. Για να εμποδιστεί η μείωση της ευαισθησίας αναγνώρισης λόγω κόπωσης, ειδικά για αναλύσεις που διαρκούν περισσότερο από 25 λεπτά, η ανάλυση πρέπει να χωρίζεται σε κομμάτια, και ο αναλυτής να αλλάζει σε κάθε ένα από αυτά (Bernet et al., 2002). Επίσης, έχει βρεθεί η αυξημένη ροή ενός βοηθητικού αερίου στη γραμμή του ολφακτομετρικού διαύλου μειώνει την οργανοληπτική ευαισθησία, αλλά και δημιουργεί διαφορά στο χρόνο του ανιχνευτή που χρησιμοποιείται και στο sniffer, οπότε αυτή η παράμετρος πρέπει να βελτιστοποιηθεί πολύ προσεκτικά (Hanaoka, Sieffermann & Giampaoli, 2000).

## **2.4 Συνθήκες χρωματογραφήματος**

Πολύ σημαντική από την άποψη του ολφακτομετρικού προσδιορισμού είναι η επιλογή των κατάλληλων χρωματογραφικών συνθηκών, όπως η θερμοκρασία και η

μέθοδος εισαγωγής του δείγματος, καθώς και ο τύπος της σταθερής φάσης της στήλης χρωματογραφίας. Η θερμική εκρόφηση χρησιμοποιείται τυπικά με τις headspace μεθόδους, και πιο συχνά στο splitless mode. Το εκχύλισμα διαλύτη, από την άλλη μπορεί να εισάγεται σε χαμηλή θερμοκρασία κατευθείαν στη στήλη και έτσι αποφεύγεται η αποσύνθεση θερμικά ασταθών ενώσεων.

Η στατική φάση της χρωματογραφικής στήλης πρέπει να εξασφαλίζει όχι μόνο υψηλή επιλεκτικότητα, αλλά και ικανότητα διαχωρισμού, καθώς το σχήμα των κορυφών είναι επίσης σημαντικό, ειδικά στην περίπτωση μεθόδων όπου μετράται απευθείας η ένταση. Αν το μίγμα των αρωματικών ενώσεων είναι υπερβολικά πολυπλοκό ή αν οι ενώσεις είναι ισομερείς, είναι μερικές φορές απαραίτητο να χρησιμοποιηθεί δύο διαστάσεων και / ή chiral χρωματογραφία, για να επιτευχθεί ικανοποιητική εκλεκτικότητα (Wanikawa, Hosoi, Kato & Nakagawa, 2002). Παρά το γεγονός ότι μία τέτοια προσέγγιση είναι συνήθως ικανή να επιφέρει ικανοποιητική χρωματογραφική διαχώριση των ενώσεων, δεν είναι πάντοτε επαρκής για ολφακτομετρική ανίχνευση από τον εκτιμητή, ειδικά όταν τα αρώματα έχουν μεγάλη διάρκεια, όπως για παράδειγμα οι θειούχες ενώσεις. Για να αμβλυνθεί το πρόβλημα, μία ειδική διασύνδεση έχει αναπτυχθεί για πολυδιάστατη χρωματογραφία, που επίσης ονομάζεται double-cool-strand διασύνδεση, κατά την οποία οι ενώσεις που φεύγουν από την πρώτη στήλη παγιδεύονται κρυσταλλικά σε μεταφορικούς τριχοειδείς βρόχους και διαδοχικά εισάγονται στη chiral στήλη, σε χρονικά διαστήματα από μερικά δευτερόλεπτα μέχρι ορισμένα λεπτά (Begnaud, Starkenmann, Waal & Chaintreau, 2006).

## 2.5 Ποσοτικές μέθοδοι

Διάφορες ποσοτικές μέθοδοι υπάρχουν για την εκτίμηση της έντασης των αρωμάτων και τη σχετική επίδραση στο άρωμα του δείγματος (Ruth, 2001). Αυτές οι μέθοδοι μπορεί να κατηγοριοποιηθούν σε τρία γκρουπ ανάλογα με τη μέθοδο προσδιορισμού :

- Μέθοδοι ανίχνευσης της συχνότητας (Ferrari et al., 2004)
- Μέθοδοι αραιώσης μέχρι το κατώφλι αντίληψης

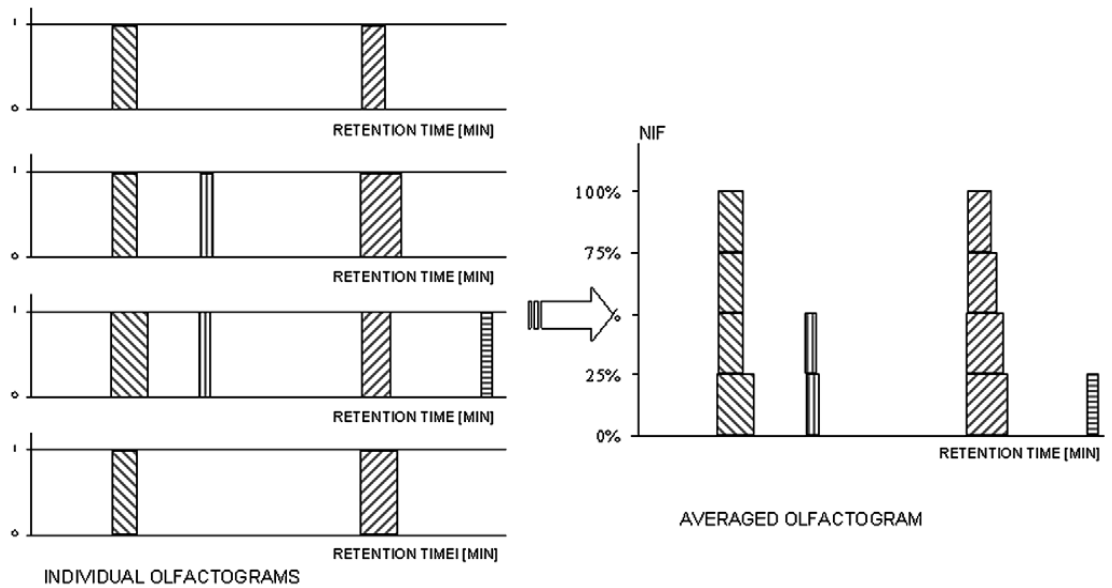
- Μέθοδοι απευθείας μέτρησης της έντασης.

Το δεύτερο γκρουπ αποτελείται από παγκόσμια χρησιμοποιούμενες μεθόδους όπως η ονομαζόμενη μέθοδος CHARM (μέτρηση απόκρισης σε συνδυαστικό άρωμα) (Kishimoto, Wanikawa, Kono & Shibata, 2006) και AEDA (ανάλυση αραιώσης εκχυλίσματος αρώματος) (Kotseridis, Razungles, Bertrand & Baumes 2000), ενώ η ομάδα μεθόδων που μετράει απευθείας την ένταση περιλαμβάνει μεθόδους έντασης μεταγενέστερα (Petka, Ferreira & Cacho, 2005) καθώς και μεθόδους χρόνου-έντασης: OSME (Deibler et al., 2004) και τη μέθοδο *fingerspan* (Bernet et al., 2002).

### **2.5.1 Ανιχνευτικές μέθοδοι συχνότητας**

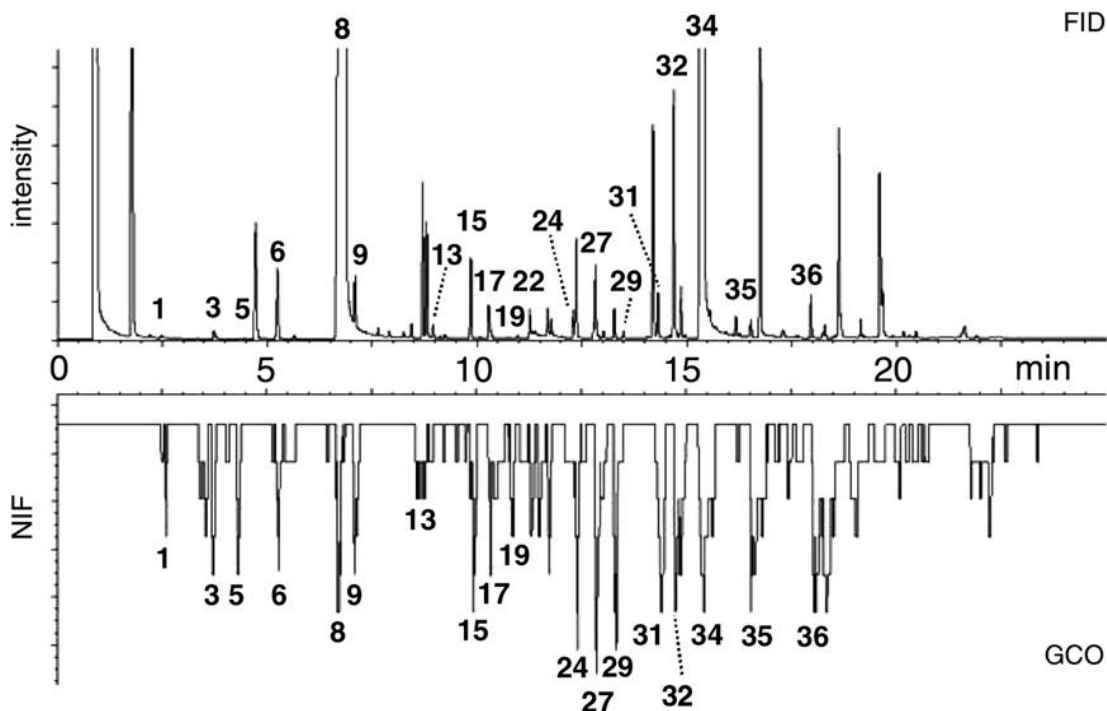
Στις μεθόδους ανίχνευσης της συχνότητας, μία ομάδα αποτελούμενη από 6-12 άτομα αναλύει το ίδιο δείγμα. Το ποσοστό των ατόμων που αισθάνθηκαν το αρωματικό στοιχείο σε ένα συγκεκριμένο χρόνο κατακράτησης καταμετράται (Fur et al., 2003). Τα στοιχεία που ανιχνεύθηκαν περισσότερες φορές σε σχέση με τα άλλα αναγνωρίζεται ότι έχουν μία πιο σημαντική επίδραση στο άρωμα του συγκεκριμένου δείγματος. Μερικές φορές τα αποτελέσματα για κάθε περιοχή οσμών, ποσοτικοποιούνται με τη χρήση των ονομαζόμενων ως ολφακτομετρικών *intices*, που περιλαμβάνουν τιμές NIF (συχνότητα ρινικών επιπτώσεων) ή SNIF (επιφάνεια της συχνότητας ρινικών επιπτώσεων) (σχήμα 2). Η τιμή NIF ορίζεται στην τιμή 1 όταν κάθε ένας από τους αναλυτές αισθάνθηκε τη δοθέντα οσμή, και στο 0 όταν κανένας δεν αναγνώρισε καμία οσμή σε συγκεκριμένο χρόνο κατακράτησης (Ferrari et al., 2004), και αντιστοιχεί στο συνολικό ύψος του ολφακτομετρικού σήματος (κατακόρυφος άξονας στο σχήμα). Οι τιμές SNIF λαμβάνουν υπόψη τον ολφακτομετρικό χρόνο διέγερσης (σκιώδεις περιοχές στο σχήμα2) (Pollien et al., 1997).





**Εικόνα 2 Ολφακτογράφημα από 4 αξιολογητές με τη μέθοδο ανίχνευσης συχνότητας**

Στο σχήμα 3 φαίνεται ένα παράδειγμα ολφακτογραφήματος που λήφθηκε με μέθοδο ανίχνευσης συχνότητας. Το αποτέλεσμα σχετίζεται μόνο με την ένταση της οσμής σε ορισμένη συγκέντρωση της ένωσης στο δείγμα, που είναι και ο κύριος περιορισμός σε αυτό το είδος μεθόδων. Αν μία ένωση εμφανίζεται σε συγκεντρώσεις πάνω από το κατώφλι αντίληψης, έτσι ώστε να γίνει αντιληπτή από όλους τους εκτιμητές, τότε ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση, το αποτέλεσμα της ανάλυσης ενός συγκεκριμένου δείγματος μπορεί να είναι το ίδιο.



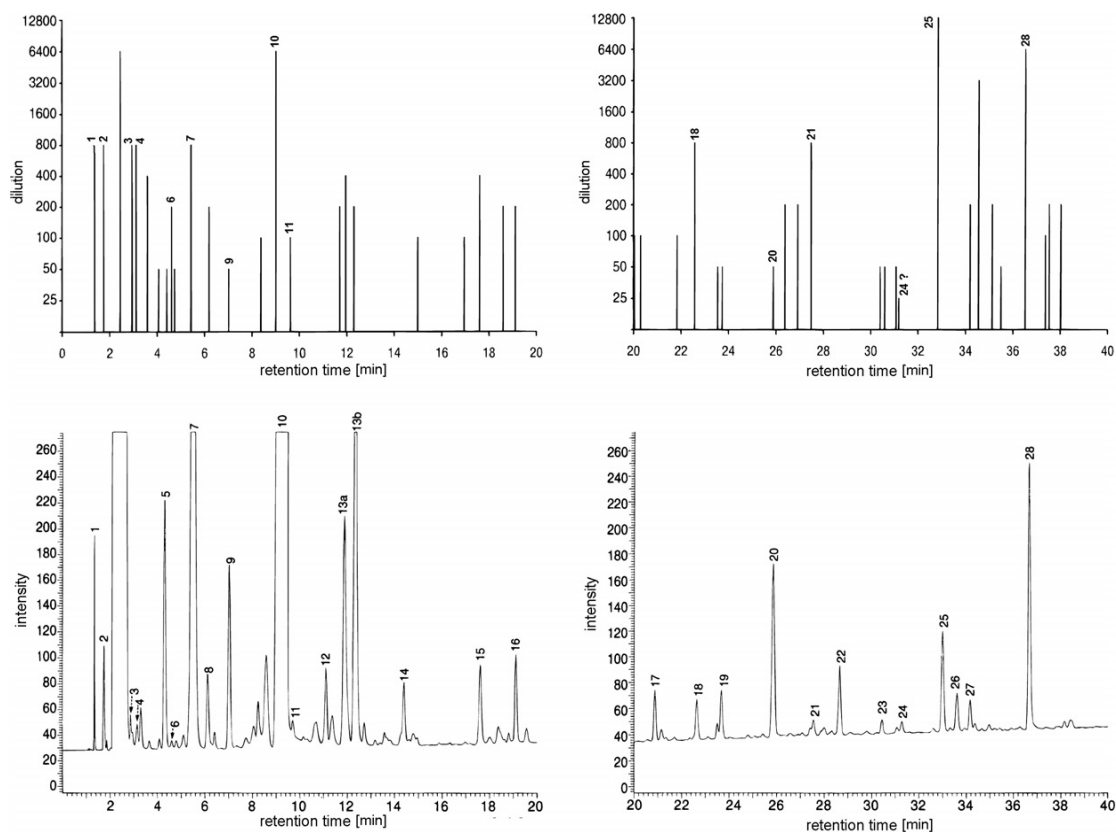
Εικόνα 3 Σύγκριση αρωματικών προφίλ από οίνο Riesling Ρήνου Κροατίας με αέρια χρωματογραφία με ανιχνευτή φλόγας ιονισμού (πάνω) και ολφακτομετρικό ανιχνευτή (κάτω) με τη μέθοδο ανίχνευσης συχνότητας (από Komes et al., 2006)

Το θεμελιώδες όφελος των μεθόδων που βασίζονται σε συχνότητα ανίχνευσης είναι η απλότητά τους, χάρη στην οποία εκπαιδευμένοι αξιολογητές δεν απαιτούνται. Οι μέθοδοι είναι επαναλήψιμες, και τα αποτελέσματα αντικατοπτρίζουν τις διαφορές στην ευαισθησία μεταξύ των αξιολογητών, που μπορεί να σχετίζεται με διαφορές μέσα σε ένα δοθέντα πληθυσμό. Οι μέθοδοι ανίχνευσης συχνότητας είναι οι πιο οικονομικές από άποψη χρόνου και οι πιο εύκολες για να πραγματοποιηθούν ενώ αντίθετα οι μέθοδοι της αραίωσης μέχρι το κατώφλι αντίληψης, είναι οι πιο χρονοβόρες και οι μέθοδοι απευθείας υπολογισμού της έντασης είναι οι δυσκολότερες για να πραγματοποιηθούν δεόντως (Delahunty et al., 2006).

### 2.5.2 Μέθοδοι αραίωσης μέχρι το κατώφλι

Οι μέθοδοι αραίωσης μέχρι το κατώφλι αντίληψης χρησιμοποιούνται συχνά στην ανάλυση των οσμών από αλκοολούχα ποτά. Παρέχουν ποσοτική περιγραφή των αρωματικού δυναμικού μίας συγκεκριμένης ένωσης που βασίζεται στην αναλογία μεταξύ της συγκέντρωσής της στο δείγμα και στο οργανοληπτικό κατώφλι στον αέρα (Delahunty et al., 2006). Αυτές οι μέθοδοι αποτελούνται από προετοιμασία σειράς

αραιώσεων των εκχυλισμάτων των αρωματικών ενώσεων, τις περισσότερες φορές δύο, τρεις, πέντε ή και δέκα φορές επίπεδο αραίωσης (R) και στη συνέχεια εκτιμάται το κάθε δείγμα με ανιχνευτή αρώματος (Ferreira, Petka et al., 2002) (σχήμα4). Ο εκτιμητής δηλώνει σε ποια αραίωση το στοιχείο μπορεί να ανιχνευτεί και συνήθως περιγράφει και το είδος της οσμής.



**Εικόνα 4** Σύγκριση αρωματικών προφίλ σε τεκίλα με αέρια χρωματογραφία με ολφακτομετρία με τη μέθοδο AEDA (πάνω) και ανιχνευτή φλόγας ιονισμού (κάτω) (από Benn & Peppard, 1996)

Το αρωματικό δυναμικό μπορεί να περιγραφεί ως τιμές αρώματος ή τιμές οσμής (άρωμα στόματος) καθώς και μονάδες αρώματος ή τιμές οσμής (άρωμα στόματος) (Delahunty et al., 2006). Πιο συχνά καταμετρούνται ως τη λεγόμενη τιμή δραστηριότητα αρώματος (OAVs) (Cullere et al., 2004), που αντιπροσωπεύουν την αναλογία της συγκέντρωσης μίας δοθείσας ουσίας στο δείγμα με το κατώφλι οργανοληπτικής ανίχνευσης.

Η μέθοδος AEDA υπολογίζει την υψηλότερη αραίωση του δείγματος κατά την οποία το αναλυθέν στοιχείο παραμένει ανιχνεύσιμο. Αυτή η τιμή χρησιμοποιείται για να υπολογιστεί η λεγόμενη αραίωση αρωματικού παράγοντα (FD) (Ruth, 2001). Αν η τελευταία αραίωση στην οποία η ένωση παραμένει ανιχνεύσιμη ισούται με P

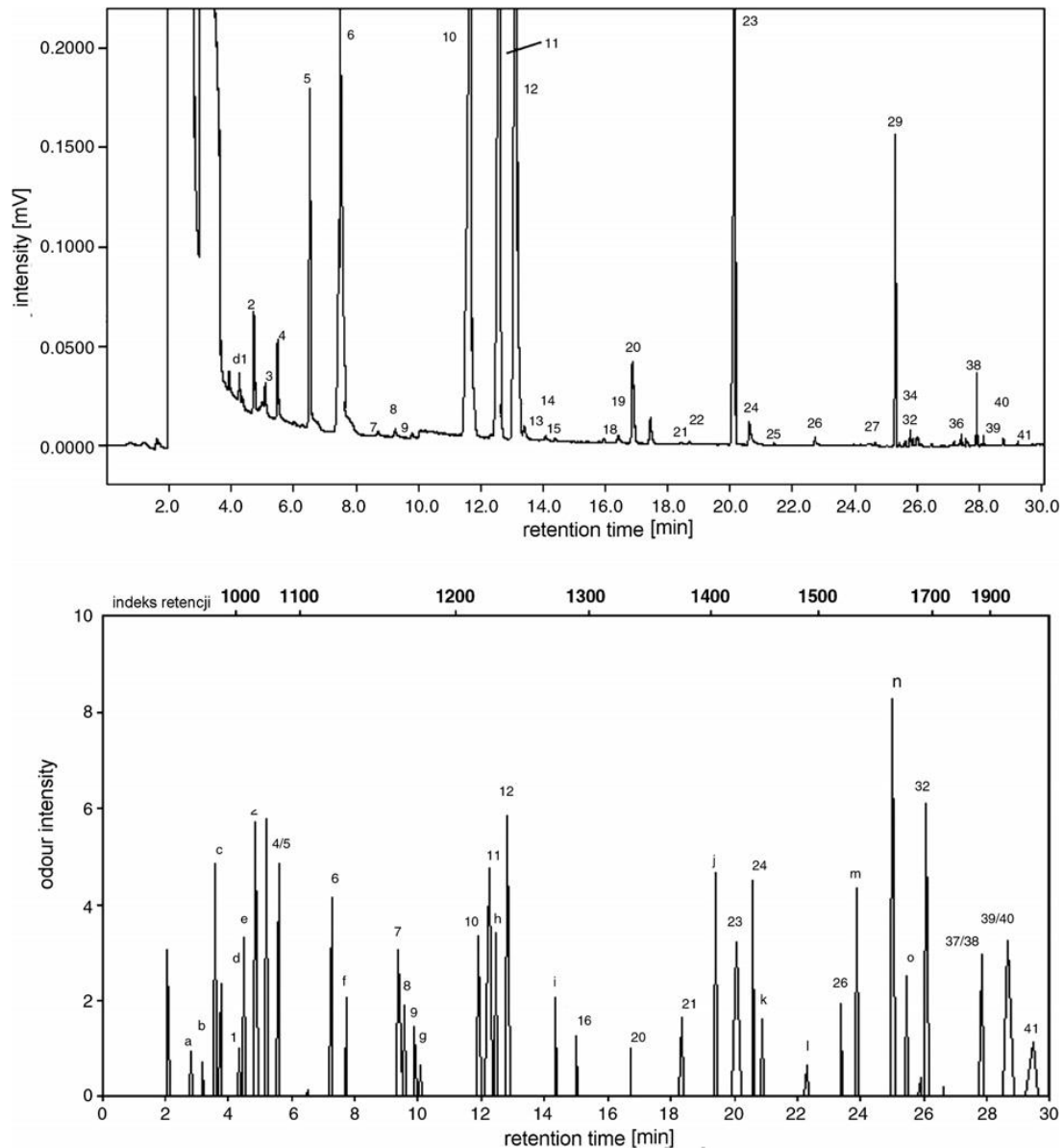
( $P=0,1,2,3,\dots$ ) τότε ο παράγοντας αραίωσης είναι  $R^P$  (Ferreira, Petka et al., 2002). Από τον ορισμό FD προκύπτει ότι για να μπορεί ο παράγοντας αραίωσης να χρησιμοποιηθεί ως ποσοτική μέτρηση, πρέπει να υπάρχει συνοχή των συνθηκών για τον προσδιορισμό των αρωματικών ενώσεων στα υπό ανάλυση προϊόντα, ειδικά όταν πρόκειται για την διαδικασία της εκχύλισης.

Συγκρινόμενη με την μέθοδο AEDA, η μέθοδος CHARM απαιτεί έναν επιπρόσθετο προσδιορισμό της διάρκειας της αίσθησης του αρώματος στο έκλουσμα της στήλης, και επιτρέπει τον προσδιορισμό συγκεκριμένων κορυφών του χρωματογραφήματος. Οι περιοχές των κορυφών εκφράζονται σε χωρίς διάσταση τιμές Charm, που είναι ανάλογες της ποσότητας της ένωσης στο εκχύλισμα, και αντιστρόφως ανάλογες στο οργανοληπτικό κατώφλι αντίληψης (Acree, Barnard & Cunningham, 1984). Ενώ ο παράγοντας αραίωσης αρώματος ανταποκρίνεται μόνο στο ύψος της κορυφής, ο CHARM λαμβάνει υπ' όψιν και το πλάτος αλλά και σχήμα της κορυφής, οπότε χαμηλές και πλατειές κορυφές χαρακτηρίζονται από υψηλότερο κατώφλι αντίληψης, αλλά παρουσιάζόμενες στο δείγμα σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, μπορεί να δώσει την ίδια τιμή CHARM καθώς λεπτές και ψηλές κορυφές στοιχείων με χαμηλό κατώφλι αντίληψης που βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Άρα, η τιμή CHARM είναι κατάλληλη για τον προσδιορισμό της σημαντικότητας ατομικών αρωματικών ενώσεων στο δείγμα, με κόστος μικρότερης ακρίβειας.

Οι μέθοδοι αραίωσης έχουν επίσης κάποια μειονεκτήματα. Ο συνολικός χρόνος της ανάλυσης είναι μεγάλος, ειδικά στην περίπτωση μεγάλου αριθμού πάνελ γευσιγνωσίας, οπότε και ο αριθμός των αξιολογητών που λαμβάνουν μέρος στην εξέταση είναι περιορισμένος. Αυτό, με τη σειρά του, αυξάνει την πιθανότητα απόκτησης μικρής ακρίβειας και υποκειμενικών αποτελεσμάτων. Επιπρόσθετα, τα αποτελέσματα που λαμβάνονται βασίζονται κυρίως στο οργανοληπτικό κατώφλι αντίληψης των ενώσεων παρά στην πραγματική ένταση του αρώματος στο δωθέν δείγμα (Etievant et al., 1999). Οι μέθοδοι αραίωσης μέχρι το κατώφλι επίσης επικρίνονται για υποκειμενική λάθος υπόθεση ότι η ένταση του αρώματος αυξάνει παράλληλα με τη συγκέντρωση για όλα τα αρωματικά συστατικά του δείγματος (Petka et al., 2005).

### 2.5.3 Μέθοδοι απευθείας έντασης

Στις μεθόδους ανίχνευσης συχνότητας και της αραίωσης μέχρι κατώφλι αντίληψης, κάθε ένας από τους αξιολογητές δηλώνει την παρουσία ή απουσία ενός αρώματος με το ερέθισμα, ενώ στην μέθοδο απευθείας έντασης, η ένταση του ερεθίσματος αλλά και η διάρκεια καταμετρώνται. Ενώ η μέθοδος αραίωση προς το κατώφλι καθιστά τη μέτρηση της έντασης του ερεθίσματος αδύνατη, η απευθείας ένταση χρησιμοποιεί ένα διαφορετικό είδος ποσοτικών κλιμάκων για να μετρηθεί η ένταση του αρώματος της εκλούμενης ένωσης. Ανάλογα με τη μέθοδο, η μέτρηση μπορεί να γίνει με διαφορετικούς τρόπους. Αυτοί περιλαμβάνουν μία μονή, με βάση το μέσο χρόνο μέτρηση (Fan & Qian, 2006b), μία μέτρηση που καταγράφεται μετά την έκλυση της ουσίας (μέθοδοι μεταγενέστερης ανίχνευσης της έντασης), ή πιο συχνά, μία δυναμική μέτρηση, όπου η εμφάνιση μίας οσμής, η μέγιστη ένταση και εξασθένηση καταγράφονται με ένα συνεχιζόμενο τρόπο (OSME, μέθοδος Fingerspan) (Fu, Yoon & Bazemore, 2002). Στην πρώτη περίπτωση, ο αξιολογητής προσδιορίζει κάθε ένωση που παρουσιάζεται στο έκλουσμα με μία κατάλληλη τιμή από μία εκ των προτέρων προσδιορισμένη κλίμακα έντασης (όμοια με την τυπική οργανοληπτική εξέταση), ενώ στη δεύτερη περίπτωση, κορυφές παρόμοιες με τις κορυφές χρωματογραφήματος ορίζονται ως ανταπόκριση στις ενώσεις. Το ολφακτογράφημα που λαμβάνεται είναι όμοιο με το χρωματογράφημα που αποκτήθηκε με τη χρήση τυπικών ανιχνευτών και αντιπροσωπεύει την ένταση του αρώματος ως λειτουργία του χρόνου κατακράτησης (εικόνα 5). Το ύψος της κορυφής ανταποκρίνεται στο μέγιστο της αρωματικής έντασης, ενώ το πλάτος στη διάρκεια του αρώματος.



Εικόνα 5 Σύγκριση αρωματικών προφίλ ενός αλκοολούχου ποτού από παραπροϊόν κάσιους με αέρια χρωματογραφία και ανιχνευτή φλόγας ιονισμού (πάνω) και ολφακτομετρία (κάτω) με τη μέθοδο OSME. Οι ενώσεις με γράμμα δεν ανιχνεύθηκαν από τον FID (Garruti et al., 2006)

Προσπάθειες να συσχετιστούν ποσοτικές αξιολογήσεις αρωματικών στοιχείων με ένταση αρώματος σε ερυθρούς οίνους από Ισπανία έδειξαν ότι οι ατομικοί τύποι των οίνων μπορεί να διαφοροποιηθούν βάση διαφορών στην ένταση του αρώματος αλλά και σε διαφορές σε OAV σε ορισμένα αρωματικά συστατικά (Cullere et al., 2004). Έχει βρεθεί ότι, παρόλαυτά οι πιθανότητες διαφοροποίησης ήταν σημαντικά μειωμένες σε περιπτώσεις όπου το ολφακτομετρικό σήμα βρισκόταν σε κοντινή θέση σε ένα μεγάλο αριθμό άλλων σημάτων, και όταν η αρωματική ένταση ήταν πολύ υψηλή σε όλα τα δείγματα προς ανάλυση. Αυτό δείχνει ότι η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου προετοιμασίας του δείγματος είναι κρίσιμη. Κάποιος θα πρέπει να πασχίσει

για να αποκτήσει απλά ολφακτογραφήματα, ελαχιστοποιώντας την πιθανότητα εκχύλισης στοιχείων με μικρή συσχέτιση στις οργανοληπτικές ιδιότητες του δείγματος, καθώς και στοιχεία που εμφανίζονται σε συγκεντρώσεις κοντά στο κατώφλι αντίληψης (Barylko-Pikielna, 1975).

Λίγες πληροφορίες είναι διαθέσιμες στην ποσοτική αξιολόγηση αρωματικών ενώσεων χρησιμοποιώντας ολφακτομετρικούς ανιχνευτές. Όμως, έχει βρεθεί σημαντική συσχέτιση μεταξύ του λογάριθμου της περιοχής μιας κορυφής με βάση τη μέθοδο OSME και το λογάριθμο της ένωσης στο δείγμα (Petka et al., 2005), μεταξύ της έντασης της οσμής δηλαδή και το λογάριθμο της συγκέντρωσης της ουσίας, όπως περιγράφεται από το Steven's Law (Rossiter, 1996).

Για να σχεδιαστεί ένα ολφακτογράφημα, ειδικοί σχεδιαστικοί οδηγοί (σχετιζόμενοι με διαφορετικές αντιστάσεις) ελέγχονται με ένα ποντίκι υπολογιστή, spring-buttons ή sliders (στη μέθοδο Fingerspan) είναι οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι (Hanaoka et al., 2000). Το μοναδικό μειονέκτημα στην πράξη αυτών των μεθόδων είναι η ανάγκη το πάνελ των αξιολογητών να έχει την κατάλληλη εκπαίδευση, όμως ένα έμπειρο πάνελ γευσιγνωστών παράγει γρήγορα, επαναλήψιμα και γενικά συνεπή αποτελέσματα (Delahunty et al., 2006). Η μέθοδος fingerspan απαιτεί σχετικά μικρή προετοιμασία από τους αξιολογητές. Χρησιμοποιήθηκε για να εκτιμηθεί η πιθανότητα διαφοροποίησης οίνων Gewurztraminer από την Αλσατία από διαφορετικά οινοποιεία από ένα μη εκπαιδευμένο πάνελ αξιολογητών (Bernet et al., 2002). Η απλότητα της μεθόδου, σύμφωνα με τους συγγραφείς της εργασίας, πηγάζει από την ενστικτώδη μέθοδο καταγραφής των ολφακτογραφημάτων, με βάση τη μετατροπή του αρωματικού ερεθίσματος με την κίνηση των δακτύλων, δηλαδή μετακινώντας το ολισθαίνον ποτενσιόμετρο με τη χρήση του αντίχειρα και του δείκτη ή του μεσαίου δακτύλου. Η απόσταση μεταξύ των δύο είναι ανάλογη της έντασης της οσμής, και ο χρόνος κύλισης αντιστοιχεί στη διάρκεια της οσμής στον ολφακτομετρικό δίαυλο. Έρευνες έχουν δείξει ότι και μία εντελώς απροετοίμαστη ομάδα αξιολογητών έχει επαναλήψιμες ολφακτομετρικές μετρήσεις. Οι αξιολογητές εξοικιώθηκαν με τα όργανα και ένα είδος αυτοβαθμονόμησης (autocalibration) της ποτενσιομετρικής κλίμακας έγινε για να υπολογιστεί η ένταση ενός αρώματος που συνέβη αμέσως μετά από περίπου δύο χρωματογραφικές αναλύσεις. Τα αποτελέσματα από προηγούμενες μελέτες που δείχνουν ότι η μέτρηση της αρωματικής έντασης ήταν πιο αναπαράξιμη από ότι η μέτρηση της διάρκειας έχει

επιβεβαιωθεί, με τον προσδιορισμό του τέλους της οσμής να είναι πιο δύσκολο από ότι ο προσδιορισμός της αρχής της.

## **2.6 Παραδείγματα εφαρμογών της αέριας χρωματογραφίας με ολφακτομετρική ανίχνευση**

Έρευνες πάνω στην αέρια χρωματογραφία-ολφακτομετρία πάνω στο άρωμα αλκοολούχων ποτών συνήθως έχουν ως σκοπό τον προσδιορισμό της σχέσης μεταξύ της σύνθεσης και του περιεχομένου σε πτητικές ενώσεις και τις οργανοληπτικές ιδιότητες προϊόντων όπως η μύρα (Soares da Costa et al., 2004), το κρασί (Campo et al., 2005, Lee & Noble, 2003) και whisky (Wanikawa et al., 2002), καθώς και την αναγνώριση και σύγκριση μεταξύ των ενώσεων που συμμετέχουν στο άρωμα διαφόρων αλκοολούχων ποτών, όπως το κρασί (Cullere et al., 2004, Ferreira et al., 2001, Gurbuz et al., 2006, Guth, 1997, Kotseridis et al., 2000, Lopez et al., 1999, Petka, Ferreira, Gonzales-Vinas & Cacho, 2006, Schneider, Baumes, Bayononove & Razungles, 1998), το κονιάκ (Ferrari et al., 2004), την μύρα με ή χωρίς λυκίσκο (Kishimoto et al., 2006) και τεκίλα (Benn & Peppard, 1996). Κάποιος άλλος στόχος μπορεί να είναι ο προσδιορισμός στοιχείων που είναι υπεύθυνα για ανεπιθύμητες οσμές (Darriet et al., 2002, Darriet, Pons, Lamy & Dubordieau, 2000, Guerche et al., 2006, Simpson, Capone & Sefton, 2004).

Τα αποτελέσματα από GC-O συχνά συσχετίζονται με αποτελέσματα συμβατικής οργανοληπτικής εξέτασης που διενεργείται παράλληλα, συνήθως χρησιμοποιώντας τυπικές μεθόδους, ειδικά μεθόδους ανίχνευσης διαφορών (Barylko-Pikielma, 1975) όπως είναι το τριγωνικό τεστ (Campo et al., 2005, Kotseridis et al., 2000), το τεστ duo-trio (Escudero et al., 2004) η περιγραφική οργανοληπτική ανάλυση (Souza et al., 2006). Η οργανοληπτική εξέταση των ατομικών δειγμάτων αποδίδει περιγραφικούς όρους που χαρακτηρίζουν το άρωμα. Η χρωματογραφική ανάλυση μπορεί να προσδιορίσει ποιες ενώσεις ευθύνονται για το κάθε άρωμα. Αν η συσχέτιση μεταξύ των περιγραφικών και των ενώσεων είναι πολύπλοκη, τότε είναι καλό να χρησιμοποιείται η κατάλληλη χυμομετρική μέθοδος, όπως σε μεθόδους ανάλυσης παλινδρόμησης (μέθοδος ελάχιστων τετραγώνων (Campo et al., 2005) ή ανάλυση procrustes (Fur et al., 2003)).



### **2.6.1 Χρησιμοποιώντας τη GC-O για την ανίχνευση αρωματικών ενώσεων σε αλκοολούχα ποτά**

Η αέρια χρωματογραφία επιτρέπει το διαχωρισμό και αναγνώριση των περισσοτέρων στοιχείων που ανήκουν στο πτητικό κλάσμα των προϊόντων. Παρόλα αυτά, λόγω των διαφορών στο κατώφλι αντίληψης και την πορεία των ψυχομετρικών λειτουργιών ατομικών στοιχείων, δεν είναι δυνατό να αναλυθεί η οργανοληπτική δραστηριότητα με τους κοινούς ανιχνευτές. Μία σύγκριση ολφακτογραφημάτων με χρωματογραφήματα που αποκτήθηκαν με τη χρήση ανιχνευτών όπως αυτός της φλόγας ιονισμού (FID) ή φασματογράφου μάζας (MS) συχνά αποκαλύπτει ότι στοιχεία με μεγάλο σήμα είναι ελάχιστα ανιχνεύσιμα κατά την έκλυση από τη στήλη, και τούμπαλιν. Πρέπει να δοθεί έμφαση στο ότι μερικές φορές ενώσεις που ανιχνεύονται με τη μύτη ως κορυφές σε ένα ολφακτογράφημα δεν είναι όλες ανιχνεύσιμες με τους κοινούς ανιχνευτές, που δείχνει τη μεγάλη ευαισθησία την ανθρώπινης μύτης (Ferreira et al., 1998).

Όταν η συγκέντρωση μίας αρωματικής ένωσης είναι τόσο μικρή που η ανίχνευση και αναγνώριση με ένα κοινό ανιχνευτή είναι αδύνατη, μερικές φορές μία εισαγωγική ολφακτομετρική ανάλυση μπορεί να καθορίσει το χρόνο κατακράτησης ενός συγκεκριμένου στοιχείου για το σκοπό του επιλεκτικού του εμπλουτισμού. Μία πιθανότητα είναι η κρυοπαγίδευση του εκλούσματος σε μία άδεια ανενεργή στήλη με τη χρήση υγρού αζώτου ως τον φορέα ψύξης (Callemien, Dasnoy & Collin, 2006). Ένας splitter (διαχωριστής) του ρεύματος έκλυσης που επιτρέπει ηλεκτρονικά την αλλαγή της ροής στην παγίδα σε ένα επιλεγμένο εύρος χρόνων κατακράτησης που γίνεται για επιλεκτικό εμπλουτισμό των μη ταυτοποιημένων ενώσεων του αρώματος της μύρας υπεύθυνα για την ανεπιθύμητη οσμή καπνού που παρουσιάζεται κατά την ωρίμανση της μύρας. Πρέπει να τονιστεί ότι η αναγνώριση μέσω φασματογράφου μάζας σε ένα εκχύλισμα αιθέρα έγινε δυνατή μόνο αφού λήφθηκε το κλάσμα μετά από 30 συνεχόμενες χρωματογραφικές αναλύσεις, ενώ με την ολφακτομετρία ήταν ανιχνεύσιμο χωρίς συμπύκνωση του δείγματος.

Η αέρια χρωματογραφία με ολφακτομετρία χρησιμοποιείται συχνά για να δημιουργηθούν αρωματικά προφίλ για χαρακτηριστικά παραδοσιακών αλκοολούχων ποτών σε οποιαδήποτε χώρα ή περιοχή, που συνήθως διαφοροποιούνται με μη τυπικά αρώματα που πηγάζουν από συγκεκριμένες πρώτες ύλες ή τεχνολογίες που

χρησιμοποιήθηκαν κατά την παραγωγή τους. Ανάμεσα σε πολυάριθμα παραδείγματα, έρευνες που μπορεί να αναφερθούν και είχαν ως στόχο τον καθορισμό των αρωματικών ενώσεων του αρώματος παραδοσιακών κινέζικων αποσταγμάτων συμπεριλαμβανομένου Yanghe Daqu (Fan & Qian, 2005, 2006b), Wyliangye και Jiannanchum (Fan & Qian, 2006a), Pinot Noir οίνος από το Oregon (Fang & Qian, 2005), οίνος Petite Arvine από την Ελβετία (Fretz et al., 2005), Rhine Riesling από την Κροατία (Komes, Ulrich & Lovric, 2006), νεαροί λευκοί οίνοι από τα Κανάρια νησιά (Lopez et al., 2003), Turkish Kalecik Karasu οίνος (Selli et al., 2004) ή Cachaca, ένα απόσταγμα ζαχαροκάλαμου από τη Βραζιλία.

Κάποιες φορές οι ποικιλίες αμπελιών από τα οποία παράγονται οι οίνοι, εξετάζονται. Έρευνες έχουν δείξει ότι ένα σημαντικό ποσοστό των αρωματικών ενώσεων που συμμετέχουν στο άρωμα των οίνων εμφανίζονται ήδη κατά το σχηματισμό των καρπών ως αποτέλεσμα χημικών και ενζυματικών αντιδράσεων, και η τελική σύνθεση κυρίως εξαρτάται από την ποικιλία αμπέλου. Για παράδειγμα οι Schneider et al. προσδιόρισαν πτητικά μονοτερπένια και norisoprenoids σε σταφύλια *Vitis vinifera* L. Cv. Melon B. που σχηματίστηκαν ως αποτέλεσμα ενζυματικής αποκαρβοξυλίωσης των γλυκοσιδίων και είναι υπεύθυνα για το άρωμα του Muscat οίνου (Schneider, Rzaungles, Augier & Baumew, 2001). Οι Serot et al. ταυτοποίησαν τα κύρια ενεργά αρωματικά συστατικά σε μούστο από Γαλλορουμανικά υβρίδια, έχοντας σταθερά αποτελέσματα για τρεις ολφακτομετρικές μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν (Serot, Prost, Visan & Burcea, 2001).

### **2.6.2 Εφαρμογές της GC-O για ποιοτικό έλεγχο πρώτων υλών που χρησιμοποιήθηκαν για να παραχθούν αλκοολούχα ποτά**

Η χαμηλή ποιότητα αλκοολούχων ποτών, ειδικά κρασί, συχνά είναι αποτέλεσμα χρήσης πρώτων υλών χαμηλής ποιότητας. Η ζύμωση σαπισμένων ή μουχλιασμένων φρούτων ή σιτηρών έχει ως αποτέλεσμα τη φτωχή οργανοληπτική ποιότητα ως αποτέλεσμα της παρουσίας αποικοδομηθέντων παραγώγων των φυσικών συστατικών των πρώτων υλών, καθώς και σε ανεπιθύμητους μικροβιακούς μεταβολίτες. Η ανάπτυξη της μούχλας είναι εξαιρετικά ανεπιθύμητη λόγω των αρωμάτων χόματος, μύκητα ή μπαγιάτικου που εμφανίζονται στο άρωμα. Αυτές οι

οσμές προκαλούνται από στοιχεία που συνήθως έχουν πολύ χαμηλό κατώφλι αντίληψης, όπως η γεωσμίνη, η 2-μεθυλισοβορνεόλη, η 1-οκτεν-3-όνη ή χλωροανισόλες (Darriet et al., 2000). Η πιθανότητα της ανακάλυψης και ταυτοποίησης αυτών των ενώσεων από την αέρια χρωματογραφία με ολφακτομετρική ανίχνευση κατά τα πρώτα στάδια προσβολής των πρώτων υλών, αλλά και κατά τη διάρκεια της ζύμωσης ή σε έτοιμα προϊόντα είναι πολύ σημαντική. Σύγχρονες εργασίες έχουν ως στόχο όχι μόνο την ταυτοποίηση οργανοληπτικά ενεργών μεταβολιτών ανεπιθύμητων μικροοργανισμών που βρίσκονται στα αλκοολούχα ποτά, αλλά και η σύνδεση της χαμηλής οργανοληπτικής ποιότητας με τη σύνθεση της μικροχλωρίδας, που θα μπορούσε να αποτρέψει την ανάπτυξη μυκήτων και άλλων μικροοργανισμών κατά την αποθήκευση των πρώτων υλών αλλά και κατά τη ζύμωση (Guerche et al., 2006).

### **2.6.3 Χρήση της GC-O για έλεγχο των διαδικασιών παραγωγής αλκοολούχων ποτών**

Πολυάριθμες πτητικές αρωματικές ενώσεις σχηματίζονται κατά την παραγωγή αλκοολούχων ποτών. Η ποσοτική και ποιοτική τους σύνθεση βασίζεται αυστηρά στις συνθήκες της παραγωγής και είναι αποτέλεσμα ενζυματικών, μικροβιακών και/ή θερμικών διεργασιών. Η αέρια χρωματογραφία με ολφακτομετρία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να μελετηθεί η διαμόρφωση του αρώματος σε αλκοολούχα ποτά, καθώς και την επίδραση ατομικών παραγόντων, όπως ο τύπος των ζυμών που χρησιμοποιήθηκε για τη ζύμωση. Έρευνες έχουν δείξει ότι διαφορετικά είδη ζυμών έχουν διαφορετικές ικανότητες στην παραγωγή και μετατροπή διαφόρων αρωματικών ενώσεων στο κρασί, και ότι εκτός από τον τύπο και την ωρίμανση των σταφυλιών (Ebeler, Terrien & Butzke, 2000), καθορίζουν το τελικό άρωμα του οίνου (Delfini et al., 2001). Το αρωματικό προφίλ ενός αλκοολούχου ποτού μπορεί να παρέχει σημαντικές πληροφορίες για τη βελτίωση και τελειοποίηση των συνθηκών της παραγωγικής διεργασίας. Τέτοιες έρευνες μπορεί να είναι εξαιρετικά χρήσιμες κατά την περίοδο πριν της έναρξης της παραγωγής νέων ποτών που φτιάχνονται από νέες πρώτες ύλες, όπως το μήλο κάσιους, το οποίο μέχρι τώρα θεωρείται παραπροϊόν προς απόρριψη κατά την παραγωγή των διάσημων καρπών (Garruti et al., 2006).

Ο προσδιορισμός των πτητικών αρωματικών ενώσεων με τη χρήση GC-O μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να ελεγχθούν τεχνολογικές διεργασίες. Για παράδειγμα, ο καθορισμός του αυξημένου περιεχόμενου σε αλδεΐδες, όπως μεθιονάλη ή φαινυλακεταλδεΐδη, που σχηματίστηκαν ως αποτέλεσμα της αποκαρβοξυλίωσης των αμινοξέων σύμφωνα με τον μηχανισμό Strecker κατά την ωρίμανση και αποθήκευση της μύρας, μπορεί να είναι ένας δείκτης της γήρανσης και μείωσης της οργανοληπτικής ποιότητας (Soares da Costa et al., 2004). Οι Gijis et al. βρήκαν ότι ο καθορισμός του επιπέδου αρωματικών συστατικών όπως η β-δαμασκηνόνη ή του διμέθυλο τρισουλφιδίου μπορεί να είναι ένας χρήσιμος δείκτης στον έλεγχο και βελτίωση του pH κατά την ζύμωση της μύρας, καθώς η αλληλεξάρτηση μεταξύ του pH και της παραγωγής αυτών των ενώσεων έχει αποδειχθεί (Gijis et al., 2002). Έρευνες με μεγαλύτερο πεδίο δράσης έγιναν από τους Guyot-Declerc et al. Σχετιζόμενες με την επίδραση του χρόνου ωρίμανσης και το pH της μύρας πάνω στις οργανοληπτικές της ιδιότητες. Αυτοί οι συγγραφείς τόνισαν την εξάρτηση των συγκεντρώσεων άλλων στοιχείων όπως η τρανς-2-νονενάλη και μεθιονάλη, με το pH της μύρας κατά την ωρίμανση. Επίσης, ισχυρίστηκαν ότι η ένταση του διμεθυλοτρισουλφιδίου αρώματος αυξάνει κατά την ωρίμανση ανεξάρτητα από το pH, και ότι η β-δαμασκηνόνη δεν έχει καμία σχέση με το pH ή το χρόνο ωρίμανσης.

Ένα άλλο παράδειγμα είναι ο καθορισμός των πτητικών προϊόντων από μη ενζυματικές αντιδράσεις καφετιάσματος Maillard σε εκχυλίσματα ξύλου από βελανιδιά που προήλθε από βαρέλια που χρησιμοποιήθηκαν για ζύμωση και αποθήκευση οίνων και ποτών υψηλής ποιότητας (Cutzach, Chatonnet, Henry & Dubordieu, 1997). Αρωματικές ενώσεις που σχηματίστηκαν κατά τη θερμική επεξεργασία του ξύλου μπορεί να επηρεάσει το άρωμα θετικά αλλά και αρνητικά, και οπότε οι συνθήκες κατασκευής βαρελιών μπορεί να έχουν σημαντική επίδραση στην ποιότητα του τελικού προϊόντος.

Ένα σημαντικό πρόβλημα, ειδικά σε χώρες του νότου, είναι η πρόωμη αποικοδόμηση των αρωμάτων των οίνων λόγω οξειδώσεων, που σε αυτές τις περιοχές αναπτύσσονται ταχύτερα ως αποτέλεσμα των υψηλότερων θερμοκρασιών, το pH και την ενζυματική δραστηριότητα στις ράγες κατά τον τρύγο και την παραγωγή του κρασιού.

Όσον αφορά τις οργανοληπτικές ιδιότητες, κάποιος είναι εύκολο να παρατηρήσει σε αυτή την περίπτωση χαμηλότερες εντυπώσεις φρεσκάδας και αρωματικότητας φρούτων, συνοδευόμενες από την εμφάνιση οσμών που ομοιάζουν χαρτί, βραστό, ταγγός ή σαπισμένο φαγητό καθώς και οσμή από σανό ή ξύλο. Τέτοια φαινόμενα μπορεί να μειώσουν τη διάρκεια ζωής, και για αυτό η συγκεκριμένη τεχνική χρησιμοποιήθηκε για να αναλυθούν αλλαγές στο αρωματικό προφίλ νεαρών λευκών οίνων, σχετικά με τις διαδικασίες της οξείδωσης (Escuder, Cacho & Ferreira, 2000). Η εμφάνιση 19 στοιχείων που είναι πιθανό να έχουν υψηλή σημαντικότητα στις οργανοληπτικές μεταβολές σε άρωμα οίνων, καθώς και στην εξαφάνιση ή εξασθένιση 15 επιθυμητών αρωμάτων παρατηρήθηκαν στην έρευνα. Η δράση της κάθε ένωσης ατομικά προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο AEDA ανάλυσης αραίωσης του εκχυλίσματος αρώματος. Αυτή η μέθοδος επίσης χρησιμοποιήθηκε για να ανιχνευθούν ανεπιθύμητες αρωματικές ενώσεις που σχετίζονται με τις οξειδωτικές διεργασίες σε λευκούς οίνους από την Πορτογαλία (Ferreira et al., 2003). Οι συγγραφείς, βασίζοντας σε σύγκριση αρωμάτων χαλασμένου οίνου και δειγμάτων από κρασί spiked με τις ενώσεις προς ανάλυση, ταυτοποίησαν τρεις ενώσεις, μεταξύ των οποίων η 3-μεθυλ-θειοπροπιονική αλδεϋδη χαρακτηρίστηκε ως ο πιο χαρακτηριστικός δείκτης ότι ένα κρασί αλλοιώθηκε ως αποτέλεσμα οξείδωσης.

#### **2.6.4 Προσδιορίζοντας ενώσεις υπεύθυνες για την επίγευση αλκοολούχων ποτών**

Μία ενδιαφέρουσα εφαρμογή του ολφακτομετρικού ανιχνευτή στην GC-O ανάλυση σε αρωματικές ενώσεις σε οίνους Chardonnay που σχετίζονται με την επίγευση, η αίσθηση κατά τον οργανοληπτικό έλεγχο μετά από κατάποση του δείγματος. Για τον καθορισμό, μπάρες ανάδευσης επικαλυμένες με πολυδιμεθυλ-σιλοξάνιο χρησιμοποιήθηκαν, όπως στην τεχνική εκχύλισης με ροφητικούς ράβδους ανάδευσης (SBSE). Οι ράβδοι ανάδευσης ήταν κλεισμένες σε γυαλί, και διάτρητες κάψουλες είχαν τοποθετηθεί στη στοματική κοιλότητα των αξιολογητών που είχαν προηγούμενα διεξάγει οργανοληπτικό έλεγχο των οίνων (Buettner & Welle, 2004). Η χρωματογραφική ανάλυση των ενώσεων που απορροφήθηκαν από τις μπάρες απόδοσαν αρωματικά προφίλ ενώσεων που παραμένουν στο στόμα για περισσότερο

κατά την κατάποση του οίνου και είναι υπεύθυνες για την επίγευση. Μία σύγκριση των αποτελεσμάτων της ολφακτομετρικής ανάλυσης των εκχυλισμάτων που αποκτήθηκαν με την παραπάνω τεχνική, ονομάστηκε «σύστημα παρακολούθησης παρρείας οσμής» (BOSS) από τους συγγραφείς, και τα εκχυλίσματα που αποκτήθηκαν με χρήση διχλωρομεθανίου και απόσταξης σε κενό, υποδεικνύουν ότι η πλειοψηφία των ενώσεων περιλαμβάνει αρώματα οίνων, εκτός από τις πιο πολικές που αντιδρούν με το σάλιο, ήταν υπεύθυνες για την εμφάνιση της επίγευσης. Παρόλα αυτά, οι κρατηθέντες χρόνοι των ενώσεων στη στοματική κοιλότητα των αξιολογητών διέφερε σημαντικά (Buettner, 2004).

Σε παρόμοιες έρευνες (Petka et al., 2006), ένας ειδικά σχεδιασμένος αποσπών που αντικαθιστά τη στοματική κοιλότητα χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση ενώσεων που λαμβάνουν μέρος στην οπισθορινική αντίληψη. Ο μηχανισμός βασίστηκε στην αρχή της καθάρσισης και παγίδευσης. Η ροφητική παγίδα τοποθετήθηκε στην κορυφή μιας μεγάλης φιάλης που περιείχε μίγμα οίνου και τεχνικού σάλιου, δια μέσω του οποίου υπήρχε ένα ρεύμα αέριου αζώτου.

#### **2.6.5 Χρησιμοποιώντας το GC-O για ανασκεύαση αρώματος αλκοολούχων ποτών**

Η βιβλιογραφία συχνά δίνει έμφαση στο ότι το κύριο μειονέκτημα της αέριας χρωματογραφίας με ολφακτομετρική ανίχνευση είναι η ικανότητα να αξιολογεί την συμβολή ατομικών στοιχείων στο άρωμα ενός δοθέντος προϊόντος, αφήνοντας στην άκρη τη αμοιβαία επίδραση των ενώσεων στη συνολική αντίληψη του αρώματος. Όμως, αυτή η τεχνική παρουσιάζει ένα στάδιο κλειδί για την ανασκευή αρωμάτων τροφίμων. Η πιο κοινή προσέγγιση βασίζεται στον προσδιορισμό των τιμών ατομικού αρώματος (OAV) ή τιμές αραιώσης αρώματος για κάθε ταυτοποιημένο στοιχείο και στην αναπαραγωγή της σύνθεσης του αρώματος με τη χρήση ενώσεων με υψηλότερες τιμές OAV ή FD (Lorrain et al., 2006). Σχετικά συχνά, ικανοποιητικές προσομοιώσεις σε ρεαλιστικά αρώματα προέρχεται από μίγματα με λίγες ενώσεις που έχουν τη μεγαλύτερη οργανοληπτική δραστηριότητα. Όμως, υπερβολική απλούστευση μπορεί να είναι αντιπαραγωγική. Για παράδειγμα, οι Ferreira et al. Βρήκαν ότι μοντέλα που βασίστηκαν σε εκχυλίσματα αρώματος με τιμές OAV μεγαλύτερες από 0.5 είχαν την

πιο κοντινή ομοιότητα σε ισπανικούς οίνους Grenache, η προσθήκη στοιχείων με τιμές κάτω από 0.5 δεν άλλαξαν πρακτικά το άρωμα. Από την άλλη μεριά, συνθέσεις που έγιναν με τιμές μεγαλύτερες από 10 είχαν τελείως διαφορετικό άρωμα σε σχέση με το αρχικό δείγμα (Ferreira, Petka et al., 2002). Άλλες έρευνες δείχνουν ότι η ειδικότητα του αρώματος ενός δοθέντος αλκοολικού ποτού μπορεί να γίνει με ενώσεις με πολύ χαμηλές τιμές OAV αλλά με χαρακτηριστικές οσμές που διαφέρουν από τις υπόλοιπες ενώσεις (Escudero et al., 2004).

Για να βρεθούν αρώματα κλειδιά, διαφορετικά τεστ πρέπει να χρησιμοποιηθούν, όπως τεστ παράλειψης (Ferreira, Petka et al., 2002) ή τεστ προσθήκης, που αξιολογούν αλλαγές στο άρωμα που προκαλούνται από παράλειψη κάποιου αρώματος σε μία σύνθεση ή αλλαγές που έγιναν μετά από προσθήκη αρωμάτων (Escudero et al., 2004). Μόνο τα τεστ που έχουν ως σκοπό την ρεαλιστική αναπαραγωγή της σύνθεσης του αρώματος μπορούν να αποδώσουν πληροφορίες σε φαινόμενα συνάθροιση ή επικάλυψης ενώσεων που εισέρχονται στο άρωμα των αλκοολούχων ποτών (Lorrain et al., 2006).

### **3 Υλικά και μέθοδοι**

#### **3.1 Αντιδραστήρια και υλικά που χρησιμοποιήθηκαν**

Για τη διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν 3 οίνοι, κάποια αντιδραστήρια και ορισμένα αναλώσιμα υλικά τα οποία αναφέρονται στις παραγράφους που ακολουθούν. Στο ίδιο κεφάλαιο αναφέρονται οι μέθοδοι ανάλυσης που ακολουθήθηκαν καθώς και οι συνθήκες της αέριου χρωματογραφίας και υγρής χρωματογραφίας υψηλής ανάλυσης με τις οποίες έγινε η ανάλυση των δειγμάτων.

##### **3.1.1 Οίνοι που αναλύθηκαν**

Οι οίνοι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν λευκοί των ποικιλιών Μαλαγουζιά, Αηδάνι και Moscato D'asti.

##### **3.1.2 Εκπαίδευση σε αρωματικά**

Αρχικά το προσωπικό εκπαιδεύτηκε με πρότυπες ουσίες αρωματικών σε συγκέντρωση (1g/l). Στη συνέχεια ετοιμάστηκαν διαλύματα σε συγκεντρώσεις πάνω από το κατώφλι αντίληψης και πέρασαν από αέριο χρωματογράφο με ανιχνευτή φλόγας ιονισμού καθώς και sniffer, έτσι ώστε να καταγραφούν οι χρόνοι κατακράτησης και να γίνει επιπλέον εκπαίδευση του προσωπικού σε αρωματικές ενώσεις.

##### **3.1.3 Περιγραφή διαδικασίας της υγρής/υγρής εκχύλισης**

Αρχικά λαμβάνεται δείγμα οίνου ίσο με 250ml σε ογκομετρική φιάλη των 250ml. Στη συνέχεια προστίθεται ποσότητα διαλύματος διχλωρομεθανίου ίση με 25ml και χλωριούχου νατρίου (NaCl) ίση με 15γραμμάρια που ζυγίσθηκε σε ηλεκτρονικό ζυγό με ένα δεκαδικό. Γίνεται επιπλέον προσθήκη 250μl των πρότυπων ουσιών 4-μεθυλο-1-πεντανόλη και 3-οκτανόλη με μικροπιπέτα 100-1000μl.



Στη συνέχεια το δείγμα μεταγγίζεται σε κωνική φιάλη των 250ml και τοποθετείται σε λεκάνη με πάγο πάνω σε μαγνητική πλάκα ανάδευσης και αναδεύεται για 15 λεπτά στις 300rpm (στροφές ανά λεπτό) για να διαλυθεί το NaCl και να γίνει ομογενοποίηση του δείγματος.

Μετά το πέρας των 15 λεπτών το δείγμα μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη όπου συλλέγεται η κατώτερη φάση. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 4000rpm και συλλέγεται το διχλωρομεθάνιο. Η όλη διαδικασία επαναλαμβάνεται 3 φορές.

Το διχλωρομεθάνιο συλλέγεται σε ποτήρι ζέσεως και κλείνεται με παραφίλι ενώ στη συνέχεια ακολουθεί απομάκρυνση της υδατικής φάσης με προσθήκη άνυδρου θειϊκού νάτριου και ανάδευση σε μαγνητική πλάκα ανάδευσης για 10 λεπτά και στο τέλος γίνεται φιλτράρισμα.

Θεωρητικά έχει παραληφθεί ποσότητα ίση με 75 ml διχλωρομεθανίου μαζί με τις αρωματικές ενώσεις που επιθυμούμε. Στη συνέχεια γίνεται συμπύκνωση με υδατόλουτρο σε θερμοκρασία ίση με 50°C μέχρι να φτάσουμε σε ποσότητα 4-5 ml και προχωράμε σε επιπλέον συμπύκνωση σε ρεύμα αέριου αζώτου μέχρι την ποσότητα των 1,5 ml.

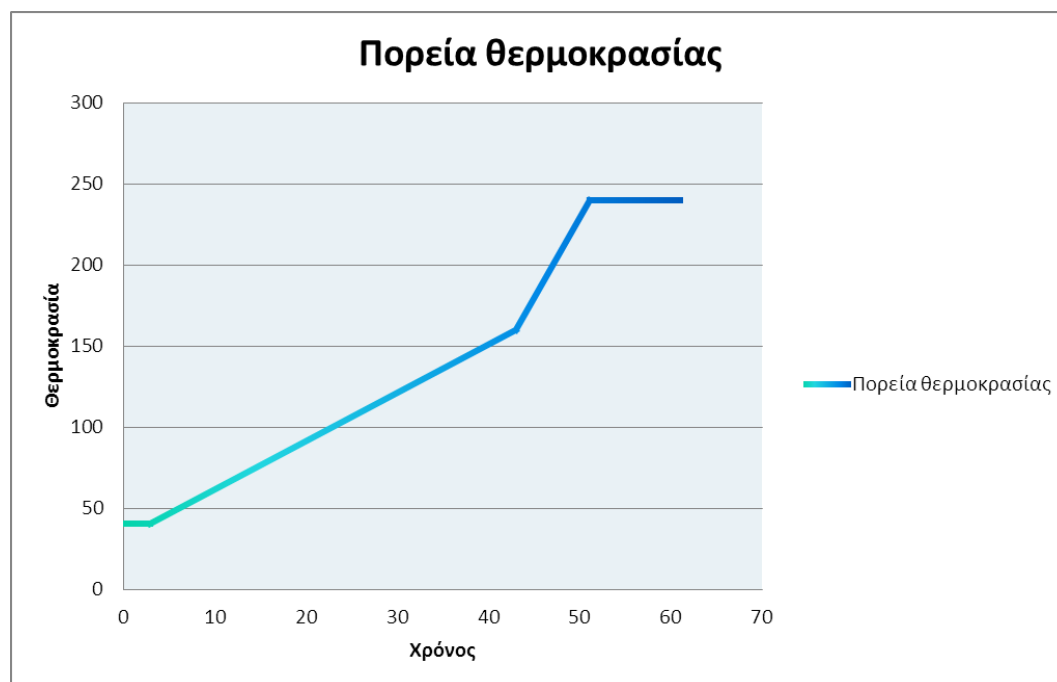
#### **3.1.4 Αέρια χρωματογραφία-ολφακτομετρία, αέρια χρωματογραφία-φασματογραφος μαζών**

Ο αέριος χρωματογράφος που χρησιμοποιήθηκε ήταν το GC Focus series 230 της εταιρείας Thermo Lab Electron Corporation σε ένωση με ανιχνευτή Sniffer 9000. Η στήλη ήταν DB-5 τριχοειδής, με χαρακτηριστικά: μήκος 30m, εσωτερική διάμετρος 0,25mm και πάχος εσωτερικής στιβάδας 0,25 $\mu$ m (30m x 0,25mm i.d, 0,25 $\mu$ m film thickness).

Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε το He ροή 1 $\mu$ l/min. Η θερμοκρασία του εισαγωγέα (injector) ρυθμίστηκε στους 240°C και του ανιχνευτη (detector) στους 250°C. Εφαρμόστηκε η τεχνική splitless για 5min κατά την εισαγωγή του δείγματος.

Η θερμοκρασία του φούρνου παρέμεινε στους 40°C για 3min ενώ στη συνέχεια αυξάνεται με ρυθμό 3°C/min μέχρι τους 160°C και καταλήγει στους 240°C με ρυθμό 10°C/min και παραμένει στη θερμοκρασία αυτή για 10min. Η διάρκεια του προγράμματος είναι 61λεπτά (διάγραμμα 3-1).

Διάγραμμα 3-1 Θερμοκρασιακό πρόγραμμα αέριου χρωματογράφου



### 3.1.5 Υγρή χρωματογραφία υψηλής ανάλυσης

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής ανάλυσης χρησιμοποιήθηκε ώστε το κάθε δείγμα να χωριστεί σε 24 κλάσματα που διέφεραν στο ποσοστό αλκοόλης. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν Spherisorb ODS - 5μm. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το ακετονιτρίλιο, απιονισμένο νερό και αιθανόλη δις απεσταγμένη. Η ροή ήταν 0,5 ml / min ενώ η κάθε ένεση είχε όγκο 50μL. Η συλλογή των κλασμάτων γινόταν σε σωλήνες erpendorf και ήταν 1ml κάθε δύο λεπτά. Το ακετονιτρίλιο

χρησιμοποιήθηκε για να γίνει έκπλυση από τυχόν υπολείμματα. Οι συγκεντρώσεις των διαλυτών σε σχέση με το χρόνο φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 3-1 Συγκεντρώσεις των διαλυτών ακετονιτρίλιο (Α), απιονισμένο νερό (Β) και αλκοόλη (C) σε σχέση με το χρόνο

| Χρόνος | A   | B  | C   |
|--------|-----|----|-----|
| 0      | 0   | 80 | 20  |
| 50     | 0   | 20 | 80  |
| 55     | 0   | 0  | 100 |
| 56     | 0   | 0  | 100 |
| 57     | 100 | 0  | 0   |
| 59     | 100 | 0  | 0   |

## **4 Αποτελέσματα και συζήτηση**

### **4.1 Δείγματα οίνων Αηδάνι, Μαλαγουζιά, Moscato d’Asti**

Οι πτητικές ενώσεις που ανιχνεύθηκαν με GC-sniffer και GC-MS στα κρασιά Αηδάνι, Μαλαγουζιά και Moscato d’Asti αναλύονται παρακάτω. Ένα σύνολο 46 ενώσεων ανιχνεύθηκε και προσδιορίστηκε στους οίνους και περιελάμβαναν 17 αλκοόλες, 14 εστέρες, 10 λιπαρά οξέα, 5 αλδεύδες-κετόνες. Πολλές από αυτές τις πτητικές ενώσεις είναι κοινές στα κρασιά και προέρχονται από το σταφύλι και τα στελέχη ζυμών κατά την ζύμωτική και οινοποιητική διεργασία.

Η πλειοψηφία των ενώσεων ήταν αλκοόλες, εστέρες και λιπαρά οξέα από άποψη πλήθους πτητικών ενώσεων. Οι αλδεύδες, κετόνες ήταν λιγότερα σε αριθμό.

#### **4.1.1 Αλκοόλες**

Αυτές οι πτητικές ενώσεις, που σχηματίζονται στο κρασί ως δευτερογενή προϊόντα του μεταβολισμού των ζυμομυκήτων, είναι οι ανώτερες αλκοόλες: active amyl alcohol, isoamyl alcohol, 1-propanol, 2-phenylethanol. Αυτές οι ενώσεις μπορούν να δημιουργηθούν με δύο τρόπους. Ο πρώτος είναι μέσα από το αναβολικό μονοπάτι της γλυκόζης ή μέσα από το καταβολικό μονοπάτι από τα αντίστοιχα αμινοξέα (valine, leucine, iso-leucine, phenylalanine) (Li et al., 2006).

Σε αυτό το πείραμα ανιχνεύθηκαν 14,16, 18 αλκοόλες στο Αηδάνι, Moscato d’Asti και Μαλαγουζιά αντίστοιχα. Αποτέλεσαν την μεγαλύτερη ομάδα ενώσεων σε όλα τα δείγματα, ακολουθούμενα από τους εστέρες και τα λιπαρά οξέα. Αυτό το κομμάτι θα μπορούσε να έχει το μεγαλύτερο αντίκτυπο στο αρωματικό προφίλ των οίνων, επιδρώντας θετικά στο άρωμα των οίνων (Lorenzo et al., 2008).

Πίνακας 4-1 Στην πρώτη στήλη αναγράφονται οι ανώτερες αλκοόλες που ανιχνεύθηκαν με το GC-MS σε όλα τα δείγματα. Στην δεύτερη εμφανίζεται το κατώφλι αντίληψης σε µg/L. Στις υπόλοιπες αναφέρεται η κάθε ποικιλία και σημειώνεται αν βρέθηκε η κάθε ένωση στο δείγμα καθώς και το πως περιέγραψαν οι αξιολογητές το άρωμα της ένωσης.

| ΠΗΚΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ   |                          | ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ |                 |                |                    |            |                    |
|--------------------|--------------------------|-----------|-----------------|----------------|--------------------|------------|--------------------|
|                    |                          | ΑΗΛΑΝΙ    |                 | MOSCATO D'ASTI |                    | ΜΑΛΑΓΟΥΖΙΑ |                    |
| ΑΛΚΟΟΛΕΣ           | ΚΑΤΩΦΛΙ ΑΝΤΙΛΗΨΗΣ (µg/L) | GC - MS   | Sniffer         | GC - MS        | Sniffer            | GC - MS    | Sniffer            |
| 1,4-Butanediol     | -                        | X         |                 | X              | X                  | √          | -                  |
| 1-Hexanol          | 8.000                    | √         | κομμένο γρασίδι | √              | -                  | √          | -                  |
| 1-Propanol         | 306.000                  | √         | -               | √              | γλυκειά οσμή σαν   | √          | γλυκειά οσμή σαν   |
| 2,3-Butanediol     | 120.000                  | √         | -               | √              | -                  | √          | -                  |
| 2-Methyl-1-butanol | -                        | √         | μπανάνα         | √              | μπανάνα            | √          | μπανάνα            |
| 3-Octanol          | -                        | √         | -               | √              | -                  | √          | -                  |
| Benzyl alcohol     | 200.000                  | X         | X               | √              | κίτρο              | √          | κίτρο              |
| cis-2-Hexen-1-ol   | 400                      | √         | κομμένο γρασίδι | √              | κομμένο γρασίδι,   | √          | κομμένο γρασίδι,   |
| cis-3-Hexen-1-ol   | 400                      | X         | X               | √              | κομμένο γρασίδι    | √          | κομμένο γρασίδι    |
| Ethy-1,4-butanol   | -                        | √         | -               | X              | X                  | X          | X                  |
| Hotrienol          | -                        | X         | X               | √              | πορτοκάλι, λεμόνι  | √          | πορτοκάλι, λεμόνι  |
| Iso-amyl alcohol   | 30.000                   | √         | μπανάνα         | √              | πορτοκάλι, μπανάνα | √          | πορτοκάλι, μπανάνα |
| Isohexanol         | -                        | √         | -               | √              | -                  | √          | -                  |
| Linalool           | 25                       | √         | -               | √              | -                  | √          | λεβάντα            |
| Methionol          | -                        | √         | -               | √              | -                  | √          | -                  |
| Phenylethanol      | 10.000                   | √         | -               | √              | -                  | √          | -                  |
| p-Vinylguaiacol    | -                        | √         | -               | √              | -                  | √          | -                  |
| Tyrosol            | -                        | √         | -               | √              | -                  | √          | -                  |

#### 4.1.2 Εστέρες

Σε αυτό το πείραμα ανιχνεύθηκαν 13,12, 13 εστέρες στο Αηδάνι, Moscato d'Asti και Μαλαγουζιά αντίστοιχα. Οι οξικοί εστέρες είναι προϊόν αντίδρασης του ακέτυλο-CoA με ανώτερες αλκοόλες που προήλθαν από την αποδόμηση αμινοξέων ή υδρογονανθράκων. Ως οξικοί εστέρες ανιχνεύθηκαν οι isobutyl acetate, butyl acetate, hexyl acetate, isoamyl acetate, active amyl acetate, phenethyl acetate. Οι οξικοί εστέρες θεωρούνται παράγοντες θετικής επίδρασης στους νέους οίνους (Ferreira et al., 2000). Γενικά, οι παραπάνω ενώσεις περιγράφηκαν ως κάτι το φρουτώδες με έντονη την αίσθηση της μπανάνας και του πράσινου μήλου.

Μία από τις πιο σημαντικές ομάδες πτητικών ενώσεων είναι οι αιθυλικοί εστέρες των λιπαρών οξέων που παράγονται ενζυματικά κατά την αλκοολική ζύμωση και από την αιθανόλυση του ακέτυλο-CoA που σχηματίζεται κατά την σύνθεση ή αποδόμηση των λιπαρών οξέων. Η συγκέντρωσή τους εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως το στέλεχος της χρησιμοποιούμενης ζύμης, η θερμοκρασία ζύμωσης και το περιεχόμενο σε σάκχαρα (Perestrelo et al., 2006). Συνολικά 7 αιθυλεστέρες ταυτοποιήθηκαν στα δείγματα οίνου. Οι εστέρες αυτές έχουν μία θετική επίδραση στη γενική ποιότητα του οίνου. Οι πιο πολλοί έχουν το τυπικό φρουτώδες άρωμα των νέων κρασιών (Francioli et al., 2003). Από αυτούς σημαντική συνεισφορά φαίνεται να έχουν οι ethyl hexanoate, ethyl lactate, ethyl butyrate.

Έκτός από τους οξικούς εστέρες και αιθυλεστέρες βρέθηκαν και εστέρες λιπαρών οξέων των ανώτερων αλκοολών και συμπεριελάμβαναν τους diethyl succinate, ethyl octanoate με φρουτώδη αρώματα.

Πίνακας 4-2 4-3 Στην πρώτη στήλη αναγράφονται οι εστέρες που ανιχνεύθηκαν με το GC-MS σε όλα τα δείγματα. Στην δεύτερη εμφανίζεται το κατώφλι αντίληψης σε µg/L. Στις υπόλοιπες αναφέρεται η κάθε ποικιλία και σημειώνεται αν βρέθηκε η κάθε ένωση στο δείγμα καθώς και το πως περιέγραψαν οι αξιολογητές το άρωμα της ένωσης.

| ΠΗΗΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ        |                                | ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ |                      |                |                         |            |                         |
|-------------------------|--------------------------------|-----------|----------------------|----------------|-------------------------|------------|-------------------------|
|                         |                                | ΑΗΛΑΝΙ    |                      | MOSCATO D'ASTI |                         | ΜΑΛΑΓΟΥΖΙΑ |                         |
| Ε Σ Τ Ε Ρ Ε Σ           | ΚΑΤΩΦΛΙ<br>ΑΝΤΙΛΗΨΗΣ<br>(µg/L) | GC - MS   | Sniffer              | GC - MS        | Sniffer                 | GC - MS    | Sniffer                 |
| Active amyl acetate     | -                              | √         | μπανάνα              | √              | μπανάνα                 | √          | μπανάνα                 |
| Diethyl succinate       | 500.000                        | √         | φρουτώδες            | √              | φρουτώδες               | √          | φρουτώδες               |
| Ethyl 3-hydroxybutyrate | -                              | √         | χορτάρι              | X              | X                       | √          | κομμένο γρασίδι         |
| Ethyl butyrate          | 20                             | √         | ανανάς               | √              | ανανάς                  | √          | ανανάς                  |
| Ethyl caprylate         | 2                              | √         | μέλι, κερί, ανανάς   | √              | μέλι, κερί, ανανάς      | √          | μέλι, κερί, ανανάς      |
| Ethyl decanoate         | 200                            | √         | ελαφριά οσμή φρούτων | √              | -                       | √          | -                       |
| Ethyl dodecanoate       | -                              | X         | X                    | √              | γαρύφαλλο, τριαντάφυλλο | √          | γαρύφαλλο, τριαντάφυλλο |
| Ethyl hexanoate         | 5                              | √         | μήλο, κερί           | √              | μήλο, κερί              | √          | μήλο, κερί              |
| Ethyl lactate           | 154.000                        | √         | βούτυρο, γάλα        | √              | βούτυρο, γάλα           | √          | βούτυρο, γάλα           |
| Hexyl acetate           | 670                            | √         | μήλο, αχλάδι         | √              | πράσινο μήλο            | √          | πράσινο μήλο            |
| Isoamyl acetate         | 30                             | √         | μπανάνα              | √              | μπανάνα                 | √          | Μπανάνα                 |
| Isobutyl acetate        | -                              | √         | μπανάνα              | √              | μπανάνα                 | √          | Μπανάνα                 |
| Methyl butyrate         | -                              | √         | ανανάς               | X              | X                       | X          | X                       |
| Phenethyl acetate       | 250                            | √         | πασχαλιά             | √              | πασχαλιά                | √          | πασχαλιά                |

### 4.1.3 Πτητικά οξέα

Ο σχηματισμός των πτητικών οξέων εξαρτάται από τη σύσταση του μούστου και τις θερμοκρασιακές συνθήκες κατά τη ζύμωση (Schreier, 1979). Δέκα πτητικά οξέα ανιχνεύθηκαν σε όλους τους οίνους. Οξέα όπως το isobutyric acid, caproic acid, decanoic acid δεν σχετίζονται με την ποιότητα του οίνου αλλά παίζουν ρόλο στην πολυπλοκότητα του αρώματος (Shinohara, 1985). Παίζουν σημαντικό ρόλο στην ισορροπία των οποίων καθώς λειτουργούν αντίθετα ως προς την υδρόλυση των αντίστοιχων εστέρων (Gil et al., 2006). Ικανό πλήθος πτητικών οξέων είναι απαραίτητο για το σχηματισμό υψηλότερων ποσοστών εστέρων στον οίνο. Τα πτητικά οξέα με έξι ως δέκα άτομα άνθρακα σε χαμηλές συγκεντρώσεις (4-10mg/L) έχουν μία απαλή και ευχάριστη επίδραση στο άρωμα του οίνου ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (>20mg/L) λειτουργούν μάλλον αρνητικά (Shinohara, 1985).

Πίνακας 4-4 Στην πρώτη στήλη αναγράφονται τα πτητικά οξέα που ανιχνεύθηκαν με το GC-MS σε όλα τα δείγματα. Στην δεύτερη εμφανίζεται το κατώφλι αντίληψης σε µg/L. Στις υπόλοιπες αναφέρεται η κάθε ποικιλία και σημειώνεται αν βρέθηκε η κάθε ένωση στο δείγμα καθώς και το πως περιέγραψαν οι αξιολογητές το άρωμα της ένωσης.

| ΠΤΗΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ    |                          | ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ |                    |                |                    |            |                    |
|---------------------|--------------------------|-----------|--------------------|----------------|--------------------|------------|--------------------|
|                     |                          | ΑΗΛΑΝΙ    |                    | MOSCATO D'ASTI |                    | ΜΑΛΑΓΟΥΖΙΑ |                    |
| Ο Ξ Ε Α             | ΚΑΤΩΦΛΙ ΑΝΤΙΛΗΨΗΣ (µg/L) | GC - MS   | Sniffer            | GC - MS        | Sniffer            | GC - MS    | Sniffer            |
| Active valeric acid | -                        | √         | -                  | √              | -                  | √          | -                  |
| Butanoic acid       | -                        | √         | -                  | √              | -                  | √          | -                  |
| Butyric acid        | 1.700                    | √         | βούτυρο            | √              | βούτυρο            | √          | βούτυρο            |
| Decanoic acid       | 15.000                   | √         | -                  | √              | -                  | √          | -                  |
| Hexanoic acid       | 3.000                    | √         | τυρί, κουμ κουάτ   | √              | τυρί, κουμ κουάτ   | √          | τυρί, κουμ κουάτ   |
| Isobutyric acid     | 200.000                  | √         | τυρί               | √              | τυρί               | √          | τυρί               |
| Isovaleric acid     | 33                       | √         | ταγγισμένο βούτυρο | √              | ταγγισμένο βούτυρο | √          | ταγγισμένο βούτυρο |
| Malic acid          | -                        | X         | X                  | X              | X                  | -          | -                  |
| Octanoic acid       | 500                      | √         | δριμεία οσμή, τυρί | √              | δριμεία οσμή, τυρί | √          | δριμεία οσμή, τυρί |
| Propionic acid      | 420                      | √         | ξύδι               | √              | ξύδι               | √          | ξύδι               |



#### 4.1.4 Αλδεΐδες και κετόνες

Η σύνθεση των οίνων σε αυτές τις ενώσεις παρουσίασε μία παραλλακτικότητα. Ανιχνεύθηκαν οι butyrolactone,  $\gamma$ -Carboethoxy- $\gamma$ -butyrolactone, vanillin, furfural, apocynin.

Πίνακας 4-5 Στην πρώτη στήλη αναγράφονται οι αλδεΐδες και κετόνες που ανιχνεύθηκαν με το GC-MS σε όλα τα δείγματα. Στην δεύτερη εμφανίζεται το κατώφλι αντίληψης σε  $\mu\text{g/L}$ . Στις υπόλοιπες αναφέρεται η κάθε ποικιλία και σημειώνεται αν βρέθηκε η κάθε ένωση στο δείγμα καθώς και το πως περιέγραψαν οι αξιολογητές το άρωμα της ένωσης.

| ΠΗΗΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ                               |   | ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ |         |                |             |            |             |
|--|---|-----------|---------|----------------|-------------|------------|-------------|
|  |   | ΑΗΛΑΝΙ    |         | MOSCATO D'ASTI |             | ΜΑΛΑΓΟΥΖΙΑ |             |
| ΑΛΔΕΪΔΕΣ<br>KETONES                            | ΚΑΤΩΦΛΙ<br>ΑΝΤΙΛΗΨΗΣ<br>( $\mu\text{g/L}$ ) | GC - MS   | Sniffer | GC - MS        | Sniffer     | GC - MS    | Sniffer     |
| Apocynin                                       | -   | ✓         | -       | ✓              | -           | ✓          | βανίλια     |
| Butyrolactone                                  | -   | ✓         | -       | ✓              | -           | ✓          | -           |
| Furfural                                       | 14.000                                      | X         | X       | ✓              | φρέσκο ξύλο | ✓          | φρέσκο ξύλο |
| Vanilin  | 200   | X         | X       | ✓              | βανίλια     | ✓          | βανίλια     |
| $\gamma$ -Carboethoxy- $\gamma$ -butyrolactone | -   | ✓         | -       | ✓              | -           | ✓          | -           |

#### 4.1.5 Τερπενόλες

Η linalool, hotrienol ανήκουν σε δευτερεύοντα συστατικά των φυτών των οποίων η βιοσύνθεση ξεκινά με ακετύλο-CoA. Το Moscato d'Asti ήταν αναμενόμενο να περιέχει αυτές τις ενώσεις που είναι τυπικές σε μοσχάτες ποικιλίες όμως μεγαλύτερη αρωματική έκφραση φαίνεται να υπάρχει στο δείγμα οίνου Μαλαγουζιάς.

## 4.2 Συζήτηση

Οι τρεις οίνοι που αξιολογήθηκαν φαίνεται να έχουν μία παρόμοια σύνθεση πτητικών ενώσεων. Η γενική πτητική σύνθεση των περισσότερων ποικιλιών σταφυλιών είναι παρόμοια παρά τις σαφείς διαφορές στα αρώματά τους (Molina et al., 2007). Οι περισσότερες ποικιλιακές διαφορές εμφανίζονται από αλλαγές στις σχετικές αναλογίες των πτητικών ενώσεων.

Με το πείραμα αυτό φαίνεται ότι αποκτήθηκε η ανατομία του κάθε οίνου και όχι ο συγκεκριμένος χαρακτήρας του. Η βιβλιογραφία συχνά δίνει έμφαση στο ότι το κύριο μειονέκτημα της αέριας χρωματογραφίας με οσφρητική ανίχνευση είναι η ικανότητα να αξιολογεί την συμβολή ατομικών στοιχείων στο άρωμα του οίνου, αφήνοντας στην άκρη την αμοιβαία επίδραση ενώσεων στη συνολική αντίληψη του αρώματος. Βασικά, η δοκιμασία του οίνου αφορά την αλληλεπίδραση πολυάριθμων πτητικών και μη πτητικών συστατικών που είναι παρούσες στο προϊόν (Polaskova et al., 2008).

Παρατηρήθηκε ότι όλες οι οσμές που ανιχνεύθηκαν από το προσωπικό αξιολόγησης αντιστοιχούσαν σε κορυφή στο χρωματογράφημα ενώ σύμφωνα με τους Ferreira et al. (1998) ενώσεις που ανιχνεύονται με τη μύτη ως κορυφές δεν είναι όλες ανιχνεύσιμες με τους κοινούς ανιχνευτές που δείχνει τη μεγάλη ευαισθησία της ανθρώπινης μύτης. Αυτή η διαφοροποίηση ίσως οφείλεται στην ταχύτατη εξέλιξη των οργάνων που χρησιμοποιούνται ως ανιχνευτές στην αέρια χρωματογραφία.

Στα δείγματα του Moscato d'Asti και της Μαλαγουζιάς ανιχνεύθηκε linalool, hotrienol που ανήκουν στα τερπένια και ανήκουν στο πρωτογενές άρωμα του οίνου. Το άρωμα του οίνου έχει ως προέλευση πολλαπλές πηγές και διεργασίες μεταξύ των οποίων η απευθείας συμβολή των αρωματικών ενώσεων του σταφυλιού, όπως μονοτερπένια, μη ισοπρενοειδή, φαινολοπροπανοειδή, μεθοξυπυραζίνες και πτητικές θειούχες ενώσεις (Gonzalez-Barreiro et al., 2013). Στην Μαλαγουζιά παρατηρήθηκε χαρακτηριστικό άρωμα λεβάντας ενώ στο Moscato αν και ανιχνεύθηκε από τον φασματογράφο μάζας δεν παρατηρήθηκε οσμή από τους αξιολογητές. Πιθανόν κάποια ουσία που μπορεί να βγαίνει από τη στήλη την ίδια στιγμή με την λιναλόλη να δίνει αυτήν την οσμή της λεβάντας. Τα μονοτερπένια παίζουν σημαντικό ρόλο στο άρωμα των λευκών οίνων από Μοσχάτες ποικιλίες (π.χ. Μοσχάτο Αλεξανδρείας) και

αρωματικών μη μοςχάτων ποικιλιών (π.χ. Riesling) (Mateo & Jimenez, 2000). Συσχετίσεις μεταξύ των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών λουλουδιών και υψηλών επιπέδων ελεύθερης λιναλόλης και α-τερπινεόλης σε αυτές τις ποικιλίες έχουν αποδειχθεί (Campo et al., 2005). Πρόκειται για δύο πολύ αρωματικές ποικιλίες ενώ το γεγονός ότι στο Moscato οι αξιολογητές δεν ανίχνευσαν οσμή ίσως έχει να κάνει με το γεγονός ότι η εκχύλιση με διαλύτη περιλαμβάνει αρκετά στάδια και οξειδωτικές αντιδράσεις που μεταβάλλουν τερπένια και εστέρες (Escudero & Etievant, 1999). Ίσως η χρήση ενός αντιοξειδωτικού όπως το BHA να βοηθούσε στην παραλαβή εκχυλίσματος με πιο αντιπροσωπευτική εικόνα.

Η πλειοψηφία των ενώσεων που ανιχνεύθηκε χαρακτηρίζεται ως δευτερογενές άρωμα του οίνου. Το άρωμα μπορεί να έχει ως προέλευση δευτερογενείς μεταβολίτες μετά από μικροβιακή επίδραση κατά το μεταβολισμό της ζάχαρης, των λιπαρών οξέων και οργανικών αζωτούχων ενώσεων που βρίσκονται στο σταφύλι (Bartowsky & Pretorius, 2009).

Σε όλα τα δείγματα ανιχνεύθηκαν κάποια από τα λιπαρά οξέα μικρής αλυσίδας όπως το ισοβουτυρικό, ισοβαλερικό και το βουτυρικό οξύ. Τα λιπαρά οξέα μικρής αλυσίδας που εν δυνάμει συμμετέχουν στο άρωμα και γεύση του οίνου περιλαμβάνουν το ισοβουτυρικό και ισοβαλερικό οξύ καθώς και το βουτυρικό και προπανοϊκό οξύ (Francis & Newton, 2005).

Και στα τρία δείγματα βρέθηκαν λιπαρά οξέα μεσαίας αλυσίδας τα οποία πολλές φορές σχετίζονται με σταματημένες ή αργές ζυμώσεις, καθώς η παρουσία τους είναι ανασταλτική για το *S.cerevisiae* και για κάποια βακτήρια (Bisson, 1999). Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται συνήθως σε συνθήκες χαμηλού pH, χαμηλής θερμοκρασίας και υψηλά ποσοστά αιθανόλης (Viegas & Sacorreia, 1997).

Τα λιπαρά οξέα μεσαίας αλυσίδας, εξανοϊκό, οκτανοϊκό και δεκανοϊκό, επίσης συμμετέχουν στο αρωματικό προφίλ των οίνων (Francis & Newton, 2005), και οι συγκεντρώσεις τους εξαρτώνται από τις αναερόβιες συνθήκες αύξησης, τη σύνθεση του μούστου, την καλλιέργεια του αμπελιού, το στέλεχος του ζυμομήκτα, τη θερμοκρασία ζύμωσης και τις οινολογικές πρακτικές (Bardi et al, 1999).

Στα δείγματα μας βρέθηκαν ενζυμικά σχηματισμένοι εστέρες όπως ο οξικός, βουτανοϊκός, εξανοϊκός και οκτανοϊκός αιθυλεστέρας. Στον οίνο οι εστέρες μπορεί να

ταξινομηθούν σε δύο ομάδες, σε αυτούς που σχηματίζονται ενζυμικά και εκείνους που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια παλαιώσης του οίνου (Margalit, 1997). Παρατηρήθηκε ότι οι C4-C10 αιθυλεστέρες των οργανικών οξέων, αιθυλεστέρες της ευθείας αλυσίδας λιπαρών οξέων και τα οξικά άλατα των ανώτερων αλκοολών είχαν έντονα αρώματα φρούτων και επηρέασαν σε μεγάλο μέρος το φρουτώδες άρωμα των οίνων. Όντως, σύμφωνα με τον Ebeler (2001) οι παραπάνω ενώσεις παρουσιάζουν αυτή την ιδιότητα και ιδιαίτερα στους νέους οίνους.

Κανένα από τα κρασιά δεν είχε υποστεί μηλογαλακτική ζύμωση, όμως βρέθηκε ο 2-υδροξυπροπανοϊκός αιθυλεστέρας (γαλακτικός αιθυλεστέρας) και μάλιστα στο Moscato d'Asti παρουσίασε οσμή βούτυρο. Είναι πιθανόν κάποια γαλακτικά βακτήρια να επηρέασαν το εστερικό προφίλ των οίνων. Πάντως σε χαμηλές συγκεντρώσεις προσδίδει ένα επιθυμητό χαρακτήρα στον οίνο ενώ σε υψηλές μπορεί να προσδώσει άρωμα διαλυτικού (Molina et al., 2007). Επίσης, η αρωματική ένωση που παράγεται περισσότερο κατά τη διάρκεια μηλογαλακτικής ζύμωσης είναι ο γαλακτικός αιθυλεστέρας (Maicas et al., 1999).

Τέλος, βρέθηκαν διακλαδισμένες ανώτερες αλκοόλες όπως η ισοαμυλο αλκοόλη και ισοβούτυλο αλκοόλη και αναγνωρίστηκαν με αρώματα κυρίως μπανάνας και πορτοκαλιού ενώ σύμφωνα με τους Francis & Newton (2005) έχουν οσμή βύνης, καμένου και διαλύτη, πικρού αντίστοιχα.

### **4.3 Αξιολόγηση κλασμάτων**

Τα δείγματα οίνου χαρακτηρίστηκαν ως πολύπλοκα οπότε πάρθηκε η απόφαση να γίνει κλασματοποίηση και περαιτέρω ανάλυση. Πράγματι, όταν το άρωμα του δείγματος προς ανάλυση χαρακτηρίζεται από μία πολύπλοκη ποιοτική σύνθεση, η κλασματοποίησή του είναι η προτεινόμενη λύση (Lee & Noble, 2003). Αυτό συχνά επιτρέπει τον προσδιορισμό αρωματικών ενώσεων που εμφανίζονται σε ίχνη μέσα σε ένα μίγμα από ενώσεις όπως ανώτερες αλκοόλες ή εστέρες λιπαρών οξέων που βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις.

Ο οργανοληπτικός έλεγχος των κλασμάτων έδωσε κάποιες πληροφορίες όμως λόγω του τρόπου απόκτησης των κλασμάτων και εν συνεχεία των εκχυλισμάτων προς

ανάλυση, τα χρωματογράφητα τόσο από το GC-MS αλλά και από το GC-sniffer δεν έδωσαν κάποιο αποτέλεσμα. Οι αξιολογητές δεν παρατήρησαν κάποια οσμή ενώ και οι παραδοσιακοί ανιχνευτές φλόγας ιονισμού και φασματογράφου μάζας δεν έδωσαν κάποια πληροφορία. Η κινητή φάση από τη στιγμή που ήταν νερό και αιθανόλη, ενώ δίνει το πλεονέκτημα της μη χρησιμοποίησης τοξικών και ενεργών αρωματικά διαλυτών, από την άλλη έχει ως αποτέλεσμα την επιπρόσθετη εκχύλιση σε διαλύτη για τα κλάσματα (Aznar et al., 2001). Αυτό το δεύτερο στάδιο της επιπρόσθετης εκχύλισης είναι μάλλον και ο λόγος που δεν προέκυψαν κάποια αποτελέσματα. Η εκ νέου I/I εκχύλιση, με τα πολλά στάδια που περιέχει και τον χρόνο που απαιτεί είναι πιθανό να οδήγησε σε απώλεια των αρωματικών ενώσεων. Πιθανότατα η επιλογή ενός διαφορετικού τρόπου εκχύλισης και συμπύκνωσης των δειγμάτων να έδινε καλύτερα αποτελέσματα.

Συμπερασματικά με την παρούσα μεθοδολογία δεν έγινε εφικτή η διαφοροποίηση του αρώματος των ποικιλιών. Θα πρέπει να αναπτυχθεί στο μέλλον περισσότερο η μεθοδολογία της κλασματοποίησης ώστε να ταυτοποιηθούν ουσίες που διαφοροποιούν τις ποικιλίες και χαρακτηρίζουν το αρωμα αυτών.

## Βιβλιογραφία

- Acree, T. E., Barnard, J., & Cunningham, D. G. (1984).** A procedure for the sensory analysis of gas chromatographic effluents. *Food Chemistry*, 14, 273–286.
- Auvray, M., and C. Spence. (2008).** The multisensory perception of flavor. *Conscious Cogn.* 17:1016-1031.
- Aznar, M., Lopez, R., Cacho, J. F., & Ferreira, V. (2001).** Identification and quantification of impact odorants of aged red wines from Rioja. GC–olfactometry, quantitative GC–MS, and odor evaluation of HPLC fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2924–2929.
- Baumes, R., J. Wirth, S. Bureau, Y. Gunata, and A. Razungles. (2002).** Biogenesis of C13-norisoprenoid compounds: Experiments supportive for an apocarotenoid pathway in grapevines. *Anal. Chim. Acta* 458:3-14.
- Begnaud, F., Starkenmann, C., Waal, M., & Chaintreau, A. (2006).** Chiral multidimensional gas chromatography (MDGC) and chiral GC– Olfactometry with a double-cool-strand interface: Application to Malodors. *Chemistry and Biodiversity*, 3, 150–160.
- Benn, S. M., & Peppard, T. L. (1996).** Characterization of tequila flavor by instrumental and sensory analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 557–566.
- Bernet, C., Dirninger, N., Claudel, P., Etievant, P., & Schaeffer, A. (2002).** Application of finger span cross modality matching method (FSCM) by naive assessors for olfactometric discrimination of Gewurztraminer wines. *Lebensmittel-Wissenschaft und- Technologie*, 35, 244–253.
- Bonino, M., Schellino, R., Rizzi, C., Aigotti, R., Delfini, C., & Baiocchi, C. (2003).** Aroma compounds of an Italian wine (Ruche) by HS-SPME analysis coupled with GC–ITMS. *Food Chemistry*, 80, 125–133.
- Bouchilloux, P., Darriet, P., Henry, R., Lavigne-Cruege, V., & Dubourdieu, D. (1998).** Identification of volatile and powerful odorous thiols in Bordeaux red wine varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3095–3099.
- Buettner, A. (2004).** Investigation of potent odorants and afterodor development in two Chardonnay wines using the buccal odor screening system (BOSS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 2339–2346.
- Buettner, A., & Welle, F. (2004).** Intra-oral detection of potent odorants using a modified stir-bar sorptive extraction system in combination with HRGC–O, known as the buccal odour screening system (BOSS). *Flavour Fragrance Journal*, 19, 505–514.
- Callemien, D., Dasnoy, S., & Collin, S. (2006).** Identification of a stalebeer-like odorant in extracts of naturally aged beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1409–1413.

- Campo, E., Ferreira, V., Escudero, A., & Cacho, J. (2005).** Prediction of the wine sensory properties related to grape variety from dynamic headspace gas chromatography–olfactometry data. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 5682–5690.
- Capone, D.L., D.W. Jeffery, and M.A. Sefton. (2012).** Vineyard and fermentation studies to elucidate the origin of 1,8-cineole in Australian red wine. *J. Agric. Food Chem.* 60:2281-2287.
- Chapman, D.M., J.H. Thorngate, M.A. Matthews, J.X. Guinard, and S.E. Ebeler. (2004).** Yield effects on 2-methoxy-3-isobutylpyrazine concentration in Cabernet Sauvignon using a solid phase microextraction gas chromatography/mass spectrometry method. *J. Agric. Food Chem.* 52:5431-5435.
- Cullere, L., Escudero, A., Cacho, J., & Ferreira, V. (2004).** Gas chromatography–olfactometry and chemical quantitative study of the aroma of six premium quality Spanish aged red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1653–1660.
- Cutzach, I., Chatonnet, P., Henry, R., & Dubordieu, D. (1997).** Identification of volatile compounds with a “Toasty” aroma in heated oak used in barrelmaking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2217–2224.
- Darriet, P., Pons, M., Henry, R., Dumont, O., Findeling, V., Cartolaro, P., et al. (2002).** Impact odorants contributing to the fungus type aroma from grape berries contaminated by powdery mildew (*Uncinula necator*); incidence of enzymatic activities of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3277–3282.
- Darriet, P., Pons, M., Lamy, S., & Dubordieu, D. (2000).** Identification and quantification of geosmine, an earthy odorant contaminating wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4835–4838.
- Debonneville, C., Orsier, B., Flament, I., & Chaintreau, A. (2002).** Improved hardware and software for quick gas chromatography–olfactometry using CHARM and GC-“SNIF” analysis. *Analytical Chemistry*, 74, 2345–2351.
- Deibler, K. D., Acree, T. E., & Lavin, E. H. (1999).** Solid phase microextraction application in gas chromatography/olfactometry dilution analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1616–1618.
- Deibler, K. D., Llesca, F. M., Lavin, E. H., & Acree, T. E. (2004).** Calibration of gas chromatography inlet splitting for gas chromatography olfactometry dilution analysis. *Flavour Fragrance Journal*, 19, 518–521.
- Delahunty, C. M., Eyres, G., & Dufour, J.-P. (2006).** Gas chromatography–olfactometry. *Journal of Separation Science*, 29, 2107–2125.
- Delfini, C., Cocito, C., Bonino, M., Schellino, R., Gaia, P., & Baiocchi, C. (2001).** Definitive evidence for the actual contribution of yeast in the transformation of neutral precursors of grape aromas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5397–5408.

- Dubourdieu, D., and T. Tominaga. (2009).** Polyfunctional thiol compounds. *In Wine Chemistry and Biochemistry*. M.V. Moreno-Arribas and M.C. Polo (eds.), pp. 275-293. Springer, New York.
- Ebeler, S., Terrien, M. B., & Butzke, C. E. (2000).** Analysis of brandy aroma by solid-phase microextraction and liquid–liquid extraction. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 625–630.
- Emanuelli, F., J. Battilana, L. Costantini, L. Le Cunff, J.M. Boursiquot, P. This, and M.S. Grando. (2010).** A candidate gene association study on Muscat flavor in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *BMC Plant Biol.* 10:241.
- Escudero, A., Cacho, J., & Ferreira, V. (2000).** Isolation and identification of odorants generated in wine during its oxidation: A gas chromatography- olfactometric study. *Eur. Food Res. Techno.*
- Escudero, A., & Etievant, P. (1999).** Effect of antioxidants on the flavor characteristics and the gas chromatography/olfactometry profiles of champagne extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3303–3308.
- Escudero, A., Gogorza, B., Melus, M. A., Ortin, N., Cacho, J., & Ferreira, V. (2004).** Characterization of the aroma of a wine from Maccabeo. Key role played by compounds with low odor activity values. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3516–3524.
- Etievant, P. X., Callement, G., Langlois, D., Issanchou, S., & Coquibus, N. (1999).** Odor intensity evaluation in gas chromatography–olfactometry by finger span method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1673–1680.
- Fan, W., & Qian, M. C. (2005).** Headspace solid phase microextraction and gas chromatography–olfactometry dilution analysis of young and aged Chinese “Yanghe Daqu” liquors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 7931–7938.
- Fan, W., & Qian, M. C. (2006a).** Characterization of aroma compounds of Chinese “Wuliangye” and “Jiannanchun” liquors by aroma extract dilution analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2695–2704.
- Fan, W., & Qian, M. C. (2006b).** Identification of aroma compounds in Chinese “Yanghe Daqu” liquor by normal phase chromatography fractionation followed by gas chromatography/olfactometry. *Flavour Fragrance Journal*, 21, 333–342.
- Fang, Y., & Qian, M. (2005).** Aroma compounds in Oregon Pinot Noir wine determined by aroma extract dilution analysis (AEDA). *Flavour Fragrance Journal*, 20, 22–29.
- Ferrari, G., Lablanquie, O., Cantagrel, R., Ledauphin, J., Payot, T., Fournier, N., et al. (2004).** Determination of key odorant compounds in freshly distilled cognac using GC–O, GC–MS, and sensory evaluation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5670–5676.
- Ferreira, A. C. S., Hogg, T., & Guedes de Pinho, P. (2003).** Identification of key odorants related to the typical aroma of oxidation-spoiled white wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1377–1381.



- Ferreira, V., Aznar, M., Lopez, R., & Cacho, J. (2001).** Quantitative gas chromatography–olfactometry carried out at different dilutions of an extract. Key differences in the odor profiles of four high-quality spanish aged red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4818–4824.
- Ferreira, V., Hernandez-Orte, P., Escudero, A., Lopez, R., & Cacho, J. (1999).** Semipreparative reversed-phase liquid chromatographic fractionation of aroma extracts from wine and other alcoholic beverages. *Journal of Chromatography A*, 864, 77–88.
- Ferreira, V., Lopez, R., Escudero, A., & Cacho, J. F. (1998).** The aroma of Grenache red wine: Hierarchy and nature of its main odorants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77, 259–267.
- Ferreira, V., Petka, J., & Aznar, M. (2002).** Aroma extract dilution analysis. Precision and optimal experimental design. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1508–1514.
- Francis, I.L., and J.L. Newton. (2005).** Determining wine aroma from compositional data. *Aust. J. Grape Wine Res.* 11:114-126.
- Fretz, C., Kanel, S., Luisier, J.-L., & Amado, R. (2005).** Analysis of volatile components of Petite Arvine wine. *European Food Research and Technology*, 221, 504–510.
- Fu, S.-G., Yoon, Y., & Bazemore, R. (2002).** Aroma-active components in fermented bamboo shoots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 549–554.
- Fur, Y., Mercurio, V., Moio, L., Blanquet, J., & Meunier, J. M. (2003).** A new approach to examine the relationships between sensory and gas chromatography–olfactometry data using generalized procrustes analysis applied to six French Chardonnay wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 443–452.
- Garde-Cerdan, T., C. Lorenzo, J.M. Carot, M. D. Esteve, M.D. Climent, and M.R. Salinas. (2010).** Effects of composition, storage time, geographic origin and oak type on the accumulation of some volatile oak compounds and ethylphenols in wines. *Food Chem.* 122:1076-1082.
- Garruti, D. S., Franco, M. R. B., Silva, M. A. A. P., Janzantti, N. S., & Alves, G. L. (2006).** Assessment of aroma impact compounds in a cashew apple-based alcoholic beverage by GC–MS and GC–olfactometry. *LWT*, 39, 372–377.
- Gijs, L., Chevance, F., Jerkovic, V., & Collin, S. (2002).** How low pH can intensify b-damascenone and dimethyl trisulfide production through beer aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5612–5616.
- González-Barreiro, C., R. Rial-Otero, B. Cancho-Grande, and J. Simal-Gándara. (2013).** Wine aroma compounds in grapes: A critical review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* doi: 10.1080/10408398.2011.650336.
- Grosch, W. (2001).** Evaluation of the key odorants of foods by dilution experiments, aroma models and omission. *Chemical Senses*, 26, 533–545.

- Guedes de Pinho, P., A.C.S. Ferreira, M.M. Pinto, J.G. Benitez, and T.A. Hogg. (2001).** Determination of carotenoid profiles in grapes, musts, and fortified wines from Douro varieties of *Vitis vinifera*. *J. Agric. Food Chem.* 49:5484-5488.
- Guerche, S., Dauphin, B., Pons, M., Blancard, D., & Darriet, P. (2006).** Characterization of some mushroom and earthy off-odors microbially induced by the development of rot on grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9193–9200.
- Gurbuz, O., Rouseff, J. M., & Rouseff, R. L. (2006).** Comparison of aroma volatiles in commercial Merlot and Cabernet Sauvignon wines using gas chromatography–olfactometry and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 3990–3996.
- Hanaoka, K., Sieffermann, J.-M., & Giampaoli, P. (2000).** Effects of the sniffing air makeup in gas chromatography–olfactometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2368–2371.
- Harris, V., C.M. Ford, V. Jiranek, and P.R. Grbin. (2008).** *Dekkera* and *Brettanomyces* growth and utilisation of hydroxycinnamic acids in synthetic media. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78:997-1006.
- Hasin-Brumshtein, Y., D. Lancet, and T. Olender. (2009).** Human olfaction: From genomic variation to phenotypic diversity. *Trends Genet.* 25:178-184.
- Heymann, H., and D. Cantu. (2013).** Systems biology of vintage and terroir: Adding some flavor to the wine grape transcriptome. *Flavour* 2:20.
- Hochereau, C., & Bruchet, A. (2004).** Design and application of a GCSNIFF/MS system for solving taste and odour episodes in drinking water. *Water Science and Technology*, 49, 81–87.
- Kishimoto, T., Wanikawa, A., Kono, K., & Shibata, K. (2006).** Comparison of the odor-active compounds in unhopped beer and beers hopped with different hop varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 8855–8861.
- Koch, A., C.L. Doyle, M.A. Matthews, L.E. Williams, and S.E. Ebeler. 2010.** 2-Methoxy-3-isobutylpyrazine in grape berries and its dependence on genotype. *Phytochemistry* 71:2190-2198.
- Komes, D., Ulrich, D., & Lovric, T. (2006).** Characterization of odoractive compounds in Croatian Rhine Riesling wine, subregion Zagorje. *European Food Research and Technology*, 222, 1–7.
- Kotseridis, Y., and R. Baumes. (2000).** Identification of impact odorants in Bordeaux red grape juice, in the commercial yeast used for its fermentation, and in the produced wine. *J. Agric. Food Chem.* 48:400-406.
- Kotseridis, Y., Razungles, A., Bertrand, A., & Baumes, R. (2000).** Differentiation of the aromas of Merlot and Cabernet Sauvignon wines using sensory and instrumental analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5383–5388.

- Lee, S.-J., & Noble, A. C. (2003).** Characterization of odor-active compounds in Californian Chardonnay Wines using GC–olfactometry and GC–mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 8036–8044.
- López, R., N. Ortín, J.P. Pérez-Trujillo, J. Cacho, and V. Ferreira. (2003).** Impact odorants of different young white wines from the Canary Islands. *J. Agric. Food Chem.* 51:3419-3425. Grape and Wine Aroma: Chemical and Viticultural – 19
- Lopez, R., Ferreira, V., Hernandez, P., & Cacho, J. F. (1999).** Identification of impact odorants of young red wines made with Merlot, Cabernet Sauvignon and Grenache grape varieties: A comparative study. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 1461–1467.
- Lopez, R., Ortín, N., Perez-Trujillo, J. P., Cacho, J., & Ferreira, V. (2003).** Impact odorants of different young white wines from the Canary Islands. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3419–3425.
- Lorrain, B., Ballester, J., Thomas-Danguin, T., Blanquet, J., Meunier, J. M., & Fur, Y. (2006).** Selection of potential impact odorants and sensory validation of their importance in typical chardonnay wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 3973–3981.
- Martin, D.M., A. Chiang, S.T. Lund, and J. Bohlmann. (2012).** Biosynthesis of wine aroma: Transcript profiles of hydroxymethylbutenyl diphosphate reductase, geranyl diphosphate synthase, and linalool/ nerolidol synthase parallel monoterpene glycoside accumulation in Gewürztraminer grapes. *Planta* 236:919-929.
- Martin, D.M., S. Aubourg, M.B. Schouwey, L. Daviet, M. Schalk, O. Toub, S.T. Lund, and J. Bohlmann. (2010).** Functional annotation, genome organization and phylogeny of the grapevine (*Vitis vinifera*) terpene synthase gene family based on genome assembly, FLcDNA cloning, and enzyme assays. *BMC Plant Biol.* 10:226.
- Mendes-Pinto, M.M. 2009.** Carotenoid breakdown products the–norisoprenoids–in wine aroma. *Arch. Biochem. Biophys.* 483:236-245.
- Petka, J., Ferreira, V., & Cacho, J. (2005).** Posterior evaluation of odour intensity in gas chromatography–olfactometry: Comparison of methods for calculation of panel intensity and their consequences. *Flavour Fragrance Journal*, 20, 278–287.
- Petka, J., Ferreira, V., Gonzales-Vinas, M. A., & Cacho, J. (2006).** Sensory and chemical characterization of the aroma of a White wine made with Devin grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 909–915.
- Plutowska, B., & Wardencki, W. (2007).** Aromagrams – Aromatic profiles in the appreciation of food quality. *Food Chemistry*, 101, 845–872.
- Pineau, B., J.C. Barbe, C. Van Leeuwen, and D. Dubourdieu. (2009).** Examples of perceptive interactions involved in specific “red-“ and “black-berry” aromas in red wines. *J. Agric. Food Chem.* 57:3702- 3708.
- Pollien, P., Ott, A., Montigon, F., Baumgartner, M., Munoz-Box, R., & Chaintreau, A. (1997).** Hyphenated headspace-gas chromatography-sniffing

technique: Screening of impact odorants and quantitative aromagram comparisons. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2630–2637.

**Rapp, A., W. Knipser, L. Engel, H. Ullemeyer, and W. Heimann. (1980).** Off-flavour compounds in the berry and wine aroma of grapevine hybrids I. The strawberry-like flavour. *Vitis* 19:13-23.

**Rossiter, K. J. (1996).** Structure–odor relationships. *Chemical Reviews*, 96, 3201–3240.

**Ruth, S. M. (2001).** Methods for gas chromatography–olfactometry: A review. *Biomolecular Engineering*, 17, 121–128.

**Ryona, I., B.S. Pan, D.S. Intrigliolo, A.N. Lakso, and G.L. Sacks. (2008).** Effects of cluster light exposure on 3-isobutyl-2-methoxypyrazine accumulation and degradation patterns in red wine grapes (*Vitis vinifera* L. vv. Cabernet franc). *J. Agric. Food Chem.* 56:10838-10846.

**Ruyter-Spira, C., S. Al-Babili, S. van der Krol, and H. Bouwmeester. (2013).** The biology of strigolactones. *Trends Plant Sci.* 18:72-83.

**Sáenz-Navajas, M.P., E. Campo, L. Culleré, P. Fernández-Zurbano, D. Valentin, and V. Ferreira. (2010).** Effects of the nonvolatile matrix on the aroma perception of wine. *J. Agric. Food Chem.* 58:5574-5585.

**Schneider, R., Baumes, R., Bayonove, C., & Razungles, A. (1998).** Volatile compounds involved in the aroma of sweet fortified wines (Vins Doux Naturels) from Grenache Noir. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3230–3237.

**Schneider, R., Rzaungles, A., Augier, C., & Baumes, R. (2001).** Monoterpenic and norisoprenoic glycoconjugates of *Vitis vinifera* L. cv. Melon B. as precursors of odorants in Muscadet wines. *Journal of Chromatography A*, 936, 145–157.

**Schultz, H. (2000).** Climate change and viticulture: A European perspective on climatology, carbon dioxide and UV-B effects. *Aust. J. Grape Wine Res.* 6:2-12.

**Sefton, M.A, G.K. Skouroumounis, G.M. Elsey, and D.K. Taylor. (2011).** Occurrence, sensory impact, formation, and fate of damascenone in grapes, wines, and other foods and beverages. *J. Agric. Food Chem.* 59:9717-9746.

**Selli, S., Cabaroglu, T., Canbas, A., Erten, H., Nurgel, C., Lepoutre, J. P., et al. (2004).** Volatile composition of red wine from cv. Kalecik Karasu grown in central Anatolia. *Food Chemistry*, 85, 207–213.

**Serot, T., Prost, C., Visan, L., & Burcea, M. (2001).** Identification of the main odor-active compounds in musts from French and Romanian hybrids by three olfactometric methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1909–1914.

**Silva Ferreira, A.C., P. Guedes de Pinho, P. Rodrigues, and T. Hogg. (2002).** Kinetics of oxidative degradation of white wines and how they are affected by selected technological parameters. *J. Agric. Food Chem.* 50:5919-5924.

- Simpson, R. F., Capone, D., & Sefton, M. A. (2004).** Isolation and Identification of 2-ethoxy-3,5-dimethylpyrazine, a Potent Musty Compound from Wine Corks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5425–5430.
- Singh, R., S. Rastogi, and U.N. Dwivedi. (2010).** Phenylpropanoid metabolism in ripening fruits. *Compr. Rev. Food Sci. Food Safety* 9:398-416.
- Soares da Costa, M., Goncalves, C., Ferreira, A., Ibsen, C., Guedes de Pincho, P., & Silva Ferreira, A. C. (2004).** Further insights into the role of Methional and Phenylacetaldehyde in Lager Beer Flavor stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7911–7917.
- Souza, M. D. C. A., Vasquez, P., Mastro, N. L., Acree, T. E., & Lavin, E. H. (2006).** Characterization of Cachaca and Rum Aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 485–488.
- Thibon, C., S. Shinkaruk, M. Jourdes, B. Bennetau, D. Dubourdieu, and T. Tominaga. (2010).** Aromatic potential of botrytized white grapes: Identification and quantification of new cysteine-S-conjugate flavor precursors. *Anal. Chim. Acta* 660:190-196.
- Wang, J., and V. De Luca. 2005.** The biosynthesis and regulation of biosynthesis of Concord grape fruit esters, including ‘foxy’ methylantranilate. *Plant J.* 44:606-619.
- Wanikawa, A., Hosoi, K., Kato, T., & Nakagawa, K. (2002).** Identification of green note compounds in malt whisky using multidimensional gas chromatography. *Flavour Fragrance Journal*, 17, 207–211.
- Winter, G., P.A. Henschke, V.J. Higgins, M. Ugliano, and C.D. Curtin. (2011).** Effects of rehydration nutrients on H<sub>2</sub>S metabolism and formation of volatile sulfur compounds by the wine yeast VL3. *AMB Express* 1:36.
- Winterhalter, P., and S.E. Ebeler (eds.). (2013).** Carotenoid Cleavage Products. ACS Symp. Series 1134. *Am. Chemical Society*, Washington, DC.
- Wood, C. (2008).** From wine to pepper: Rotundone, an obscure sesquiterpene, is a potent spicy aroma compound. *J. Agric. Food Chem.* 56:3738-3744.
- Young, P.R., J.G. Lashbrooke, E. Alexandersson, D. Jacobson, C. Moser, R. Velasco, and M.A. Vivier. (2012).** The genes and enzymes of the carotenoid metabolic pathway in *Vitis vinifera* L. *BMC Genomics* 13:243.

